



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E
INGENIERÍA GENÉTICA

CARACTERIZACIÓN DE LOS CAMBIOS GENÓMICOS Y FENOTÍPICOS
ADAPTATIVOS DE AISLAMIENTOS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
PROVENIENTES DE PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA

ASESORA: DRA. EN C. ELVIRA GARZA GONZÁLEZ


QCB. LUIS ÁNGEL NÚÑEZ GARCÍA

MONTERREY, NUEVO LEÓN

JULIO 2024

“Caracterización de los cambios genómicos y fenotípicos adaptativos de aislamientos de
Pseudomonas aeruginosa provenientes de pacientes con fibrosis quística”

Aprobación de tesis:



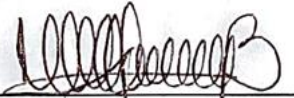
Dra. en C. Elyra Garza González.

Directora de Tesis



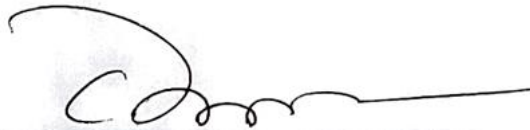
Dr. en C. Antonio Alí Pérez Maya.

Codirector de Tesis



Dra. en C. María del Carmen Barboza Cerda.

Miembro de la Comisión



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

PROYECTO APROBADO

Comité de Ética en Investigación del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González de
la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Con el número de registro BI23-00005.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mí mismo, ya que, a pesar de todo mi esfuerzo y dedicación, soy solo un conjunto de retazos que he ido acumulando a lo largo de mi vida gracias a todas las experiencias y personas con las que he interactuado. De algunas personas he tomado parches enormes, que constituyen una parte muy importante de mi ser, mientras que de otras solo he tomado unos cuantos hilos, pero todas forman parte de aquello que llamamos Luis Ángel Núñez García. Sin todas esas personas probablemente no estaría escribiendo estas palabras exactas, ni hubiera recorrido el camino que he transitado. Agradezco a Dios, dondequiera que esté, por ser quien ha cosido todos estos parches a lo largo de casi veinticinco años.

*“Caminante, son tus huellas el camino y nada más;
Caminante, no hay camino, se hace camino al andar.
Al andar se hace el camino, y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca, se ha de volver a pisar.”*

Antonio Machado, 1917

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mi madre, por su apoyo y amor incondicional, que a pesar de la distancia siempre está y estará presente en mi vida. A toda mi familia, que de igual manera siempre me han expresado su apoyo y cariño, a mi padre, mis tías Ana y Mayra, mi tío Lucio y a mis primas Karla y Marilú. También a mi padrino Cesar, que, a pesar de la falta de consanguinidad, es alguien al que considero mi familia. Agradezco desde el fondo de mi corazón a cada uno de ellos por siempre preocuparse por mi y buscar la forma de apoyarme, sin ellos no podría estar dónde estoy ahora, y de manera más importante, ayudarme en gran medida a sentirme pleno y feliz.

Agradezco además a mis amigos de toda la vida Jesús y Juan, a los que considero mis hermanos y se que cuento con ellos para cualquier dificultad, le agradezco a Dios la oportunidad de crecer y reír junto a ambos. Además, a esas amistades tan especiales hechas en estas tierras montañosas, Valeria a quien le agradezco infinitamente por todo su apoyo, amistad y amor, alguien que tiene un lugar muy grande en mi corazón. Además de Jonathan, alguien que siempre está dispuesto a ayudar y escuchar a un amigo cuando más lo necesita y no sabe más que dar amor.

Muchas gracias a mis amistades hechas durante el curso de la maestría, a todos mis compañeros, particularmente Daniel, Selene y Larli, en quienes logré encontrar una amistad, a pesar de mi aversión a establecer relaciones. A Lucy por siempre estar dispuesta a enseñar y ser un ejemplo de lo que es el trabajo bien hecho los doctores Miguel y María, que siempre demostraron apoyo e interés y me ayudaron en lo que les fuera posible. Finalmente, a la doctora Elvira, que siempre ha cumplido su rol como asesora de una manera impecable, además de ser una gran inspiración por su calidad tanto de investigadora como de persona, y un ejemplo a seguir.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE ANEXOS.....	vii
RESUMEN.....	¡Error! Marcador no definido.
ABSTRACT.....	¡Error! Marcador no definido.
1. Fibrosis quística	3
1.1. Etiología	3
1.2. Fisiopatología	4
1.3. Epidemiología	6
1.4. Diagnóstico y tratamiento.....	6
1.5. Colonización e infección de la vía aérea del paciente con fibrosis quística	8
2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
2.1. Aspectos generales	8
2.2. Factores de virulencia.....	9
2.3. Resistencia a los antibióticos.....	11
3. Secuenciación de próxima generación	12
3.1. Fundamentos y aplicaciones.....	12
3.2. Tecnología Illumina.....	13
3.3. Secuenciación de genoma completo.....	14
3.4. Análisis bioinformático	15
3.4.1. Análisis bioinformático “clásico” o manual.....	15
3.4.2. Análisis bioinformático automatizado.....	16
ANTECEDENTES.....	17
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVOS	21
1. Objetivo general.....	21
2. Objetivos específicos	21
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23

1.	Selección de aislamientos.	23
2.	Extracción de DNA.	23
3.	Secuenciación de genoma completo.	24
4.	Procesamiento bioinformático.....	24
4.1	Limpieza de las lecturas y ensamble de genomas.....	24
4.2	Análisis de resistoma, viruloma y MLST.....	25
4.3	Análisis filogenético basado en variantes.	25
4.4	Análisis de variantes.	25
4.5	Análisis de pangenoma.	26
5.	Ensayos de motilidad.	26
5.1.1.	Twitching.....	26
5.2.	Motilidad tipo swarming.	27
5.3.	Motilidad por nado (Swimming).	27
6.	Evaluación de la tasa de crecimiento específica (μ).	27
7.	Evaluación de la producción de biopelícula.....	28
8.	Pruebas de susceptibilidad.	29
9.	Expresión de genes involucrados en la adaptación.	29
9.1	Selección de genes y diseño de primers.....	29
9.2	Extracción de RNA partiendo de biopelícula.....	30
9.3	Retrotranscripción y PCR en tiempo real (qPCR) de cDNA.	30
9.4	Análisis de expresión.....	32
RESULTADOS		33
1.	Objetivo 1.....	33
1.1.	Población de estudio.....	33
1.2.	Análisis de calidad.....	33
1.3.	Depósito de secuencias.....	34
2.	Objetivo 2.....	34
2.1.	Análisis de calidad y ensamble de genomas.....	34
2.2.	Tipificación de secuencias multilocus (MLST) y análisis de MLST de genoma completo (wgMLST).....	36
2.3.	Análisis filogenético basado en variantes.....	40
2.4.	Análisis de resistoma.....	41
2.4.1.	Flagelo.....	42

2.4.2.	Pili de tipo IV.....	43
2.4.3.	Pioverdina.....	44
2.4.4.	Síntesis del antígeno O.....	45
2.4.5.	Sistema de secreción tipo III.....	46
2.4.6.	Sistema de secreción tipo VI.....	47
2.4.7.	Piocianina y pioquelina.....	48
2.4.8.	Biopelícula.....	49
2.5.	Análisis de variantes.....	50
2.6.	Análisis de pangenoma.....	50
3.	Objetivo 3.....	51
3.1.	Ensayos de motilidad.....	51
3.2.	Producción de biopelícula.....	53
3.3.	Tasa de crecimiento específica (μ).....	54
3.4.	Actividad elastolítica.....	55
3.5.	Susceptibilidad a antibióticos.....	56
4.	Objetivo 4.....	60
4.1.	Diseño de primers para PCR en tiempo real.....	60
4.2.	Expresión de genes involucrados en la adaptación.....	61
	DISCUSIÓN.....	63
	CONCLUSIONES.....	69
	ANEXOS.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrategia experimental general.....	22
Figura 2: Resultados FASTQC resumidos utilizando el software MULTIQC	35
Figura 3: Dendograma basado en el análisis de wgMLST obtenido por el software Epi Seq CS..	38
Figura 4: Árbol filogenético basado en variantes generado por RAxML.	40
Figura 5 : Árbol filogenético basado en variantes y análisis de resistoma.....	41
Figura 6: Árbol filogenético basado en variantes y análisis de genes relacionados a flagelo.	42
Figura 7:: Árbol filogenético basado en variantes y análisis de genes relacionados a pilis de tipo IV.	43
Figura 8: Árbol filogenético basado en variantes y análisis de genes a la producción y captación de pioverdina.	44
Figura 9: Árbol filogenético basado en variantes y análisis de genes relacionados a la síntesis del antígeno O.....	45
Figura 10: Árbol filogenético basado en variantes y análisis de genes relacionados al sistema de secreción tipo III..	46
Figura 11: Árbol filogenético basado en variantes y análisis de genes relacionados al sistema de secreción tipo III.	47
Figura 12: Árbol filogenético basado en variantes y análisis de genes relacionados a la producción de piocianina y pioquelina.....	48
Figura 13: Árbol filogenético basado en variantes y análisis de genes relacionados a la producción de biopelícula.....	49
Figura 14: Número de genes accesorios para cada uno de los aislamientos; ordenados por fecha y separados por pacientes.	50
Figura 15: Porcentaje de genes relacionados a las distintas categorías funcionales (tabla izquierda); ordenados por fecha y separados por pacientes.	51
Figura 16: Árbol filogenético basado en variantes y resultados de los ensayos de motilidad.	52

Figura 17: Árbol filogenético basado en variantes y resultados de los ensayos de producción de biopelícula.....	53
Figura 18: Evaluación de la tasa de crecimiento específica (μ) para los aislamientos del paciente 1, ordenados por fecha de aislamiento.	54
Figura 19: Aumento de la intensidad de fluorescencia relativa (RFI) dependiente de la degradación de elastina marcada con un fluoróforo a lo largo del tiempo para los aislamientos del paciente 1.	55
Figura 20: Aumento de la intensidad de fluorescencia relativa (RFI) dependiente de la degradación de elastina marcada con un fluoróforo a lo largo del tiempo para los aislamientos de los pacientes 2 y 3.	56
Figura 21: Electroforesis en gel de agarosa para cada uno de los pares de primers evaluados.	60
Figura 22: Análisis de las curvas de disociación después de la amplificación por qPCR del cDNA generado.	61
Figura 23: Resultados de expresión relativa para los distintos genes evaluados empleando el primer aislamiento como calibrador (izquierda) y la cepa de referencia ATCC 27853 (derecha).	62

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Parámetros de calidad para el DNA extraído por el método de fenol-cloroformo. .	24
Tabla 2:	Parámetros para la clasificación de aislamientos productores de biopelícula.	28
Tabla 3:	Condiciones de reacción para la amplificación.	31
Tabla 4:	Condiciones de corrida para la amplificación.	31
Tabla 5:	Parámetros de calidad del DNA extraído evaluado por espectrofotometría.	33
Tabla 6:	Promedio de las métricas de calidad obtenidas para los ensamblados generados con Unicycler.	35
Tabla 7:	Resultados de tipificación de secuencias multilocus (MLST) del Hospital de Especialidades Pediátricas.	37
Tabla 8:	Resultados de tipificación de secuencias multilocus (MLST) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.	38
Tabla 9.	Número y tipo de variantes acumuladas al comparar el último aislamiento vs el primero de pacientes con seguimiento longitudinal.	50
Tabla 10:	Interpretación de antibiograma para los aislamientos incluidos en el estudio.	57
Tabla 11:	Concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g}/\text{mL}$) para los aislamientos incluidos en el estudio.	59

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Secuencias de primers utilizadas.	70
Anexo 2: Distribución de las muestras incluidas en el estudio ordenadas por fecha de aislamiento.....	71
Anexo 3: Evaluación de la calidad del DNA por el servicio externo Novogene CSS.	72
Anexo 4: Variantes acumuladas de aislamientos longitudinales.	73
Anexo 5: Tasa de crecimiento específica de los aislamientos de ambos centros.	94
Anexo 6: Tasa de crecimiento específica de los aislamientos de ambos centros.	95
Anexo 7: Prevalencia de betalactamasas encontradas por el análisis de resistoma.....	96

NOMENCLATURAS Y SÍMBOLOS

µg: Microgramos.

µL: Microlitros.

ABC: Cassette de unión a ATP.

ATCC: American Type Culture Collection.

ATP: Adenosina trifosfato.

CARD: Base de datos comprensiva de la resistencia a antibióticos.

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario.

CFTR: Regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística.

DEPC: Dietil pirocarbonato.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

dNTP: Desoxinucleótidos trifosfato.

DO: Densidad óptica.

ENaC: Canal epitelial de sodio.

FQ: Fibrosis quística.

g: Gramos.

h: Horas.

HEP: Hospital de Especialidades Pediátricas.

INER: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

LB: Luria-Bertani.

LPS: Lipopolisacárido.

mL: Mililitros,

MLST: Tipificación de secuencias multi-locus.

NCBI: Centro Nacional de Información de Biotecnología.

pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PEX: Exacerbación pulmonar.

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

RFI: Unidades de fluorescencia relativas.

RNA: Ácido ribonucleico.

RT-qPCR: Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

ST: Secuencia tipo.

T3SS: Sistema de secreción tipo 3.

T6SS: Sistema de secreción tipo 6.

UV: Ultravioleta.

VFDB: Base de datos de factores de virulencia.

wgMLST: Tipificación de secuencias multilocus de genoma completo

RESUMEN

Introducción: La adaptabilidad y resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los antibióticos son desafíos importantes en pacientes con fibrosis quística (FQ). Este estudio analiza los cambios genómicos y fenotípicos de 39 aislamientos de *P. aeruginosa* recolectados de pacientes con FQ en dos centros de FQ en México.

Metodología: Se analizó el DNA de 39 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* recolectados durante 10 años de 11 pacientes con FQ. En siete pacientes se incluyó un aislamiento por paciente y en cuatro pacientes se recolectaron 32 aislamientos longitudinalmente (n=19, n=6, n=5, n=2). Se realizó la secuenciación del genoma completo con Illumina NovaSeq. Los datos se procesaron y analizaron con varias plataformas. Se evaluaron la motilidad, actividad elastostolítica, tasa de crecimiento y formación de biopelículas. La expresión génica del sistema de secreción tipo VI se analizó en un modelo de biopelícula.

Resultados: Los análisis wgMLST y basados en SNP revelaron cepas distintas entre los pacientes y la predominancia de una cepa a lo largo del tiempo en pacientes con aislamientos longitudinales. El resistoma mostró una variedad de genes de betalactamasas y bombas de eflujo de biocidas en aislamientos longitudinales. El viruloma mostró patrones similares entre cepas, con ausencia de genes para motilidad, lipopolisacáridos y síntesis de antígeno O. Los genes de biopelícula y fenazinas se conservaron. En ensayos fenotípicos, el 7% mostró motilidad tipo twitching, el 28% motilidad tipo swarming y el 79% motilidad por nado. Se observó una disminución en la tasa de crecimiento específica y actividad elastolítica en aislamientos longitudinales. El 56% fueron productores de biopelículas, con producción variable en muestras longitudinales. La expresión génica mostró una sobreexpresión del sistema de secreción tipo VI, favoreciendo la actividad de agregación sobre la citotoxicidad.

Conclusiones: La distribución de cepas intra-paciente fue clonal sin evidencia de transmisión inter-paciente o intra-centro. Todas las cepas tenían genes de inactivación de antibióticos, con mayor diversidad en los aislamientos longitudinales. En general, las cepas exhibieron un fenotipo de baja virulencia según el análisis del viruloma y las pruebas fenotípicas.


Dra. en C. Elvira Garza González.
Directora de Tesis

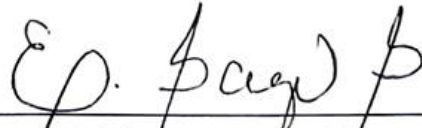
ABSTRACT

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* adaptability and resistance to antibiotics are significant challenges in cystic fibrosis patients (CF). This study focuses on the analysis of the genomic and phenotypic changes of 39 *P. aeruginosa* isolates collected over time from CF patients at two Mexican CF-centers.

Methodology: DNA from 39 clinical isolates of *P. aeruginosa* recovered over 10 years from 11 CF patients were analyzed. In seven patients, one isolate was included per patient and in four patients, 32 isolates were longitudinally recovered (n=19, n=6, n=5, and n=2 isolates each). Whole genome sequencing was performed using Illumina NovaSeq (150 bp paired reads). Data was processed using Unicycler for assembly and analyzed using EpiSeq CS, Snippy, RAXML, and Anvi'o platforms. Phenotypic tests were conducted to assess motility, elastolytic activity, growth rate, and biofilm formation. Gene expression of the type VI secretion system was analyzed using a biofilm model.

Results: wgMLST and SNP-based analyses revealed distinct strains across patients and consistent strains in those with longitudinally collected samples. Resistome analysis showed a diverse array of β -lactamase genes associated with cephalosporin and carbapenem antibiotic inactivation; while biocide efflux pumps, and modification of fluoroquinolone target sites were found in longitudinal isolates. Virulome analysis showed similar patterns between strains, with the absence of genes for motility, lipopolysaccharide, and O-antigen synthesis, and pyoverdine metabolism. Biofilm and phenazine genes were conserved amongst strains. On phenotypic assays, 7% of isolates showed twitching motility, 28% swarming and 79% showed swimming. A decrease in specific growth rate and elastolytic activity was observed amongst longitudinal isolates, 56% of isolates were biofilm producers, with variable production in longitudinal samples. Gene expression revealed overexpression of the type VI secretion system, favoring aggregation activity over cytotoxicity.

Conclusions: Intra-patient strain distribution was clonal, with no evidence of inter-patient or intra-center transmission. All strains harbor antibiotic inactivation genes, and longitudinal isolates displayed a greater diversity in their resistance mechanism. Overall, the strains exhibited a low-virulence phenotype, as seen in the virulome analysis and phenotypic tests.


Dra. en C. Elvira Garza González.
Directora de Tesis

INTRODUCCIÓN

1. Fibrosis quística

1.1. Etiología

La fibrosis quística es una enfermedad monogénica con un patrón de herencia autosómico recesivo, causada por mutaciones en el gen CFTR, el cual codifica el Canal Regulador de la Conductancia Transmembranal de la Fibrosis Quística (CFTR por sus siglas en inglés). Hasta la fecha se han descrito más de 2,000 mutaciones en este locus, las cuales se clasifican de la Clases I a VI según el mecanismo por el que ocasiona la disminución o pérdida de la actividad de la proteína (1, 2).

- Clase I: Hay ausencia prácticamente total de la proteína debido a su rápida degradación. Esto generalmente ocurre por codones de terminación prematuros o corrimientos del marco de lectura, generando una proteína trunca o aberrante, la cual es reconocida por la maquinaria celular y llevada a su degradación por el sistema de ubiquitina-proteasoma. Está asociada a fenotipos más severos.
- Clase II: Se produce una proteína parcialmente funcional con actividad disminuida o alterada, debido a defectos en su plegamiento, lo que también conlleva a la degradación de una parte de ésta. Dentro de este grupo se encuentra la mutación p.F508del (delección de fenilalanina en la posición 508), para la cual cerca del 45% de los pacientes con fibrosis quística son homocigotos (1).
- Clase III: Existe una producción, modificación y transporte normal, pero presenta un tiempo de apertura considerablemente reducido, generalmente a causa de mutaciones de cambio de sentido.
- Clase IV: La proteína es producida y transportada con normalidad, pero presenta una menor permeabilidad a iones, generalmente debido a mutaciones de cambio de sentido.
- Clase V: Existe una reducción en la síntesis de la proteína a nivel traduccional por mutaciones que generan un corte y empalme aberrante.

- Clase VI: El cambio en la secuencia de aminoácidos provoca a una disminución en la estabilidad del producto proteico (generalmente funcional), por un transporte prematuro hacia lisosomas.

Esta clasificación resulta útil en el estudio de los mecanismos moleculares asociados a la fisiopatología, sin embargo, no representa adecuadamente el amplio espectro de manifestaciones clínicas que existe entre pacientes, pues generalmente existe un solapamiento entre las características fenotípicas asociadas a cada grupo (1) (3) (4, 5).

Actualmente no se ha establecido una correlación genotipo-fenotipo, entre el tipo de mutación y las manifestaciones clínicas de la enfermedad, especialmente para las variantes de baja frecuencia. Los pacientes con mutaciones pertenecientes a las clases I-III tienden a manifestar el fenotipo clásico, mientras que los otros grupos exhiben formas leves de la enfermedad (3, 6).

Las manifestaciones clásicas incluyen una triada de infecciones pulmonares recurrentes, esteatorrea y desnutrición. Varios órganos y tejidos se ven comprometidos, destacando la vía aérea, el tracto gastrointestinal, glándulas sudoríparas y genitales, en menor medida se presenta pancreatitis y sinusitis (1). Una proporción considerable de pacientes con mutaciones de las clases IV-VI presentan “enfermedad relacionada a CFTR”, en la que hay episodios recurrentes de pancreatitis o bronquiectasias bilaterales (3).

1.2. Fisiopatología

La proteína CFTR es un canal aniónico perteneciente a la superfamilia de transportadores ABC (casete de unión a ATP) de 1,480 aminoácidos y se encarga de transportar iones Cl^- hacia el espacio extracelular en varios epitelios. El canal está formado por dos dominios transmembranales, dos dominios de unión a nucleótidos (NBD) y un dominio regulador (R), el cual requiere fosforilación para activarse. La apertura del canal depende de la unión de ATP en el sitio NBD lo que provoca la secreción de cloruro (7). Además, se ve involucrado en la modulación del pH extracelular por medio

de la secreción de HCO_3^- y en la regulación inhibitoria de los canales epiteliales de sodio (ENaC). Los defectos en la proteína CFTR y sus consecuencias en la patogenia de la enfermedad están relacionadas con los factores anteriormente mencionados.

La menor permeabilidad de cloruro hacia el medio extracelular, sumado a la entrada excesiva de sodio por una falta de inhibición de los ENaC, provoca una acumulación de electrolitos en el medio intracelular y la entrada de agua por efecto osmótico. Este fenómeno reduce la disponibilidad de agua en la luz de los epitelios, lo que provoca una constante deshidratación del moco, aumentando su espesor y provocando su acumulación. Además, la disminución en la secreción de HCO_3^- provoca un menor pH en el espacio luminal del epitelio (1, 8). El moco deshidratado causa la obstrucción de las vías afectadas y en el caso del pulmón, aumenta la susceptibilidad a infecciones. Además, la disminución del pH provoca la inhibición o pérdida de la actividad de los productos de secreción (enzimas, hormonas) (9).

En el páncreas ocasiona una constante inflamación y una destrucción progresiva, que culmina con fibrosis. Por otra parte, la ausencia de enzimas pancreáticas disminuye la absorción intestinal y provoca desnutrición. A su vez, el intestino queda obstruido y con una capacidad de absorción disminuida, lo que puede causar íleo meconio y el síndrome obstructivo del intestino distal contribuyendo aún más a la desnutrición (3). El sistema reproductivo se ve afectado, particularmente en hombres, causando infertilidad por defectos en el transporte de espermatozoides en el 95% de los pacientes. En mujeres esto se manifiesta como una reducción de la fertilidad.

El pulmón es uno de los órganos de mayor interés en el estudio de la fibrosis quística, pues las enfermedades respiratorias representan la principal causa de muerte en estos pacientes (2). La acumulación de moco en la vía aérea la hace susceptible a la colonización e infección por diversos agentes, siendo *Pseudomonas aeruginosa* el más común. La predisposición a infecciones y la constante respuesta inflamatoria ante éstas, provoca un daño al parénquima pulmonar haciéndolo más susceptible a las infecciones, generando así un ciclo de infección, inflamación y daño (10). Se presentan periodos recurrentes en los que los síntomas pulmonares son más marcados e incluyen tos

recurrente, producción de esputo, fatiga y pérdida de peso; estos periodos se denominan exacerbaciones pulmonares (PEX) y contribuyen a la pérdida de la función pulmonar (1).

1.3. Epidemiología

La fibrosis quística es la enfermedad genética más común en la población caucásica y se estima que existen cerca de 200,000 individuos con este padecimiento en el mundo. A pesar de ser inicialmente considerada una enfermedad relevante solo en la población caucásica, se ha observado un incremento en la frecuencia de ésta en otros grupos (11). En México, cada año nacen aproximadamente 300 niños con fibrosis quística, de los cuales se estima que el 85% fallecerá antes de los 4 años (12, 13). Los avances en la investigación relacionada a esta enfermedad han logrado extender la esperanza de vida de los pacientes hasta 30 años en países desarrollados. Este aumento de la calidad de vida está asociado principalmente a la disponibilidad de métodos de detección temprana y la accesibilidad al tratamiento, los cuales resultan ser de difícil obtención, especialmente en países en vías de desarrollo (10).

1.4. Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de la fibrosis quística en el recién nacido está incluido en el esquema de tamiz neonatal en México (12). Su detección se basa en los niveles aumentados de tripsinógeno inmunorreactivo, el cual no puede ser secretado por el páncreas. A pesar de esto se estima que hay más de 57,000 personas no diagnosticadas en todo el mundo (de un total aproximado de 160,000), especialmente quienes presentan variantes de baja frecuencia (11). El diagnóstico confirmatorio requiere la correlación clínica con los síntomas, la investigación del historial familiar y la evidencia de una disfunción de la proteína CFTR. La prueba del cloruro en el sudor es la más utilizada para evidenciar la actividad aberrante de CFTR; un resultado en el rango de 40-60 mmol/L es sugestivo, mientras que valores > 60 mmol/L son confirmatorios. Es importante considerar que cerca del 1% de los pacientes es negativo en esta prueba (1, 2).

El manejo de los pacientes con fibrosis quística involucra un monitoreo constante, especialmente en los primeros años de vida, por lo que se establecen clínicas de fibrosis quística en las cuales los pacientes son atendidos por un equipo multidisciplinario que incluye neumólogos especializados en esta enfermedad. El tratamiento se enfoca en contrarrestar las disfunciones multiorgánicas presentadas (1). Para el sistema gastrointestinal, se busca prevenir las obstrucciones utilizando laxantes osmóticos o enemas con diatrizoatos, además de la suplementación alimenticia, especialmente con vitaminas liposolubles, y reemplazo de enzimas pancreáticas para evitar la desnutrición (14).

Existe un grupo de fármacos denominados moduladores de CFTR para corregir los defectos de la proteína. El espectro de estos fármacos se ve limitado a variantes específicas, en las que existe una producción de CFTR. Dentro de este grupo destacan el ivacaftor y el lumacaftor (Orkambi), el primero aumenta el tiempo de apertura de CFTR, mientras que el lumacaftor facilita el transporte hacia la membrana. El ivacaftor, por sí solo, tiene efecto en algunos pacientes con mutaciones del tipo III. Cuando se administra en conjunto con lumacaftor, se utiliza como terapia para pacientes con mutaciones tipo II, que incluyen la variante más común. Otra opción es reemplazar lumacaftor por tezacaftor (Symdeko), ambas terapias se encuentran aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA). En la actualidad la terapia triple combinada es la más efectiva para pacientes mayores a 12 años y consta de elexacaftor, tezacaftor e ivacaftor (1).

Las estrategias utilizadas para tratar las manifestaciones pulmonares de los pacientes con fibrosis quística se enfocan en la hidratación y eliminación de moco, la reducción de la inflamación y en el control de las infecciones. Las secreciones son controladas mediante terapia con válvulas de aleteo, ventilación mecánica, compresiones asistidas, entre otros métodos. Para la inflamación, se ha propuesto el uso de antiinflamatorios como el ibuprofeno e inhibidores de la elastasa de neutrófilos (15, 16). Por su parte, el tratamiento con antibióticos y su vía de administración dependen en gran medida del objetivo y estado clínico del paciente. Los antibióticos inhalados como la tobramicina son utilizados en el tratamiento

crónico, mientras que la administración oral es empleada cuando se busca erradicar al microorganismo o durante las exacerbaciones pulmonares (17).

1.5. Colonización e infección de la vía aérea del paciente con fibrosis quística

Una gran diversidad de microorganismos puede infectar el aparato respiratorio de los pacientes con fibrosis quística y contribuir al daño pulmonar. Las bacterias son los patógenos más comunes aislados de la vía aérea, siendo *P. aeruginosa* la más frecuente, otras especies comunes son *Staphylococcus aureus*, algunos miembros del complejo *Burkholderia cepacia*, *Achromobacter xylosoxidans* y *Stenotrophomonas maltophilia*. En cuanto a los hongos, *Aspergillus* spp. son los más comunes, particularmente en pacientes adultos y en menor medida, *Scedosporium* spp. y *Candida* spp. Las infecciones virales contribuyen en gran medida a las exacerbaciones pulmonares y destacan el virus respiratorio sincitial, virus de la influenza y parainfluenza (18) (19, 20). En los primeros años, los pacientes presentan infecciones principalmente por *S. aureus* o *Haemophilus influenzae*, mientras que *P. aeruginosa* tiende a dominar en infecciones crónicas, y se mantiene como un colonizador en etapas tempranas. En un inicio, se puede tener una gran diversidad de microorganismos colonizando la vía aérea, pero esta disminuye a medida que el paciente es sometido al tratamiento antibiótico y progresa al establecimiento de la infección crónica. Además, los microorganismos juegan un rol importante en la selección y disminución de la diversidad, pues al igual que los neutrófilos del pulmón, secretan péptidos antimicrobianos (10, 21).

2. *Pseudomonas aeruginosa*

2.1. Aspectos generales

P. aeruginosa pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*. Son bacilos Gramnegativos, monoflagelados y al contrario de otras especies, presentan crecimiento a 42°C. Su comportamiento *in vitro* es fácilmente estudiado, ya que crece adecuadamente en medios nutritivos y selectivos de rutina, como el agar sangre o MacConkey. Algunas de sus características son la β -hemólisis, la pigmentación, la motilidad y la actividad de oxidasa. Son microorganismos ubicuos, no fermentadores, considerados aerobios, pero con la capacidad de crecer en anaerobiosis utilizando vías alternativas. Están presentes en una gran

variedad de ambientes y tienen la capacidad de colonizar e infectar plantas, animales y humanos. Su genoma es relativamente grande y variable, encontrándose en un rango de 5.5-7 Mb y un contenido de GC de 65-67%. Las infecciones causadas por este microorganismo son oportunistas, generalmente en pacientes inmunocomprometidos o bajo tratamiento antibiótico. Tienden a causar infecciones en el tracto respiratorio, heridas, tracto urinario y septicemia. Un nicho moderno para este microorganismo es el ambiente hospitalario, ya que puede colonizar el equipo médico como máquinas de ventilación y máquinas de diálisis, así como estar presente en el personal de salud (18) (22) (23).

2.2. Factores de virulencia

P. aeruginosa presenta una gran variedad de factores de virulencia que facilitan el establecimiento de infección o colonización:

- Adhesinas: existen diferentes estructuras que funcionan como adhesinas, entre las cuales se encuentran los pilis de tipo IV, los flagelos y el oligosacárido central del lipopolisacárido (LPS). Todos estos factores facilitan su adherencia a las células epiteliales, principalmente a través de la interacción con mucinas o proteínas extracelulares. Además, el alginato capsular actúa como una adhesina cuando es expresado.
- Toxinas: una gran diversidad de toxinas con diferente actividad y perfil de expresión se ven involucradas en la infección y daño al hospedero.
 - Endotoxina A: provoca la disminución en la síntesis de proteínas por inhibición ribosomal.
 - Pigmentos: la mayoría de las cepas produce al menos un pigmento y presentan diferente actividad, la piocianina (azul) y la pioverdina (verde) son los más comunes. El primero promueve la toxicidad mediada por especies reactivas de oxígeno, mientras que la pioverdina es un sideróforo.
 - Elastasas: LasA y LasB son dos proteasas capaces de degradar la elastina, la cual forma parte de varios tejidos conectivos, destacando el pulmonar. Además, interfieren con la señalización en el reclutamiento de neutrófilos.
 - Fosfolipasa C: hemolisina capaz de degradar lípidos facilitando la migración.

- Proteasa alcalina: metaloproteasa de zinc capaz de activar los canales epiteliales de sodio (ENaC), contribuyendo aún más a la fisiopatología. Además, es capaz de degradar el interferón gamma, inhibiendo la respuesta inmunológica.
- Exoenzimas: toxinas extracelulares que son introducidas a las células epiteliales por medio de sistemas de secreción. Inhiben la formación de microfilamentos de actina.
- Sistemas de secreción: *P. aeruginosa* tiene la capacidad de inyectar toxinas directamente en las células. Esto es posible por la presencia de diferentes sistemas de secreción que introducen componentes al citoplasma de las células del huésped. El sistema de secreción tipo 3 (T3SS) es el más relevante en *P. aeruginosa*. Se reconocen cuatro proteínas principales: ExoS, ExoT, ExoU y ExoY, las cuales comparten una alta homología con los flagelos. A la fecha se han descrito hasta 6 diferentes tipos de sistemas de secreción en *P. aeruginosa*.
- Alginato: este componente es un polímero del ácido D-manurónico y ácido L-glucurónico. Además de formar parte de la cápsula que brinda protección contra la fagocitosis y otros componentes tóxicos, facilita el establecimiento de la vida en biopelícula. Su sobreproducción se ha asociado a la expresión de otros factores como el T3SS. Este producto se ve regulado por el operón *alg*, que consta de proteínas involucradas en la síntesis de precursores, polimerización, transporte, modificación y exportación.
- Formación de biopelícula: la biopelícula es una estructura altamente organizada compuesta en su mayoría por una matriz de polisacáridos, en los que se ven involucrados los loci *psl* y *pel*. El locus *psl* está involucrado en la producción de carbohidratos ricos en manosa, los cuales tienen funciones de comunicación e interacción célula. Por su parte, el grupo de genes *pel* está involucrado en la síntesis de componentes ricos en glucosa con características no mucosas. Otro componente de esta matriz es el DNA extracelular (eDNA), que contribuye a la viscosidad de la

biopelícula. Este factor confiere resistencia a una gran variedad de toxinas, incluyendo antibióticos y efectores inmunológicos (22-25).

2.3. Resistencia a los antibióticos

P. aeruginosa presenta resistencia intrínseca para un amplio espectro de antibióticos. Esto se debe principalmente a la baja permeabilidad de su membrana, ya que es hasta 100 veces menos permeable comparada con especies como *Escherichia coli*. La arquitectura típica de las membranas gramnegativas sumado a la regulación en el sistema de porinas y la presencia de bombas de eflujo en conjunto le confieren esta propiedad. Esto les brinda resistencia a aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina y amikacina), polimixinas (colistina) y quinolonas (ciprofloxacino y levofloxacino). Sumado a esto, la producción de β -lactamasas facilita la degradación de diversas penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos (26).

Además de tener mecanismos de resistencia intrínseca, como los mencionados anteriormente, *P. aeruginosa* es capaz de adquirir resistencia en respuesta a estímulos estresantes, principalmente la antibioticoterapia. Esto puede ocurrir por mecanismos de adquisición propiamente dichos o a través de la adaptación, los cuales involucran cambios en la expresión génica. En el primer caso, los genes de resistencia se adquieren por transferencia horizontal, ya sea a través de mecanismos de transformación, transducción o conjugación. Estos mecanismos se ven mayormente asociados a la resistencia mediada por betalactamasas, principalmente de la clase B, o enzimas modificadoras de aminoglucósidos. En cuanto a los mecanismos de resistencia adquirida, la bacteria cuenta con mecanismos que son expresados después de que se tiene contacto con el estímulo estresor. Esto puede suceder a través de mecanismos de regulación transcripcional propios o por selección de clones mutantes.

La adquisición de mutaciones en porinas o su subexpresión reducen aún más la permeabilidad de la membrana a compuestos específicos. Este efecto se ve exacerbado por la sobreexpresión de bombas de eflujo, que expulsan compuestos desde el interior de la célula hacia el espacio extracelular. Además, la modificación de las dianas moleculares de

antibióticos, como los aminoglucósidos (subunidad rRNA 30S) y quinolonas (topoisomerasas), contribuyen a la resistencia. Un mecanismo de resistencia adaptativa de vital importancia en *P. aeruginosa* es la formación de biopelícula.

La vida en biopelícula confiere una protección contra los antibióticos debido a la baja permeabilidad a estos, lo que permite mantener la viabilidad de cepas que carecen de otros mecanismos de resistencia. Las células en biopelícula tienden a mostrar una baja tasa metabólica. Dado que la mayoría de los antibióticos están dirigidos a impedir o disminuir procesos fisiológicos normales, su actividad se ve afectada indirectamente (27). Dentro de esta estructura existen diversas poblaciones celulares, destacando las células persistentes, las cuales presentan una alta tolerancia a antibióticos, principalmente por ser metabólicamente inactivas. Ante una disminución considerable en la población de la biopelícula, son capaces de cambiar su perfil transcriptómico y repoblar esta estructura (24, 26, 28).

3. Secuenciación de próxima generación

3.1. Fundamentos y aplicaciones

Las técnicas de secuenciación de próxima generación más utilizadas se dividen en dos grandes grupos: las de segunda generación, que se caracterizan por realizar lecturas cortas y requerir un proceso de amplificación, y las de tercera generación, que no necesitan una amplificación previa y realizan lecturas largas. En general, ambas tecnologías proporcionan información similar, pero la segunda generación tiende a requerir un tiempo de procesamiento más largo antes de la secuenciación propiamente dicha, mientras que la tercera generación es considerablemente más rápida, aunque con una mayor tasa de error, el cual disminuye progresivamente (29).

Estas tecnologías tienen aplicaciones en las áreas de la genómica, transcriptómica y epigenómica. Dentro del área genómica destaca la secuenciación de genoma completo y la secuenciación de exoma. En esta última, se obtiene información sobre la porción codificante del genoma (aproximadamente 2%). La secuenciación de exoma es útil en el estudio de enfermedades genéticas y cáncer. Otra modalidad es la secuenciación dirigida, en la que se aíslan regiones específicas del genoma por diversos métodos para posteriormente ser

secuenciadas. Por otra parte, en el área de la transcriptómica, se aplica a ensayos de expresión génica por secuenciación de RNA total (RNA-seq) o dirigida. Además, permite el estudio de RNA's cortos (18-22 pb). Finalmente, en la epigenómica se pueden incluir los ensayos de secuenciación de metilación empleando el método de bisulfito. Este grupo incluye ensayos basados en la separación de proteínas que interactúan con el DNA o el RNA, así como la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-Seq) o la separación de ribosomas (30).

3.2. Tecnología Illumina

La tecnología de secuenciación de Illumina ha sido una de las más utilizadas en estudios de secuenciación de genoma completo. El proceso de secuenciación engloba tres fases: preparación de biblioteca, secuenciación masiva en paralelo y análisis de datos. La primera etapa consiste en la generación de biblioteca, que involucra la preparación del material genético de interés para ser secuenciado, la cual se realiza fragmentándolo y añadiendo adaptadores en ambos extremos. Estos adaptadores son secuencias de DNA complementarias a oligonucleótidos en la celda de secuenciación, lo que permite su unión a ésta. Posteriormente, las bibliotecas se introducen en la celda, donde cada secuencia será amplificada nucleótido por nucleótido, con un paso intermedio de terminación. Los nucleótidos utilizados para elongar la cadena están marcados por fluorescencia, por lo que al añadir cada nucleótido se generará un color específico en los grupos de secuencias amplificadas (clusters), según el nucleótido añadido (31). El equipo registra la fluorescencia generada cada vez que la polimerasa añade un nucleótido, se remueven los terminadores, y continúa con la amplificación. Estas señales son procesadas por el equipo para identificar las secuencias correspondientes y obtener datos de calidad. El resultado del procesamiento son archivos en formato FASTQ, que contienen las lecturas crudas y la calidad de lectura de cada base.

Existen dos modalidades de secuenciación según la cantidad de las lecturas por secuencia. La secuenciación en un solo extremo (“single-end”) son la forma más sencilla de emplear esta tecnología, sin embargo, su aplicación es más útil en ensayos de RNA-seq o ChIPseq (31, 32). La secuenciación por ambos extremos (“paired-end”) permite obtener

datos de la secuencia en ambos extremos del fragmento analizado. Esto facilita el posterior alineamiento de las secuencias y facilita la identificación de reordenamientos en el DNA. La secuenciación por ambos extremos generará dos archivos de lecturas, uno para cada sentido de lectura. Esta modalidad resulta adecuada para estudios de secuenciación de genoma completo, particularmente en los que se requiere un ensamblaje *de novo* (33).

3.3. Secuenciación de genoma completo

La secuenciación de genoma completo ha sido utilizada en diversas áreas en los últimos años. En este enfoque, se obtiene la secuencia completa del DNA presente en una muestra para realizar un análisis integral que considera tanto sus propiedades estructurales (secuencia) como su relación funcional. Las técnicas de secuenciación de próxima generación destacan por su alta reproducibilidad, robustez y capacidad para generar una cantidad masiva de datos. Además, son cada vez más accesibles en comparación con la secuenciación de primera generación por el método de Sanger (34, 35).

Las técnicas de secuenciación de próxima generación han sido de gran utilidad en el estudio de genomas procariotas, particularmente en el área de la genómica y la transcriptómica. La constante mejora en la accesibilidad de estas técnicas ha posibilitado su aplicación no solo en investigación, si no también en el área clínica. El procesamiento de los datos crudos con herramientas bioinformáticas permite obtener una gran cantidad de información. Dentro de estas, se destaca la genotipificación, que permite establecer la relación entre aislamientos basándose en su perfil de tipificación de secuencias multi-locus. (MLST) o de polimorfismos de un solo nucleótido. Además, permite analizar y predecir el comportamiento de los genes asociados a la producción de factores de virulencia (viruloma) y de resistencia a antibióticos (resistoma) (35).

La secuenciación de genoma completo permite el estudio a detalle de la diversidad bacteriana, intra o interespecie. El análisis genómico se enfoca particularmente en analizar los genes presentes para predecir o explicar manifestaciones fenotípicas. Además, el análisis de la posición y orden genómico es de utilidad en el estudio de operones e islas genómicas, así como en la identificación de variaciones estructurales (36). Estas técnicas han facilitado

los estudios en genómica comparativa y epidemiología genómica, donde se investiga la evolución de los microorganismos, incluyendo mutaciones, inserción de elementos móviles, transferencia horizontal de genes, para comparar y relacionar diferentes aislamientos. En el área epidemiológica, resulta de gran utilidad para la identificación y el manejo dirigido de brotes, así como en el estudio de cadenas de transmisión y sus reservorios (37).

La tecnología más empleada para la secuenciación de genomas bacterianos es Illumina, especialmente en estudios de vigilancia epidemiológica, pero en años recientes se ha visto un incremento en el uso de las tecnologías de tercera generación, particularmente PacBio. Las técnicas que utilizan lecturas cortas han sido ampliamente adoptadas debido a su capacidad para proporcionar una alta profundidad y cobertura, además de contar con procesos de análisis bien establecidos. A pesar de esto, las tecnologías de tercera generación siguen mejorando y esto se refleja en un aumento constante en su uso, tanto de manera individual como en combinación con tecnologías de segunda generación para mejorar la cobertura, profundidad y exactitud (29, 35, 38).

3.4. Análisis bioinformático

3.4.1. Análisis bioinformático “clásico” o manual

Los datos generados a través de las tecnologías de secuenciación requieren softwares altamente especializados para su análisis. El objetivo principal de estos es, en un inicio, ensamblar los datos crudos para generar una secuencia de DNA, para posteriormente extraer y predecir información a partir de esta (39). El ensamble de los datos crudos es el primer paso en el análisis bioinformático y el resultado final es una o varias secuencias de DNA denominadas “contigs” (secuencias contiguas) en formato de texto (FASTA). Para esto, existen diversas herramientas, destacando SPADES, VELVET, CANU y UNICYCLER (38). En el caso de los ensamblados *de novo*, es necesario realizar un posterior alineamiento con un genoma de referencia y una anotación para ordenar las secuencias generadas, que permitan identificar los genes presentes, respectivamente. Mauve y Artemis son dos algoritmos comunes empleados para el alineamiento, mientras que las anotaciones del genoma son generalmente realizadas con Prokka o RAST.

Para el análisis bioinformático de genomas bacterianos es común utilizar estrategias de MLST, en el que se analiza el perfil alélico de varios genes para establecer relaciones entre cepas (40, 41). Además, el análisis de genes relacionados a la farmacorresistencia (resistoma) y factores de virulencia (viruloma) son procedimientos comunes. El resistoma brinda datos del posible fenotipo ante agentes antimicrobianos específicos e implica el alineamiento de la secuencia de interés con bases de datos como ResFinder o CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database). A su vez, el análisis de los factores de virulencia implica un alineamiento contra bases de datos como la VFDB (Virulence Factor Database). En conjunto, estos análisis permiten entender y estudiar los mecanismos de patogénesis y resistencia en la clínica (40, 42). Un complemento fundamental para la validación inicial de resultados obtenidos a partir de las técnicas bioinformáticas son las pruebas fenotípicas (39).

3.4.2. Análisis bioinformático automatizado

El software EpiSeq CS permite aplicar varias herramientas bioinformáticas en tiempos relativamente cortos, partiendo de datos crudos o ensamblados. Este software desarrollado por la compañía BioMérieux (Marcy l'étoile, Francia) puede aplicarse en los patógenos más comunes asociados a la atención sanitaria, incluyendo a *P. aeruginosa*. Dentro de sus funciones destacan el ensamblado y reporte de genomas (para datos crudos), análisis epidemiológico, análisis individual y comparativo del resistoma como del viruloma, además de la tipificación por diversos métodos y la identificación de plásmidos. En conjunto, estas herramientas permiten identificar las relaciones entre distintas cepas, detectar cambios en el resistoma y viruloma, predecir fenotipos de resistencia, así como identificar y establecer la función de los posibles plásmidos presentes (43, 44).

ANTECEDENTES

Se ha observado que *P. aeruginosa* tiende a mostrar un comportamiento clonal en pacientes con fibrosis quística, es decir, una cepa específica permanece a lo largo de la vida del paciente (20). El potencial de adaptación de esta bacteria favorece su establecimiento crónico en estos pacientes, y a lo largo del tiempo se han identificado patrones compartidos por cepas provenientes de pacientes con fibrosis quística. Estos cambios pato-adaptativos se han elucidado empleando estudios de genómica comparativa de aislamientos longitudinales y en general, revelan una tendencia a la selección de cepas con una menor producción de factores de virulencia, adaptadas a la vida en biopelícula y con fenotipos de multidrogorresistencia (10, 45, 46).

La hipermutabilidad o fenotipo mutador es considerada un factor determinante en la adaptación de *P. aeruginosa* al microambiente pulmonar, ya que favorece la selección de mutaciones que promueven el establecimiento a largo plazo (47). Existen varios mecanismos por los cuales una cepa adquiere este fenotipo. El principal son las mutaciones de pérdida de función en las proteínas que participan en la reparación del DNA (*mutT*, *mutY*, *mutM*) y en menor medida en los genes asociados a la prevención de mutaciones, es decir, la maquinaria de reparación del DNA, particularmente por identificación de bases mal apareadas (*ahpF*, *radA*, *mfd*). La mayor acumulación de mutaciones de cambio de sentido en comparación con mutaciones de pérdida de sentido o sinónimas sugiere un mecanismo de selección positiva. En la gran mayoría de los casos, se seleccionan mutaciones que resultan en la pérdida de la función de factores de virulencia, como los sistemas de quorum, la motilidad, los sistemas de secreción y el antígeno-O (48). En general, la hipermutabilidad facilita la adquisición de factores que favorecen la adaptación y, simultáneamente, pérdida de los factores que, de estar presentes, limitarían la permanencia. Este fenómeno se ha observado particularmente en cepas multidrogorresistentes (49, 50) y con transiciones mucoides, en las que hay una sobreproducción de alginato (10, 50).

El alginato es un exopolisacárido aniónico formado por ácido β -D-manurónico y ácido α -glucorónico y está fuertemente relacionado con la transición mucoide y la vida de biopelícula. La presencia de este componente sumado al ambiente mucoso de la vía aérea en

el paciente con fibrosis quística provoca una mayor obstrucción y deterioro de la función pulmonar. Las cepas mucoides de *P. aeruginosa*, en su mayoría, se caracterizan por presentar una expresión constitutiva de los genes relacionados con la producción de alginato. Uno de los genes con mayor frecuencia de mutaciones es *mucA*, el cual actúa como un represor para la biosíntesis de este componente. Una sobreproducción de alginato brinda ventajas como la baja permeabilidad a antibióticos, resistencia a la fagocitosis y una disminución en la producción de factores de virulencia (10, 21, 23).

JUSTIFICACIÓN

La fibrosis quística compromete la función pulmonar, lo que aumenta la susceptibilidad de los pacientes a las infecciones pulmonares crónicas.

Una gran variedad de microorganismos coloniza e infecta la vía respiratoria de los pacientes con fibrosis quística, entre ellos *P. aeruginosa* es el más común. El tratamiento con antibióticos, la interacción con el sistema inmunológico, y la capacidad de adaptación de *P. aeruginosa* favorecen la selección de cepas de difícil eliminación.

Existe poca información sobre los cambios adaptativos y la correlación con cambios fenotípicos de *P. aeruginosa* en la vía respiratoria en pacientes con fibrosis quística a lo largo del tiempo. El estudio de estos cambios permitirá tener una mejor comprensión de estos procesos y aportará información para el desarrollo de estrategias más efectivas para controlar las infecciones pulmonares crónicas asociadas a esta enfermedad.

HIPÓTESIS

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística presentan características genómicas y fenotípicas que reflejan una evolución dirigida al establecimiento a largo plazo.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

Describir los cambios genómicos y fenotípicos adaptativos de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de pacientes con fibrosis quística.

2. Objetivos específicos

- 2.1. Obtener las lecturas crudas de secuenciación de genoma completo de aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes con fibrosis quística.
- 2.2. Obtener, analizar y comparar los genomas utilizando herramientas bioinformáticas.
- 2.3. Caracterizar los cambios fenotípicos relacionados a la adaptación observados en *P. aeruginosa*.
- 2.4. Evaluar la expresión de genes involucrados en la adaptación.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

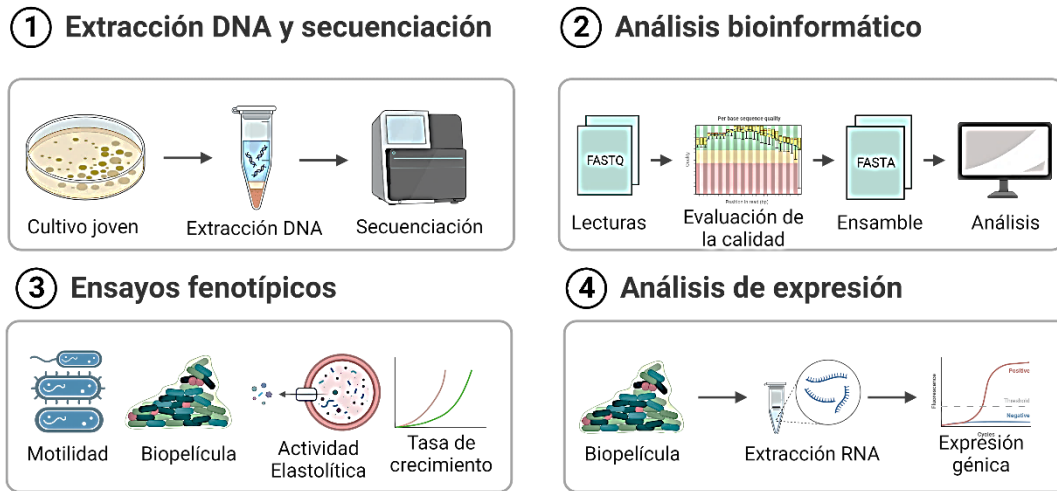


Figura 1: Estrategia experimental general

Para la selección de las muestras se partió de una colección de cepas del laboratorio de microbiología molecular y se siguió la estrategia general que se muestra en la Figura 1. Las muestras incluidas son: aislamientos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes con fibrosis. Las muestras crio-preservadas fueron sembradas en agar MacConkey para la posterior extracción de DNA, el cual fue enviado a un servicio externo para realizar una secuenciación de genoma completo por la tecnología Illumina. Los datos crudos de secuenciación fueron procesados realizando una limpieza con TrimGalore (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>; accedido el 07/12/2023), se evaluó la calidad con FASTQC (<https://github.com/s-andrews/FastQC>; accedido el 07/12/2023) y se ensamblaron con Unicycler (<https://github.com/rrwick/Unicycler>; accedido el 07/12/2023). Los ensamblados fueron introducidos en diversas herramientas bioinformáticas para su análisis. Se realizaron pruebas fenotípicas de motilidad por contracción (Twitching) y motilidad dependiente de flagelo (nado/swimming y swarming). Además, se evaluó la tasa de crecimiento específica, la capacidad de producción de biopelícula y la actividad elastolítica. Finalmente, se evaluó la expresión de genes relacionados a la adaptación por PCR en tiempo real y utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y el gen *rpoS* como normalizador.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Selección de aislamientos.

A partir de una colección de cepas del laboratorio de microbiología molecular criopreservadas a -80°C en caldo soya-tripticasa (MCD LAB) con 15% glicerol, se seleccionaron 39 aislamientos de *P. aeruginosa* provenientes de 11 pacientes con fibrosis quística. Siete pacientes contribuyeron con aislamientos únicos, mientras que en cuatro pacientes se incluyeron múltiples aislamientos recolectados a lo largo del tiempo (longitudinales) ($n=19$, $n=6$, $n=5$ y $n=2$). Todos los aislamientos incluidos fueron obtenidos en un periodo del año 2013 al 2023.

2. Extracción de DNA.

Se inocularon placas de agar MacConkey con 20-30 μL de las cepas en medio de criopreservación y se incubaron por 24 horas a 37°C . Posterior a la incubación, se resuspendieron 3-4 colonias del cultivo en 200 μL de Tris-HCl 100 mM, se añadieron 150 μg de lisozima (VWR Life Science, Pensilvania, Estados Unidos). Se incubó a 37°C por 2 horas y posteriormente se añadieron 200 μL de TE 1X con SDS al 1% y 6 μL de proteinasa K (10 mg/mL) (Promega, Wisconsin, Estados Unidos) y se incubó por 2 horas a 55°C . Posterior a la lisis, se añadieron 250 μL de fenol saturado (Sigma-Aldrich), 250 μL SEVAG (Cloroformo-alcohol isoamílico 24:1) (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos), 100 μL TE 1X y se agitó por 5 minutos. Las fases fueron separadas por centrifugación a 14000 rpm durante 8 minutos. La fase acuosa fue recuperada y se repitió el proceso de extracción-centrifugación; se precipitó el material genético utilizando 2.33 volúmenes de etanol absoluto (Sigma-Aldrich) y éste fue refrigerado a -20°C por 1 hora. Finalmente, el precipitado fue centrifugado por 5 minutos a 14000 rpm, el sobrenadante fue decantado y la pastilla de DNA fue lavada 2 veces con etanol al 70% (Sigma-Aldrich) y centrifugada por 5 minutos a 14000 rpm. Posterior a esto, el etanol fue decantado y la pastilla fue secada a temperatura ambiente.

El material genético resultante fue resuspendido en 50 μL TE 1X y calentado a 65°C por 15 minutos en un baño seco "Accu-block" (Labnet, Nueva Jersey, Estados Unidos). Se

evalúo la calidad de éste por espectrofotometría UV-visible en un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos), considerando como aceptables las características que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 parámetros de calidad para el DNA extraído por el método de fenol-cloroformo.

Característica	Rango aceptable
Concentración DNA	> 20 ng/ μ L
Relación λ 260/280	1.8-2.0
Relación λ 260/230	1.8-2.2

3. Secuenciación de genoma completo.

La secuenciación de genoma completo fue realizada por un servicio externo (Novogene, Tianjin, China). En el proceso de este servicio se verificó la calidad del material genético por fluorescencia en un equipo Qubit y su integridad fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa 1% (100 v por 40 minutos).

Para la construcción de las bibliotecas, el DNA fue fragmentado y ligado a adaptadores, posteriormente fue amplificado por PCR y su calidad fue verificada utilizando fluorometría usando el equipo Qubit y PCR en tiempo real. Las bibliotecas generadas fueron secuenciadas en un equipo Illumina NovaSeq 6000 con lecturas pareadas de 150 pb.

4. Procesamiento bioinformático.

4.1 Limpieza de las lecturas y ensamble de genomas.

Las lecturas crudas de secuenciación fueron descargadas desde la plataforma de Novogen. En un primer paso fueron procesadas utilizando el programa TrimGalore v0.4.4_dev (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>; accedido el 07/12/2023) (51) para eliminar las secuencias de adaptadores y se utilizó la opción --fastqc para generar reportes de calidad (software FastQC v0.11.7 (52) y --retain_unpaired. Se procedió al ensamble de los genomas utilizando el software Unicycler v0.4.9b (<https://github.com/rwick/Unicycler>;

accedido el 07/12/2023) (53) y la calidad de los contigs generados fue evaluada empleando la herramienta de anotación de genomas del centro de recursos bioinformáticos de virus y bacterias (BV-BRC), la cual utiliza el software CheckM (<https://github.com/Ecogenomics/CheckM>; accedido el 07/12/2023) (54). Los genomas fueron anotados usando Prokka v1.14.6 (<https://github.com/tseemann/prokka>; accedido el 07/12/2023) (55)

4.2 Análisis de resistoma, viruloma y MLST.

Los genomas fueron analizados utilizando el software EpiSeq CS (<https://www.biomerieux-episeq.com/cs>; consultado el 07/12/2023) para estudiar el resistoma, viruloma, tipificación de secuencias multi locus de genoma completo (wgMLST) y MLST.

4.3 Análisis filogenético basado en variantes.

Se utilizó el software Snippy v4.6.0 (<https://github.com/tseemann/snippy>; consultado el 07/12/2023) (56) para alinear las lecturas crudas de secuenciación al genoma de la cepa de referencia PAO1 (número de acceso de GenBank GCF_000006765.1) y hacer un llamado de variantes a partir de estos y obtener un alineamiento de los genomas consenso generados. Los alineamientos fueron analizados con el software RAxML v8.2.12 (<https://github.com/amkozlov/raxml-ng>; accedido el 07/12/2023) (57) el software fue ejecutado como se describe a continuación: `raxmlHPC-PTHREADS-AVX2 -T 4 -m GTRCAT -p 1234`. Los árboles filogenéticos resultantes fueron enraizados en un punto de distancia medio y fueron exportados en formato newick.

4.4 Análisis de variantes.

Para analizar la cantidad de variantes acumuladas durante el periodo de observación, se utilizó Snippy v4.6.0 (<https://github.com/tseemann/snippy>; accedido el 07/12/2023) para

alinear las lecturas crudas de secuenciación del último aislamiento de los pacientes con seguimiento longitudinal contra el genoma anotado del primer aislamiento (ancestro) de estos y generar archivos de variantes.

4.5 Análisis de pangenoma.

Para el análisis de pangenoma se utilizó el flujo de trabajo de pangenoma del software Anvi'o descrito por los creadores del software, el cual utiliza diversos programas para realizar una predicción de las proteínas en cada uno de los genomas y un alineamiento de estas (<https://merenlab.org/2016/11/08/pangenomics-v2/#generating-an-anvio-genomes-storage>, accedido el 26/05/2024). Los pangenomas resultantes fueron visualizados con la herramienta “anvi-display-pan” y se seleccionó el genoma accesorio manualmente, para posteriormente utilizar la herramienta “anvi-split” y generar un archivo exclusivo del genoma accesorio. Para calcular el contenido de genes accesorios según su categoría funcional, estas fueron extraídas de cada columna y contadas con Excel, en caso de existir más de una anotación funcional por gen, se tomaron en cuenta ambos para este conteo.

5. Ensayos de motilidad.

5.1.1. Twitching.

Para evaluar la motilidad por contracción se partió de cultivos de 24 horas a 37°C en agar LB (Condalab, Madrid, España) al 1%. Se tomó una colonia utilizando un palillo de madera estéril y se inoculó en el fondo de una placa de agar LB al 1% y se incubó por 24 horas a 37°C. Posterior a la incubación, las placas fueron cubiertas con una solución de revelado de agua metanol (CTR Scientific, Monterrey, México) y ácido acético glacial (CTR Scientific) (40:50:10) durante 30 minutos para facilitar la observación y medición de la colonia intersticial.

5.2.Motilidad tipo swarming.

Para evaluar la motilidad por nado se empleó agar LB (Condalab) al 0.5% adicionado con glucosa 0.2% (Sigma-Aldrich), hidrolizado de caseína 0.5% (Sigma-Aldrich), MgSO₄ 1 mM (Analytika, Monterrey, México), KH₂PO₄ 1.5% (Monterrey Reactivo Analítico, Monterrey, México), Na₂HPO₄ 3% (Monterrey Reactivo Analítico) y NaCl 0.05% (CTR Scientific). Partiendo de cultivos jóvenes en agar LB 1%, se realizaron suspensiones bacterianas equivalentes a un 0.5 en la escala de McFarland en caldo LB. Se depositaron 2.5 µL de esta suspensión en la superficie de agar LB al 0.5% adicionado y se incubó a 37°C por 24 horas para la observación de resultados.

5.3.Motilidad por nado (Swimming).

Para evaluar la motilidad por nado y tipo swarming se empleó agar LB (Condalab) al 0.3% adicionado con glucosa 0.2% (Sigma-Aldrich), hidrolizado de caseína 0.5% (Sigma-Aldrich), MgSO₄ 1 mM (Analytika), KH₂PO₄ 1.5% (Monterrey Reactivo Analítico), Na₂HPO₄ 3% (Monterrey Reactivo Analítico) y NaCl 0.05% (CTR Scientific). Partiendo de cultivos jóvenes en agar LB 1%, se realizaron suspensiones bacterianas equivalentes a un 0.5 en la escala de McFarland en caldo LB. Un palillo de madera estéril fue sumergido en esta suspensión y fue utilizado para inocular la placa de agar LB al 0.3% adicionado y se incubó a 37°C por 24 horas. Posteriormente, se realizó una medición del halo de crecimiento dentro del agar.

6. Evaluación de la tasa de crecimiento específica (µ).

Partiendo de cultivos de 24 horas 37°C en agar LB al 1%, se prepararon suspensiones bacterianas equivalentes a un 0.25 en la escala de McFarland en caldo Mueller-Hinton y 200 µL de estas suspensiones fueron transferidos a una microplaca de 96 pozos estéril. La placa fue incubada a 37°C en un lector de placas Cytation 1 (BioTek) y se registró la densidad óptica a 600 nm (OD600) cada 5 minutos durante 24 horas. La placa fue agitada por 10 segundos en cada lectura.

Los datos fueron graficados y se tomó en cuenta solo la fase exponencial, se obtuvo el logaritmo natural (Ln) de las lecturas para generar una curva de Ln OD600 vs tiempo, en donde la pendiente de ésta corresponde a la tasa de crecimiento específica (μ). A manera de comparación con un aislamiento proveniente de un paciente sin fibrosis quística se utilizó la cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853.

7. Evaluación de la producción de biopelícula.

Partiendo de cultivos de 24 horas 37°C en agar LB al 1% se prepararon suspensiones bacterianas equivalentes a un 0.5 en la escala de McFarland en solución salina (0.86%) estéril y 20 μ L de estas suspensiones fueron transferidos a una microplaca de 96 pozos estéril de fondo plano que contenía 180 μ L de caldo soya-tripticosa con glucosa (1%). Las placas fueron selladas con papel parafilm e incubadas por 24 horas a 37°C. Posteriormente, la fase líquida fue decantada para eliminar las células planctónicas y la biopelícula fue lavada tres veces con 200 μ L de PBS estéril. La biopelícula fue fijada con 200 μ L de metanol absoluto durante 20 minutos a temperatura ambiente y a 60°C por una hora en un horno seco 1330 GX (Shell Lab). Una vez fijada, se añadieron 200 μ L de cristal violeta al 0.1% (CTR Scientific) y se retiró después de 15 minutos, para ser finalmente lavada 5 veces con 200 μ L de agua destilada estéril y se dejó secar toda la noche. Para su evaluación espectrofotométrica, se añadieron 200 μ L de ácido acético al 30% (CTR Scientific) a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos, para finalmente evaluar la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Cytation 1. Los aislamientos fueron clasificados como no productores, productores de biopelícula: débiles, moderados o fuertes, según los criterios establecidos en la Tabla 2:

Tabla 2: Parámetros para la clasificación de aislamientos productores de biopelícula.

Categoría	Criterio
No-productor	$OD < OD_c$
Productor débil	$OD_c < OD < 2OD_c$
Productor moderado	$2OD_c < OD < 4OD_c$
Productor fuerte	$4OD_c < OD$

OD_c = densidad óptica a 600 nm del control negativo.

OD_c = OD_c + 3 SD (desviación estándar).

8. Pruebas de susceptibilidad.

Partiendo de cultivos de 24 horas en agar MacConkey, se realizaron suspensiones bacterianas equivalentes a un 0.5 en la escala de McFarland para inocular paneles AST-N402 e introducirse en un equipo VITEK-2 (Biomérieux). Los resultados fueron interpretados de acuerdo con lo establecido por el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2023).

9. Expresión de genes involucrados en la adaptación.

9.1 Selección de genes y diseño de primers.

Partiendo de lo reportado por Camus *et al.* (46) se realizó una selección de los genes con las siguientes características: (a) diferencialmente expresados al comparar aislamientos clonales recientes y viejos de *P. aeruginosa* aislados del mismo paciente, (b) diferencialmente expresados al compararse con la cepa de referencia PAO1, la cual es un aislamiento no respiratorio y (c) el mantenimiento de esta expresión diferencial tanto *in vivo* como *in vitro*. Se seleccionaron tres genes relacionados al sistema de secreción tipo VI: *icmF*, *pppA* y *hcp-1*. Se seleccionó el gen *rpoS* como endógeno, utilizando los primers reportados por Savli *et al.* (58). Partiendo de los ensamblajes generados en objetivos anteriores, se extrajeron las secuencias de los genes de interés utilizando el software BLAST+ (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/doc/blast-help/downloadblastdata.html> accedido el 07/12/2023) y fueron alineadas utilizando MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>; consultado el 07/12/2023) para identificar las regiones compartidas entre estas y diseñar primers universales para la población de estudio.

Las secuencias fueron verificadas utilizando herramientas de Integrative DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/pages>) para verificar la ausencia de formación dímeros de primers y estructuras secundarias, además se utilizó la herramienta de PCR *in silico* (59) para verificar la especificidad de estos. Las secuencias se encuentran detalladas en el anexo 1 y fueron sintetizadas por la compañía T4 Oligo (Guanajuato, México).

9.2 Extracción de RNA partiendo de biopelícula.

Para el análisis de expresión de genes utilizó el modelo de biopelícula del objetivo anterior, realizando la modificación de un tiempo de incubación de 48 horas para asegurar la maduración de la biopelícula y una adecuada recuperación de biomasa. Se emplearon 12 pocillos por muestra (por duplicado en días separados), posterior al lavado con PBS 1X estéril se añadieron 100 μ L de PBS 1X estéril a cada pocillo y la biopelícula fue resuspendida en este volumen, para finalmente combinar los volúmenes (“pool”) en un tubo Eppendorf de 1.5 mL. El contenido fue centrifugado a 1500 rpm por 1 minuto, el sobrenadante fue descartado y la biomasa fue resuspendida en 200 μ L de Tris-HCl 100 mM DEPC.

Se procedió a realizar una digestión con 150 μ g de lisozima por 1 hora a 37°C y posteriormente se añadieron 6 μ L de proteinasa K (10 mg/mL) y se incubó por 1 hora a 55°C. Para la extracción de RNA se añadió 1 mL de TRIZOL LS (Thermo Fisher), el contenido fue almacenado a -20°C hasta su extracción. Para la extracción y precipitación, se agregaron 200 μ L de cloroformo y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente ser centrifugado a 12,000 g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y se añadieron 500 μ L de isopropanol para su precipitación y se incubó a -80°C por una hora. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 12,000 g por 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se añadió 1 mL de etanol absoluto y se agitó por vortex brevemente. Finalmente se realizó una centrifugación a 12,000 g por 10 minutos a 4°C, el etanol fue descartado y la pastilla fue secada a temperatura ambiente para ser resuspendida en 30 μ L de agua libre de nucleasas y almacenado a -80°C hasta su uso.

9.3 Retrotranscripción y PCR en tiempo real (qPCR) de cDNA.

Para generar DNA complementario (cDNA), el RNA total fue tratado con DNAsa I (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez eliminada la posible contaminación con DNA genómico, se procedió a realizar una retrotranscripción con el kit Superscript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher) y el kit M-MLV Reverse Transcriptase según las especificaciones del fabricante. El cDNA generado fue almacenado a -80°C hasta su uso.

Para verificar la especificidad de los primers utilizados, se realizaron PCR de punto final y qPCR utilizando el cDNA generado. La mezcla de reacción fue preparada según las condiciones de reacción mostradas en la Tabla 3:

Tabla 3: Condiciones de reacción para la amplificación.

Componente	Concentración o cantidad final
DNA Polimerasa Platinum Taq (5 U/ μ L) (Invitrogen, Massachusetts, Estados Unidos)	1 unidad
Buffer sin MgCl ₂ (10X) (Invitrogen)	1X
MgCl ₂ (50 mM) (Invitrogen)	1.5 mM
Primer forward (10 μ M)	0.5 μ M
Primer reverse (10 μ M)	0.5 μ M
SYBR Green (100X) (Invitrogen)	10X
Agua libre de nucleasas (Invitrogen)	cbp 10 μ L/25 μ L
cDNA (100 ng/ μ L)	100 ng

Para la amplificación se emplearon las siguientes condiciones de corrida en un equipo StepOnePlus Real-Time PCR system (California, Estados Unidos), de acuerdo a lo establecido en la Tabla 4:

Tabla 4: Condiciones de corrida para la amplificación.

Fase de amplificación		Temperatura	Tiempo
Activación		94°C	2 minutos
40 ciclos	Desnaturalización	94°C	15 segundos
	Alineamiento	60°C	30 segundos
	Extensión	72°C	30 segundos

9.4 Análisis de expresión.

Para el análisis de expresión de los genes seleccionados se incluirán solo aislamientos del paciente 1 que produzcan una cantidad suficiente de biopelícula para la extracción de RNA, la expresión relativa será evaluada con el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (60). Se utilizó el gen *rpoS* como normalizador y el primer aislamiento de este paciente como calibrador para comparar los niveles de expresión de los aislamientos subsecuentes, así como la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (aislamiento de sangre) a modo de comparación contra una cepa no relacionada a pacientes con fibrosis quística.

RESULTADOS

1. Objetivo 1.

1.1. Población de estudio.

Se incluyeron un total de 39 cepas, todas aisladas de pacientes con fibrosis quística entre el año 2013 y 2023. Los aislamientos provienen de una colección de cepas del Hospital de Especialidades Pediátricas (HEP) en Chiapas y del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) en la Ciudad de México. La distribución de las cepas es especificada en el anexo 2.

1.2. Análisis de calidad.

El DNA extraído fue enviado al servicio externo de secuenciación de la empresa Novogene. Dos muestras no cumplieron los parámetros de calidad establecidos para la relación de absorbancia 260/230 (AP723, A765). Las métricas de calidad del DNA se muestran en la Tabla 5 para la evaluación interna, mientras que el control de calidad del servicio externo se encuentra en el anexo 3.

Tabla 5: Parámetros de calidad del DNA extraído evaluado por espectrofotometría.

Muestra	Concentración (ng/μl)	Rendimiento (μg)	Relación λ 260/280	Relación λ 260/230
A693	185.5	9.275	2.08	2.17
A697	218	10.9	2.03	2.06
B699	806.5	40.325	1.94	2.09
A700	287.8	14.39	2.08	2.13
A701	274	13.7	2.12	2.29
A703	604	30.2	2.09	2.16
A705	436	21.8	2.08	2.1
A708	176	8.8	2.01	1.95
A709	99.1	4.955	2	1.97
A710	129	6.45	2.03	1.91
AP723	20.4	1.02	1.98	1.51
AM723	94.9	4.745	2.06	1.85
A725	828	41.4	1.92	2.06
A734	571	28.55	2	2.12
A743	193	9.65	2.03	2.17

A747	114	5.7	1.96	1.81
A748	872	43.6	1.92	2.04
A765	35.1	1.755	2.09	1.6
A766	2008	100.4	1.98	2.22
A768	1184	59.2	2.01	2.21
A771	292	14.6	1.95	2.02
A773	1385	69.25	1.98	2.21
AG774	720.6	36.03	2.08	2.35
AP774	250.8	12.54	2.12	2.15
A776	415	20.75	2	2.18
A778	817	40.85	1.94	2.08
A780	971	48.55	1.81	1.95
A928	3233	161.65	1.97	2.11
A931	1288	64.4	1.99	2.2
A942	361	18.05	2.03	2.08
A949	2074	103.7	1.99	2.14
A961	96.2	4.81	2.07	1.94
B972	91.3	4.565	2.1	1.85
A2152	883	44.15	1.95	2.1
A2155	716	35.8	2	2.15
A2158	678.3	33.915	1.98	2.14
AG2160	674.9	33.745	2.07	2.25
AP2160	124.8	6.24	2.02	1.93
A2162	947	47.35	1.85	1.99

1.3. Depósito de secuencias.

Los datos crudos de secuenciación fueron descargados al servidor del Instituto Nacional de Salud Pública y posteriormente depositadas en el archivo de lecturas de secuencias (SRA) del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) bajo el siguiente número de proyecto: PRJNA1010856.

2. Objetivo 2.

2.1. Análisis de calidad y ensamble de genomas.

Las métricas de calidad de las lecturas crudas fueron evaluadas con el software FASTQC v0.11.7 (<https://github.com/s-andrews/FastQC>; accedido el 07/12/2023) (52) y se agregaron utilizando el software MultiQC v1.12 (<https://multiqc.info/>; consultado el

07/12/2023). Todas las lecturas presentaron una puntuación de Phred > 30 (Figura 2), lo cual refleja una exactitud mayor al 99.9% para el llamado de bases.



Figura 2: Resultados FASTQC resumidos utilizando el software MULTIQC, la línea verde superior representa los resultados obtenidos para las 78 lecturas crudas (zona verde: secuencias con puntuación de Phred 30-40, zona amarilla: secuencias con puntuación de Phred 20-29, zona roja: secuencias con puntuación de Phred 0-19).

Posterior al ensamble de los genomas, se obtuvieron parámetros de calidad del centro de recursos bioinformáticos de virus y bacterias (BV-BRC), el promedio de estos se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6: promedio de las métricas de calidad obtenidas para los ensamblados generados con Unicycler.

Número de contigs	91
Tamaño de genoma (pb)	6,576,984
%GC	66.24
Contig L50	6
Contig N50	398,908
Secuencias codificantes	6,263
Compleitud (CheckM)	99%
Contaminación (CheckM)	2%

2.2. Tipificación de secuencias multilocus (MLST) y análisis de MLST de genoma completo (wgMLST).

Una vez introducidas al software EpiSeq CS, se obtuvo la clasificación de MLST, la cual se muestra en la Tabla 7 para el HEP y Tabla 8 para el INER. Se identificaron secuencias tipo (ST) únicas para cada paciente, la permanencia de una ST en pacientes con aislamientos longitudinales y el aislamiento esporádico de dos ST adicionales en el paciente 1 (ST934 y ST1800).

Tabla 7: resultados de tipificación de secuencias multi-locus (MLST) del Hospital de Especialidades Pediátricas.

Paciente	Fecha de recolección de muestra	MLST
1	2013-04-01	829
	2014-02-27	829
	2014-12-12	829
	2015-04-16	829
	2015-12-10	829
	2016-04-19	829
	2016-09-02	829
	2017-04-24	829
	2017-11-22	829
	2018-03-02	934
	2018-10-12	829
	2018-10-12	829
	2020-11-11	1800
	2021-07-02	829
	2021-11-03	829
	2022-02-09	829
	2022-06-28	829
2022-06-28	829	
2023-01-09	829	
2	2014-04-28	244
	2014-12-02	244
	2015-04-23	244
	2015-12-11	244
	2016-12-16	244
	2017-06-30	244
3	2014-12-05	2234
	2016-04-19	2234
	2016-04-19	2234
	2016-09-13	2234
	2017-07-12	2234
5	2012-01-23	4052
6	2019-03-06	2604
7	2018-05-18	274

Tabla 8: resultados de tipificación de secuencias multi-locus (MLST) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Paciente	Fecha de recolección de muestra	MLST
4	11/07/2019	381
	08/03/2020	381
8	02/04/2018	155
9	19/05/2018	254
10	06/07/2018	3426
11	30/07/2019	Nueva secuencia tipo

Además, se obtuvo un árbol filogenético basado en el análisis de wgMLST, el cual utiliza el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) para calcular el coeficiente de distancia entre las muestras (Figura 3).

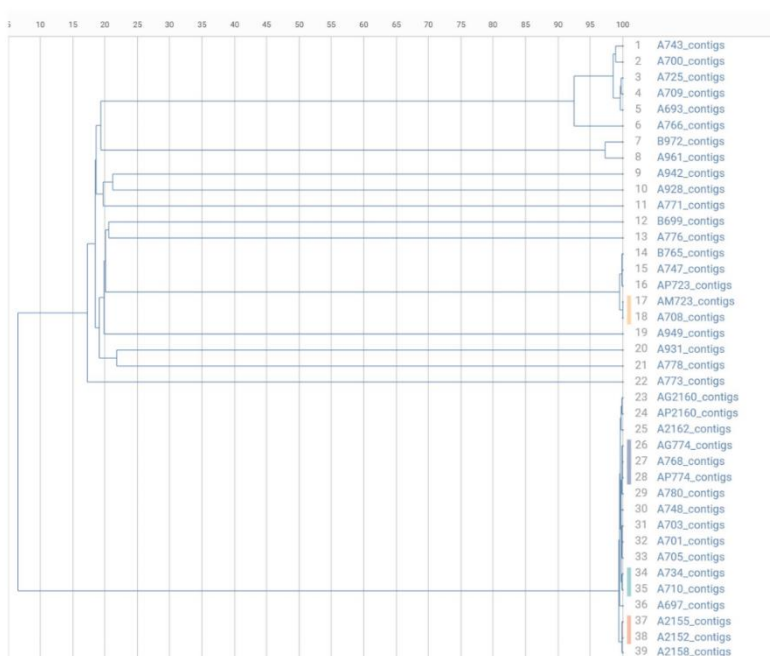


Figura 3: dendrograma basado en el análisis de wgMLST obtenido por el software Epi Seq CS. Se usó el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) para calcular el coeficiente de distancia entre las muestras.

El análisis revela un coeficiente de distancia de ~ 20 para aislamientos no relacionados (cepa única de cada paciente), mientras que se observa una distancia >90 para todos los aislamientos de un mismo paciente, excepto en el caso del paciente 1, como fue observado en el análisis de MLST. Estos hallazgos confirman lo observado en el análisis de MLST. Posteriormente, se generaron archivos de variantes alineando las lecturas crudas al genoma de referencia de la cepa PAO1 utilizando el software Snippy v4.6.0, el cual además genera un archivo de alineamiento de las variantes encontradas y este fue utilizado para generar un árbol filogenético de máxima verosimilitud empleando el software RAxML v8.2.12 (<https://github.com/amkozlov/raxml-ng>; consultado el 07/12/2023) (57) empleando la matriz de ponderación GTRCAT. Se usó la plataforma iTOL v6 (<https://itol.embl.de/>; accedido el 07/12/2023) para integrar los datos de resistoma y viruloma generados por EpiSeq CS y el árbol generado.

2.3. Análisis filogenético basado en variantes.

Se observó la formación de clados independientes para los aislamientos de cada uno de los diferentes pacientes. Los aislamientos longitudinales de pacientes se agruparon dentro del mismo clado, a excepción de los dos aislamientos no relacionados del paciente 1, que corresponden a las ST934 y ST1800. No hubo formación de clados según la procedencia geográfica de los aislamientos (Figura 4).

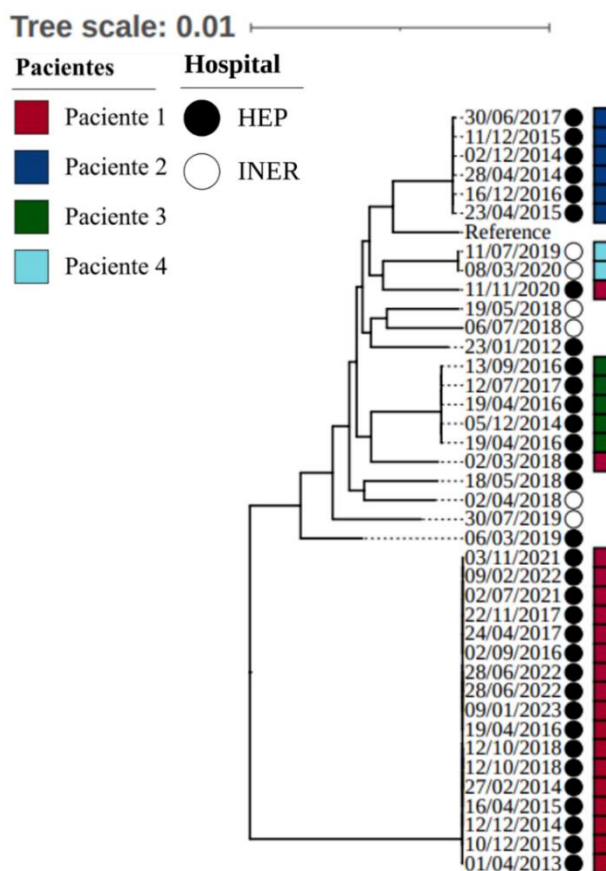


Figura 4: Árbol filogenético basado en variantes generado por RAxML. Los círculos negros y blancos denotan el centro de atención del que proceden los aislamientos, mientras que los recuadros de colores representan aquellos pacientes con aislamientos longitudinales. La escala del árbol (Tree scale) indica una distancia de 0.01 sustituciones por cada posición, es decir, una sustitución cada 100 nucleótidos

2.4. Análisis de resistoma.

El análisis de resistoma (Figura 5) revela la presencia de al menos una copia de los genes de las betalactamasas *bla_{OXA}*, *bla_{PDC}*, y de las enzimas de inactivación de antibióticos *aph(3')-IIb*, *catB7* y *fosA* (inactivación de aminoglucósidos, fenicoles y fosfomicina, respectivamente) en todos los aislamientos. Además, el gen *crpP* fue detectado en los aislamientos del paciente 1 (cepa establecida), paciente 3 y paciente 4; relacionado a la resistencia a fluoroquinolonas por inactivación. Por su parte, los aislamientos de los pacientes 2 y 4 exhibieron la variante T83I en *gyrA*, relacionada a la resistencia a fluoroquinolonas. La cepa establecida del paciente 1, al contrario que las dos cepas no relacionadas, presentó el gen *qacE* y *sulI* (bomba de flujo de antisépticos y enzima modificadora de sitio activo de sulfonamidas, respectivamente). En la cepa establecida del paciente 1 se observaron dos cambios, la pérdida del gen *aadA6* (inactivación de aminoglucósidos) y la ganancia de la variante D87N en *gyrA* (resistencia a fluoroquinolonas).

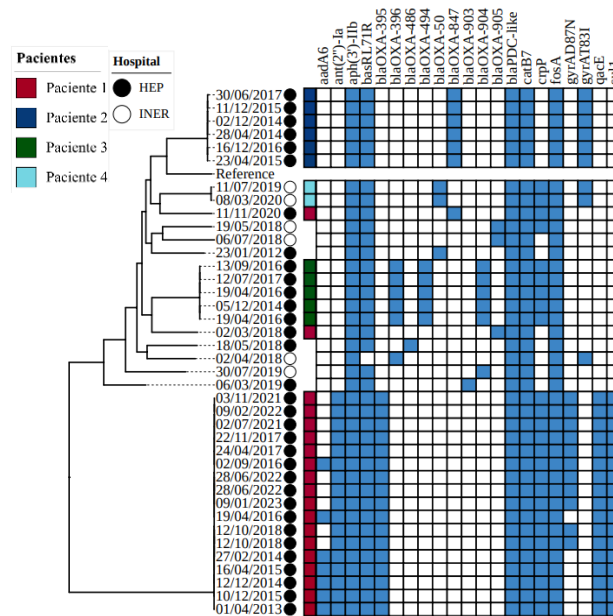


Figura 5 : Árbol filogenético basado en variantes y análisis de resistoma. Los círculos negros y blancos denotan el centro de atención del que proceden los aislamientos, mientras que los recuadros de colores representan aquellos pacientes con aislamientos longitudinales. Los recuadros azules indican la presencia de los genes especificados en la parte superior.

Análisis de viruloma.

2.4.1. Flagelo.

El análisis de los genes involucrados en la motilidad dependiente de flagelo (Figura 6) demuestra la ausencia de varios genes esenciales para esta función en los aislamientos de los pacientes 1 y 3, así como en algunos aislamientos individuales de otros pacientes. Estos genes ausentes son *fleIP*, *flgKL* y *fliCDS*. Los aislamientos del paciente 2 poseen los genes mencionados anteriormente y adquirieron una duplicación en el gen *fliQ* en el último de sus aislamientos (30/06/2017). Además, presentan ausencia del gen *fliR*. Por otra parte, se detectaron todos los genes relacionados a flagelo en los aislamientos del paciente 4, al igual que en uno de los aislamientos no relacionados del paciente 1 (11/11/2020; ST1800).

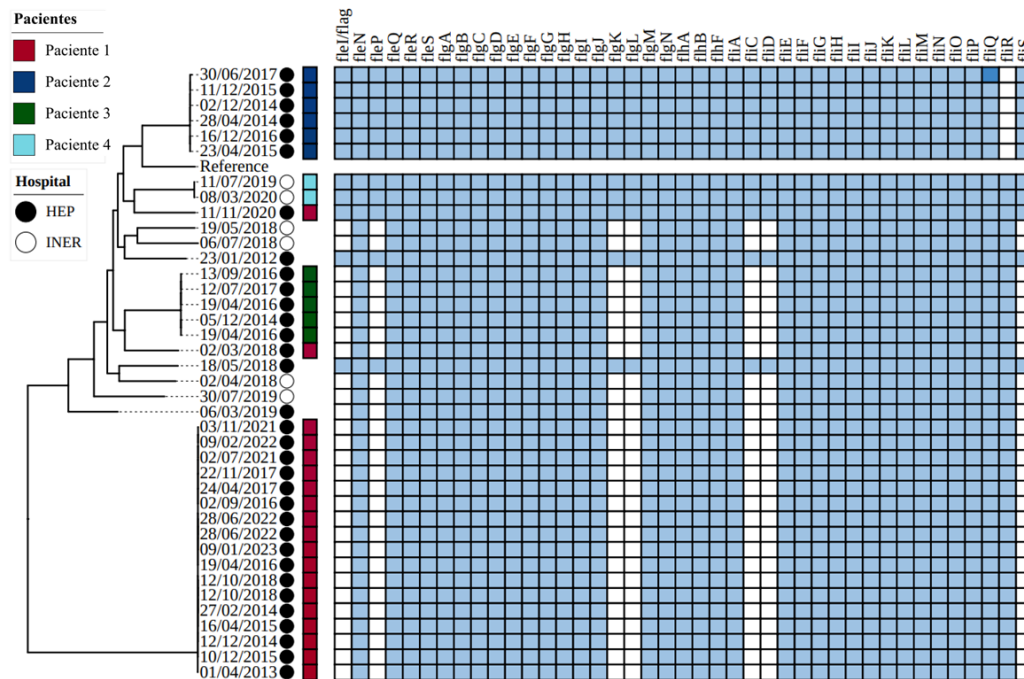


Figura 6: Árbol filogenético basado en variantes y análisis de genes relacionados a flagelo. Los círculos negros y blancos denotan el centro de atención del que proceden los aislamientos, mientras que los recuadros de colores representan aquellos pacientes con aislamientos longitudinales. Los recuadros azul claro indican la presencia de los genes especificados en la parte superior, mientras que los recuadros azul fuerte indican la presencia de dos copias del gen en cuestión

2.4.2. Pili de tipo IV.

El gen *pilA* estuvo ausente en todos los aislamientos, mientras que *pilB* estuvo presente solo en los aislamientos del paciente 2 y en tres aislamientos individuales. Además, los aislamientos del paciente 4 carecen de los genes *pilEVWXYIY2*, al igual que dos aislamientos de pacientes individuales (18/05/2018 y 30/07/2019), como se observa en la Figura 7.

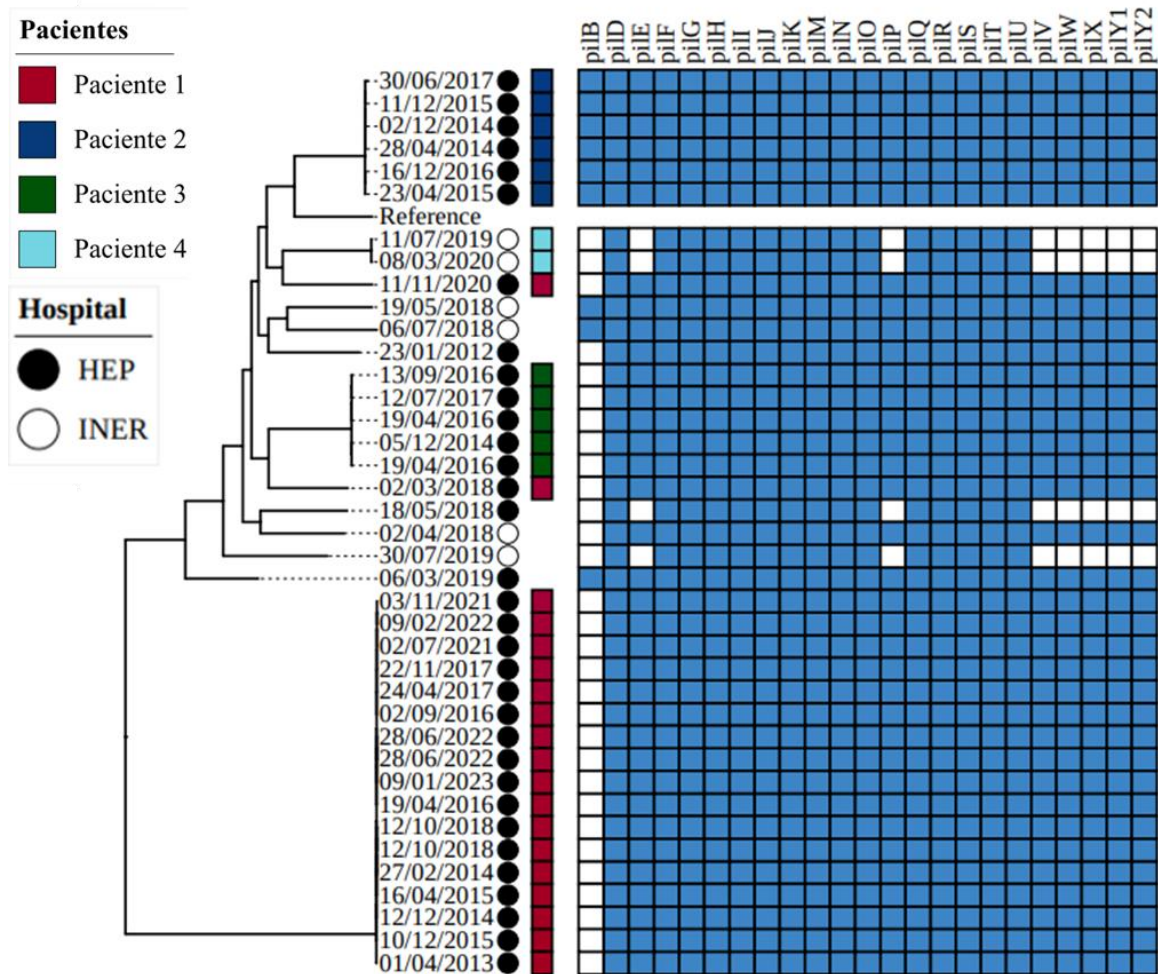


Figura 7:: Árbol filogenético basado en variantes y análisis de genes relacionados a pilis de tipo IV. Los círculos negros y blancos denotan el centro de atención del que proceden los aislamientos, mientras que los recuadros de colores representan aquellos pacientes con aislamientos longitudinales. Los recuadros azules la presencia de los genes especificados en la parte superior

2.4.3. Pioverdina.

Los genes relacionados a la captación y producción de pioverdina (Figura 8) tuvieron un comportamiento variable entre la mayoría de los aislamientos. De manera notable, los aislamientos de la cepa establecida del paciente 1 carecen de *fpvA* y *pvdAEFIJP*, mientras que las cepas no relacionadas de este mismo solo carecen de *pvdI*. Por otro lado, los aislamientos del paciente 3 carecen de *fpvA* y *pvdEIQ*, mientras que los aislamientos del paciente 2 carecen solo de *pvdI*. La pérdida del gen *pvdJ* es observada en el último aislamiento del paciente 4 (08/03/2020).

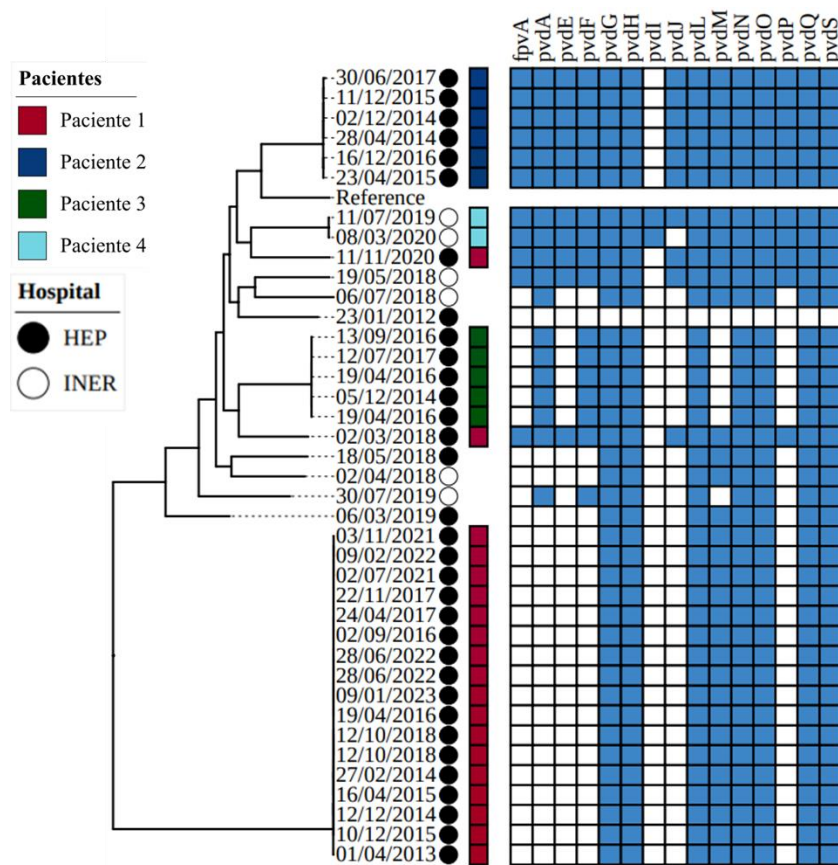


Figura 8: Árbol filogenético basado en variantes y análisis de genes a la producción y captación de pioverdina. Los círculos negros y blancos denotan el centro de atención del que proceden los aislamientos, mientras que los recuadros de colores representan aquellos pacientes con aislamientos longitudinales. Los recuadros azules la presencia de los genes especificados en la parte superior.

2.4.4. Síntesis del antígeno O.

Se evidenció una ausencia de los genes *hisF2H2*, *wbpABCDEFGHIJKLM* y *wzXYZ* en todos los aislamientos (Figura 9), a excepción de los aislamientos de los pacientes 2 y 4, los cuales presentaron todos estos genes.

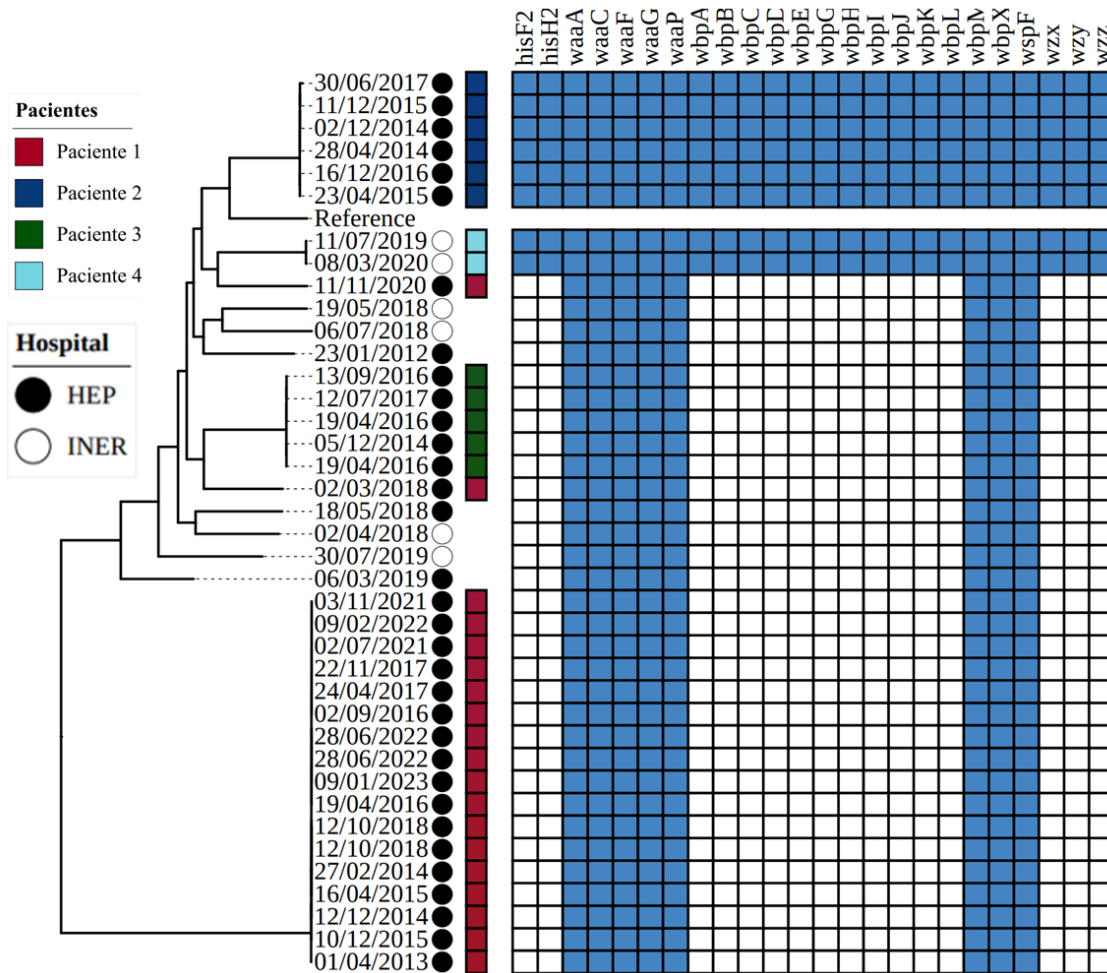


Figura 9: Árbol filogenético basado en variantes y análisis de genes relacionados a la síntesis del antígeno O. Los círculos negros y blancos denotan el centro de atención del que proceden los aislamientos, mientras que los recuadros de colores representan aquellos pacientes con aislamientos longitudinales. Los recuadros azules la presencia de los genes especificados en la parte superior.

2.4.5. Sistema de secreción tipo III.

Los genes relacionados al sistema de secreción tipo III estuvieron presentes en la mayoría de los aislamientos, a excepción de aquellos de la cepa establecida del paciente 1, los cuales carecen del gen de la toxina *exoY*, como se muestra en la Figura 10.

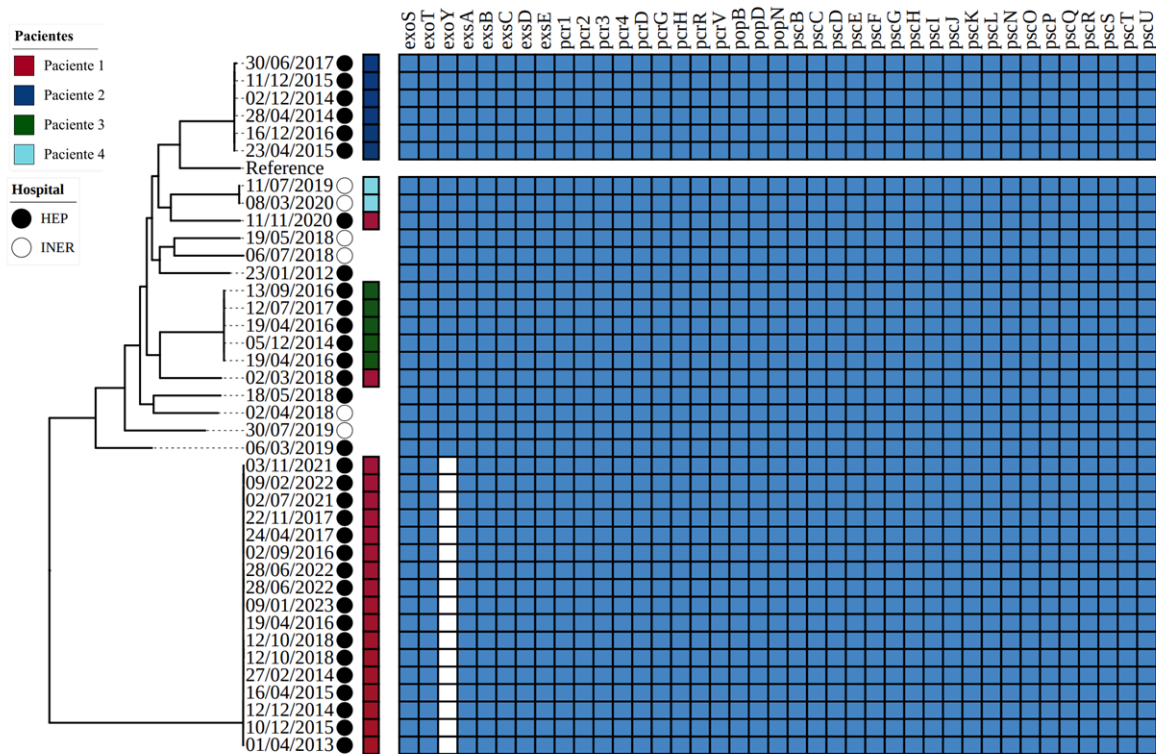


Figura 10: Árbol filogenético basado en variantes y análisis de genes relacionados al sistema de secreción tipo III. Los círculos negros y blancos denotan el centro de atención del que proceden los aislamientos, mientras que los recuadros de colores representan aquellos pacientes con aislamientos longitudinales. Los recuadros azules la presencia de los genes especificados en la parte superior.

2.4.6. Sistema de secreción tipo VI.

La ganancia del gen *vgrG1b* fue observada en los últimos aislamientos de los pacientes 2 y 4, mientras que se evidenció la ausencia de *vgrG1a* en el primero. Para la cepa establecida del paciente 1, se observó un comportamiento variable en el gen *vgrG1b*, pues está ausente en la mayoría de los aislamientos, a excepción de uno (28/06/2022), como se muestra en la Figura 11.

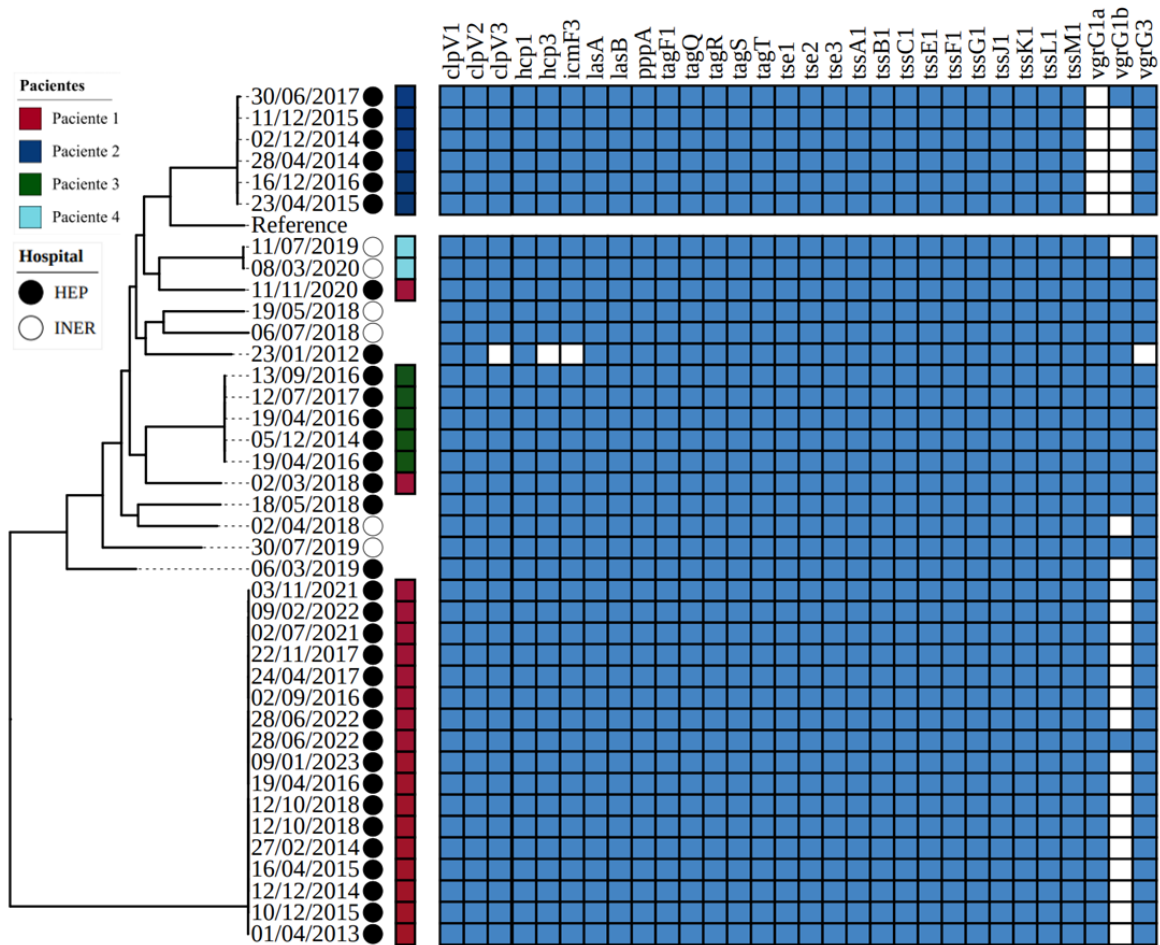


Figura 11: Árbol filogenético basado en variantes y análisis de genes relacionados al sistema de secreción tipo III. Los círculos negros y blancos denotan el centro de atención del que proceden los aislamientos, mientras que los recuadros de colores representan aquellos pacientes con aislamientos longitudinales. Los recuadros azules la presencia de los genes especificados en la parte superior.

2.4.7. Piocianina y pioquelina.

Los genes relacionados con la producción de piocianina y pioquelina fueron detectados en todos los aislamientos (Figura 12). El gen *phzB1* estuvo duplicado en todas las cepas, excepto en las de los pacientes 2 y 4. La presencia del gen *phzA1* fue variable en las cepas de los pacientes 1 y 3, ya que algunos aislamientos carecen de este o presentan duplicaciones, sin una tendencia clara a la ganancia o pérdida. Además, el gen *phzD1* estuvo ausente en uno de los aislamientos de la cepa establecida del paciente 1 (28/06/2022).

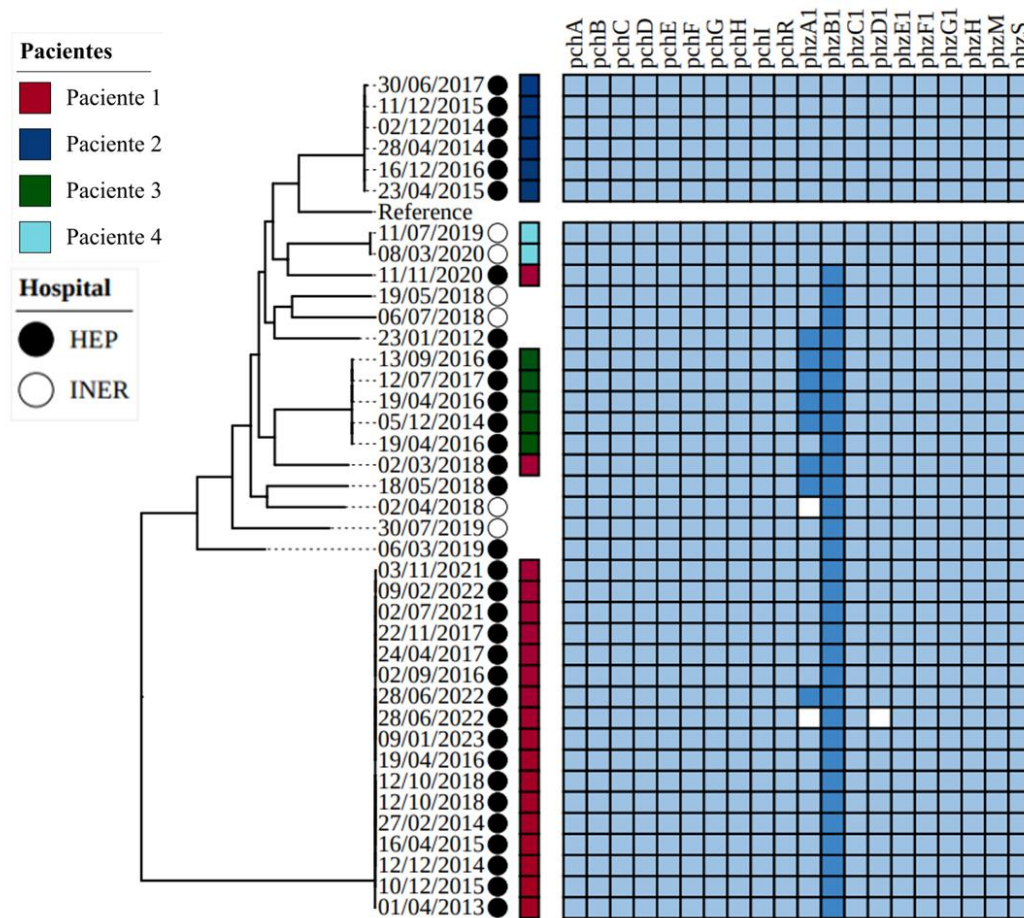


Figura 12: Árbol filogenético basado en variantes y análisis de genes relacionados a la producción de piocianina y pioquelina. Los círculos negros y blancos denotan el centro de atención del que proceden los aislamientos, mientras que los recuadros de colores representan aquellos pacientes con aislamientos longitudinales. Los recuadros azul claro indican la presencia de los genes especificados en la parte superior, mientras que los recuadros azul fuerte indican la presencia de dos copias del gen en cuestión.

2.4.8. Biopelícula.

Los genes relacionados a la producción de biopelícula fueron evidenciados en todos los aislamientos, a excepción de una cepa (23/01/2012), como se muestra en la Figura 13.

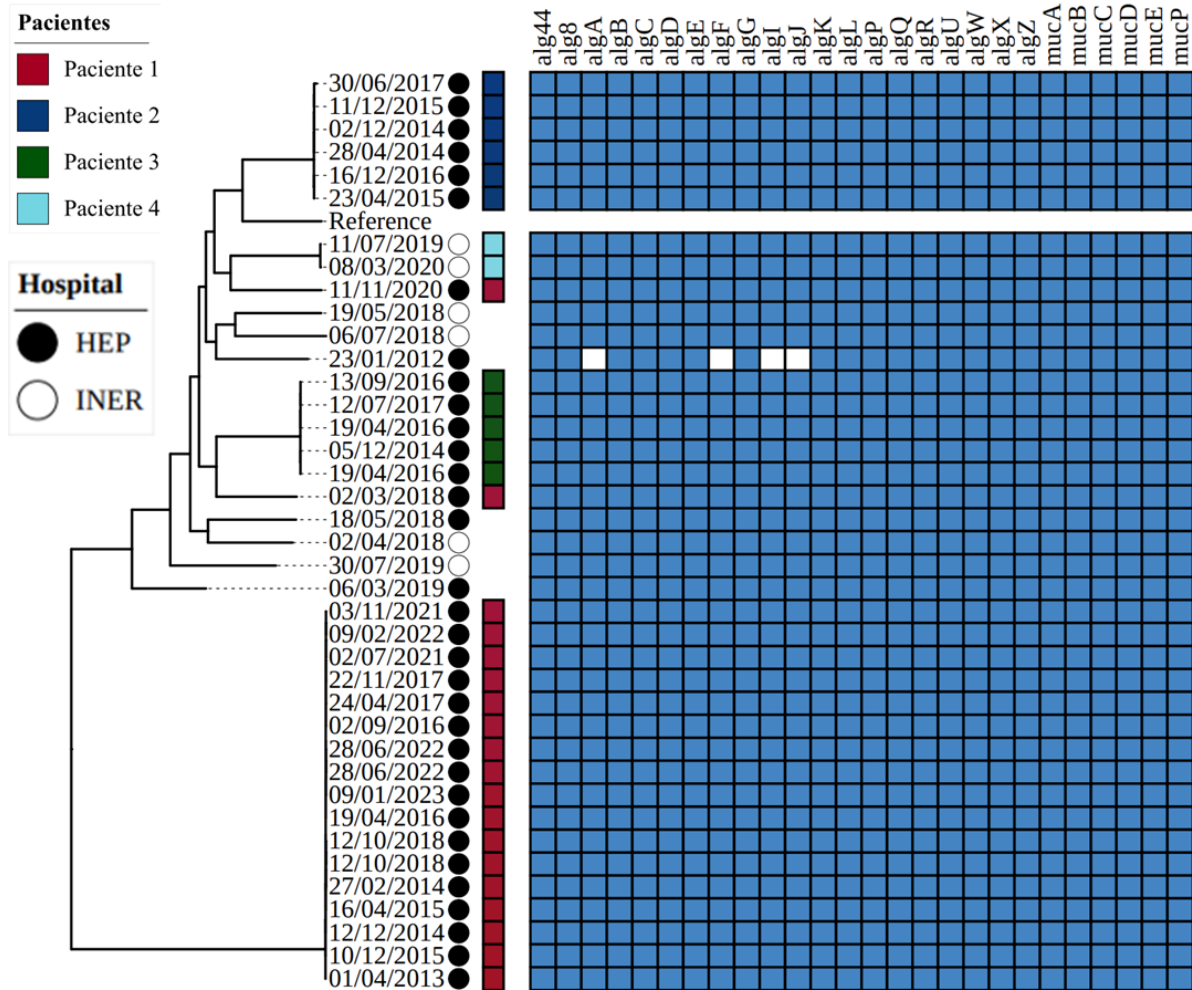


Figura 13: Árbol filogenético basado en variantes y análisis de genes relacionados a la producción de biopelícula. Los círculos negros y blancos denotan el centro de atención del que proceden los aislamientos, mientras que los recuadros de colores representan aquellos pacientes con aislamientos longitudinales. Los recuadros azules la presencia de los genes especificados en la parte superior.

2.5. Análisis de variantes

Se obtuvieron un total de 56, 528 y 39 variantes acumuladas al comparar el primer y último aislamiento de los pacientes 1, 2 y 3, respectivamente. Esto refleja una tasa de mutación de cinco por año para la cepa establecida del paciente 1; 176 por año para la cepa del paciente 2; y 13 por año para la cepa del paciente 3. Los archivos de variantes completos se muestran en el anexo 4. En la Tabla 9 se muestra la distribución de las variantes según su categoría.

Tabla 9. Número y tipo de variantes acumuladas al comparar el último vs el primer aislamiento de pacientes con seguimiento longitudinal

Tipo de variante	Paciente 1 (ST829)	Paciente 2 (ST244)	Paciente 3 (ST2243)
Variante de un solo nucleótido	31	430	34
Inserciones	10	59	2
Deleciones	13	38	3

2.6. Análisis de pangenoma

El análisis de pangenoma permitió la identificación de 3,175 diferentes clusters de genes ortólogos (COGs) correspondientes al genoma accesorio de todos los aislamientos incluidos. La Figura 14 muestra la cantidad de genes accesorios para cada uno de los aislamientos, los cuales están ordenados por paciente y por fecha de aislamiento. Todos los aislamientos presentaron un contenido de genes accesorios mayor a 600 (a excepción del aislamiento B699), lo cual es mayor al compararse con la cepa de referencia PAO1. Para los aislamientos no relacionados del paciente 1 (A778; ST934 y A771; ST1800) se encontró un contenido de genes accesorios menor al compararse con la cepa establecida.

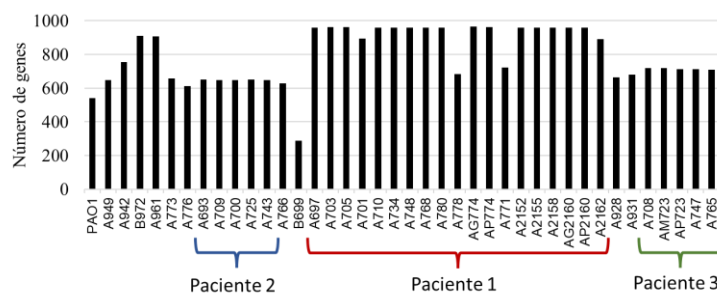


Figura 14: Número de genes accesorios para cada uno de los aislamientos; ordenados por fecha y separados por pacientes.

Al graficar la proporción de genes según su categoría funcional (Figura 15), se encontró una distribución similar de funciones en todos los aislamientos, a pesar de las diferencias en su contenido de genético. En comparación con la cepa PAO1, los aislamientos estudiados mostraron una proporción cercana a 10% de elementos del moviloma, mientras que la cepa de referencia carece de estos (Figura 15).

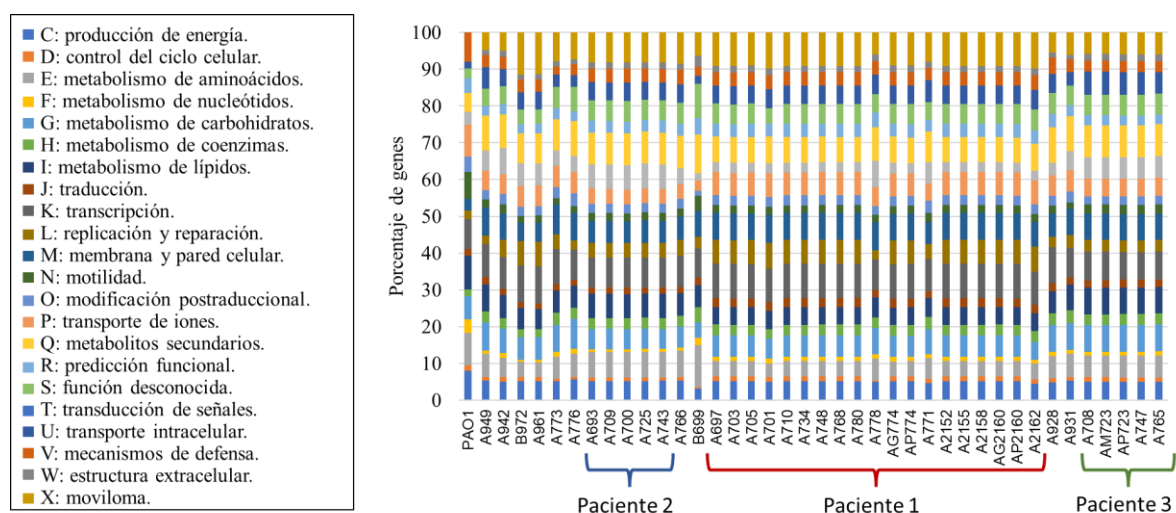


Figura 15: Porcentaje de genes relacionados a las distintas categorías funcionales (tabla izquierda); ordenados por fecha y separados por pacientes.

3. Objetivo 3.

3.1. Ensayos de motilidad.

Los resultados de motilidad (Figura 16) ponen en evidencia la motilidad dependiente de pilis de tipo IV (twitching) en dos aislamientos, ambos del paciente 1. Todas las cepas evidenciaron motilidad dependiente de flagelo (swarming o swimming), a excepción de aquellas del paciente 4. La motilidad por nado (swimming) mostró variabilidad a lo largo del tiempo en la cepa establecida del paciente 1, y fue completamente perdida en el último aislamiento del paciente 2. Finalmente, la motilidad tipo swarming fue evidenciada principalmente en aislamientos individuales y en las cepas no relacionadas del paciente 1, así como en las del paciente 3.

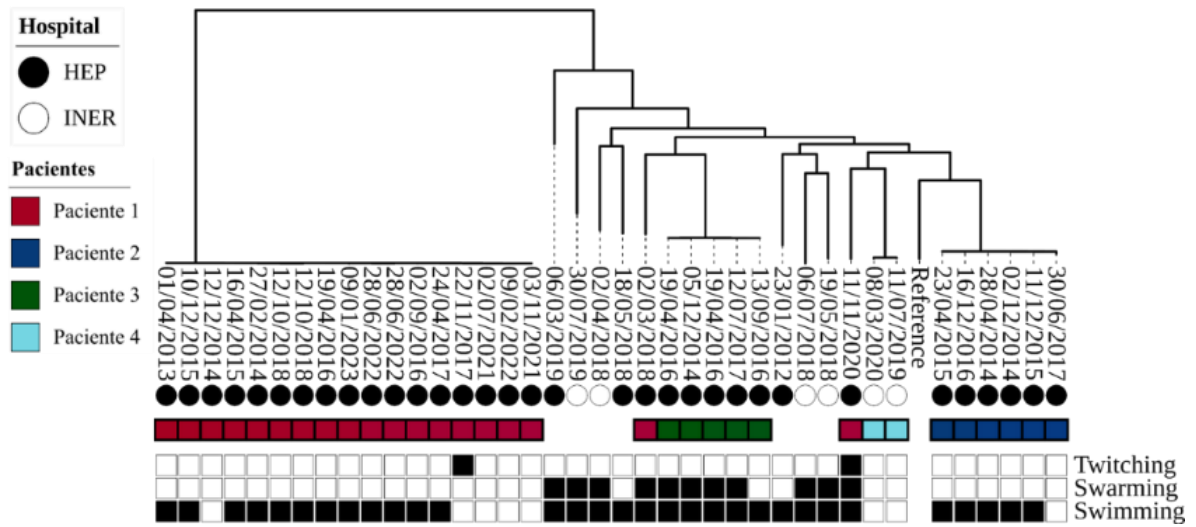


Figura 16: Árbol filogenético basado en variantes y resultados de los ensayos de motilidad. Los círculos negros y blancos denotan el centro de atención del que proceden los aislamientos, mientras que los recuadros de colores representan aquellos pacientes con aislamientos longitudinales. Los recuadros negros indican aquellos aislamientos que exhiben motilidad.

3.2. Producción de biopelícula.

La producción de biopelícula fue variable en todas las cepas (Figura 17). Los aislamientos de los pacientes 1 y 3 exhibieron un comportamiento variable que va desde la no producción hasta la producción fuerte a lo largo del tiempo, que no sigue una tendencia clara al aumento o disminución. La cepa del paciente 2 se mantuvo como no productora durante el periodo de observación.

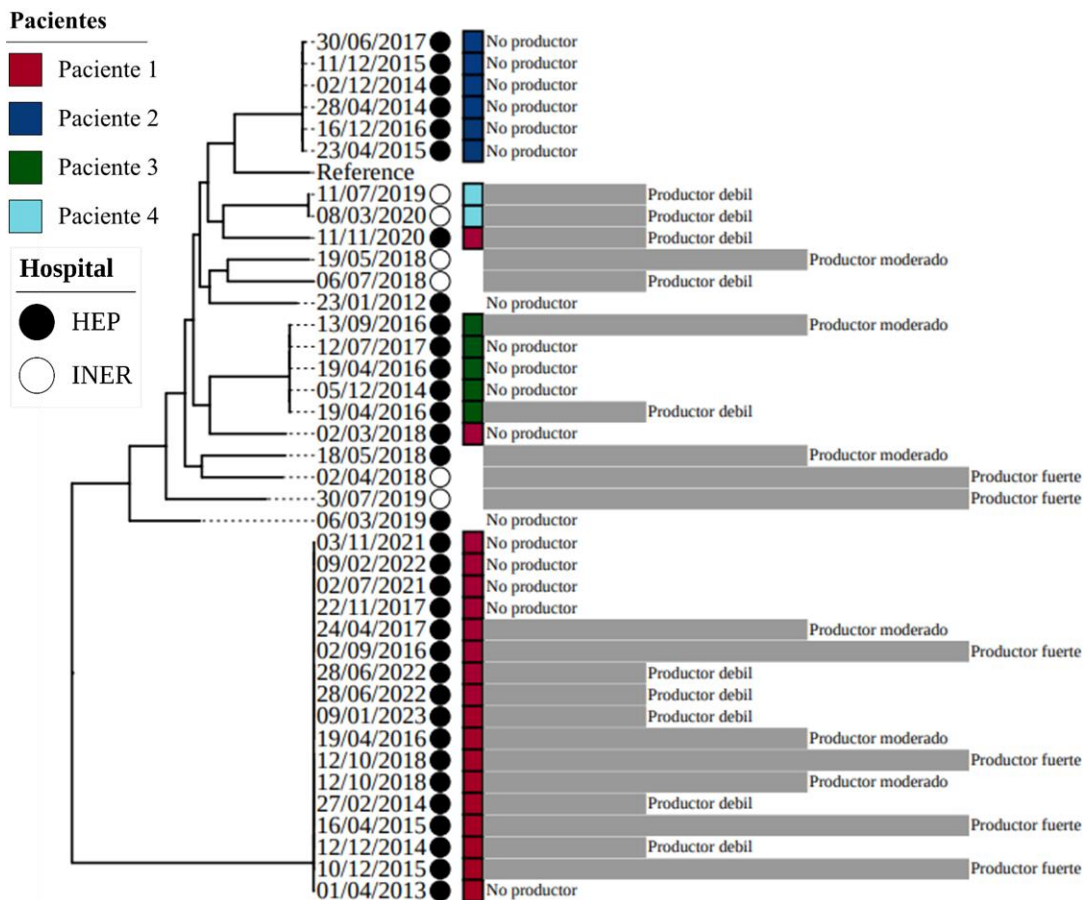


Figura 17: Árbol filogenético basado en variantes y resultados de los ensayos de producción de biopelícula. Los círculos negros y blancos denotan el centro de atención del que proceden los aislamientos, mientras que los recuadros de colores representan aquellos pacientes con aislamientos longitudinales. Las barras grises indican el grado de producción de biopelícula.

3.3. Tasa de crecimiento específica (μ).

La tasa de crecimiento específica promedio fue de 0.0639 h^{-1} , lo cual es menor comparado con la cepa de referencia ATCC 27853 (0.094 h^{-1}). Los resultados para todos los aislamientos se muestran en el anexo 5. Los datos fueron analizados con la prueba estadística de Shapiro-Wilk y se determinó que seguían una distribución normal, por lo que se empleó la prueba de Dunnet para comparar el primer aislamiento del paciente 1 con los aislamientos subsecuentes. Esto fue realizado únicamente para el paciente 1 por ser el de mayor tiempo de observación. Los aislamientos más recientes del paciente 1 muestran una disminución en la tasa de crecimiento estadísticamente significativa ($p < 0.001$) al compararse con el primer aislamiento. Además, una de las cepas no relacionadas mostró una tasa de crecimiento mayor (diferencia estadísticamente significativa, $p < 0.01$).

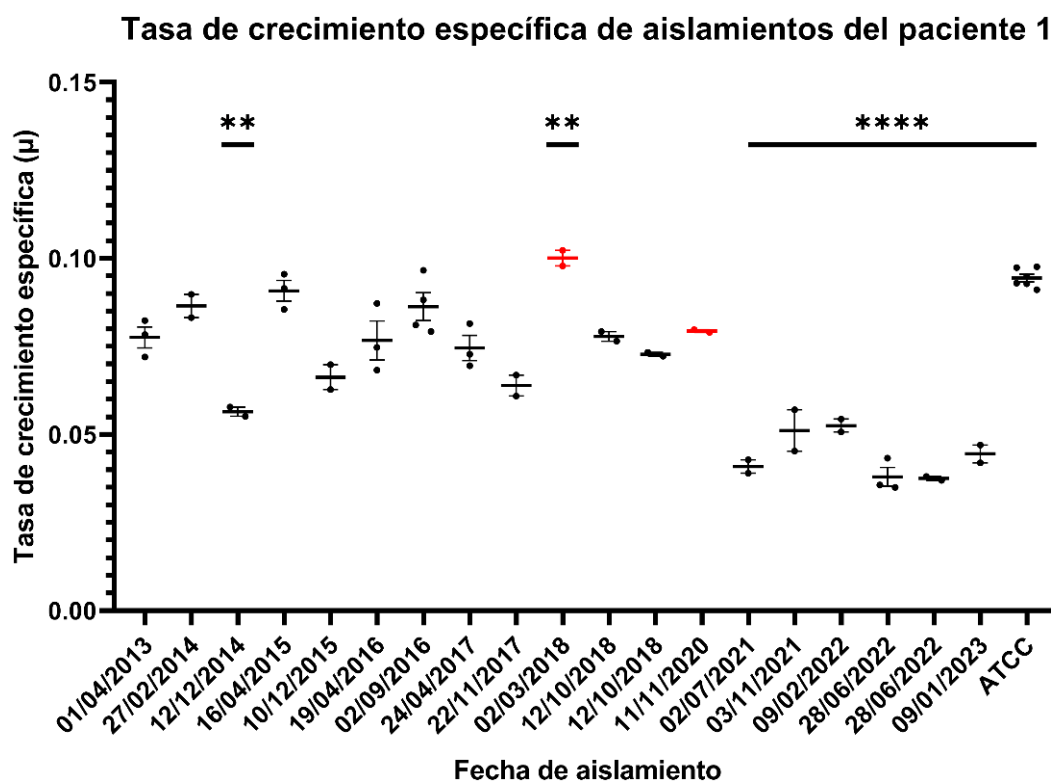


Figura 18: Evaluación de la tasa de crecimiento específica (μ) para los aislamientos del paciente 1, ordenados por fecha de aislamiento. El color rojo indica las cepas no relacionadas

3.4. Actividad elastolítica.

La cepa establecida del paciente 1 demostró una disminución progresiva en su actividad elastolítica, la cual desapareció en aquellos aislamientos después del año 2018 (Figura 19). Las cepas no relacionadas exhibieron una actividad elastolítica relativamente elevada al compararse con los aislamientos de la cepa establecida en puntos de tiempo similares.

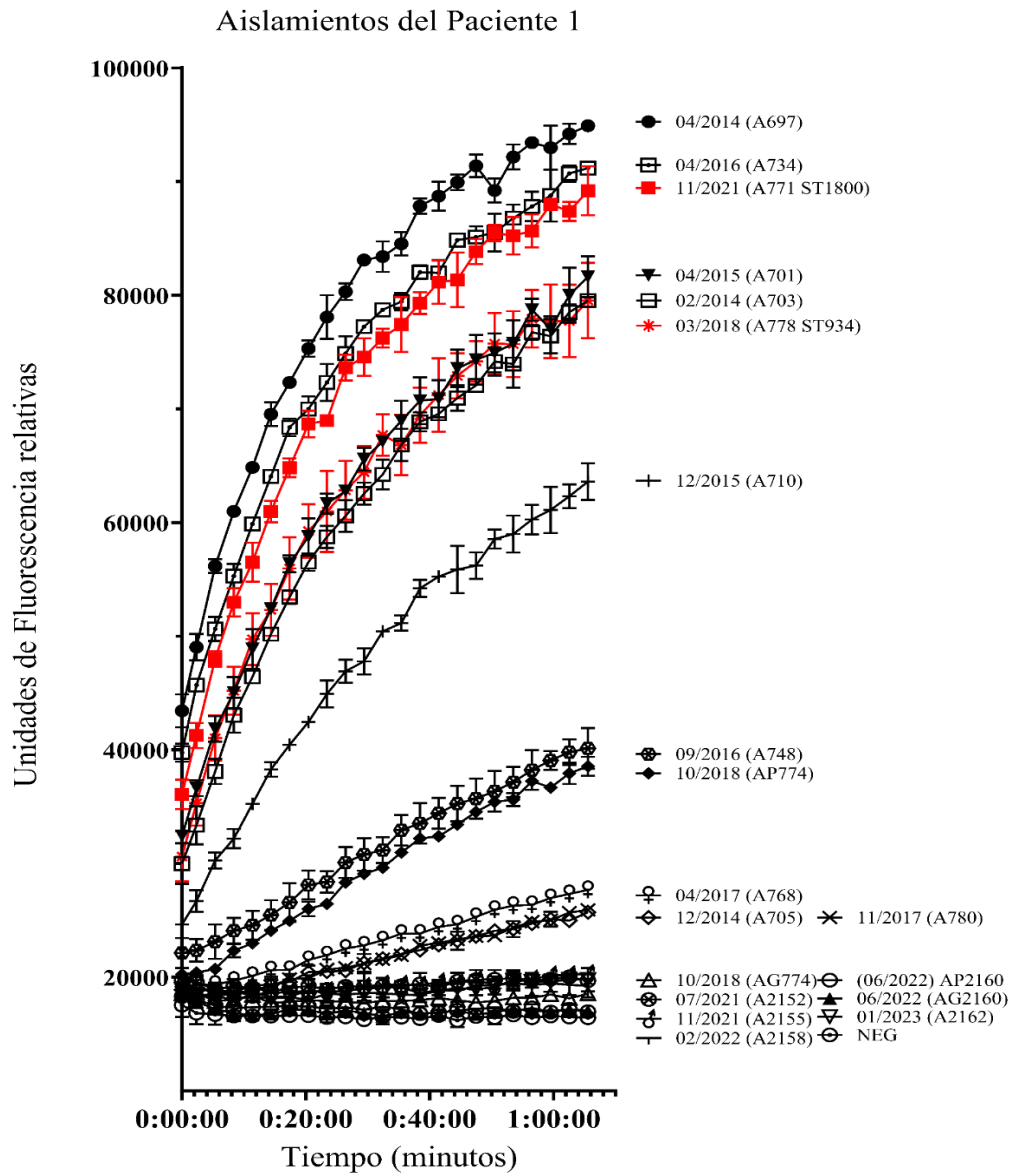


Figura 19: Aumento de la intensidad de fluorescencia relativa (RFI) dependiente de la degradación de elastina marcada con un fluoróforo a lo largo del tiempo para los aislamientos del paciente 1. Las cepas no relacionadas están representadas en rojo.

Las cepas del paciente 2 mostraron un comportamiento variable a lo largo del tiempo, que no sigue una tendencia clara al aumento o disminución. Por otra parte, aquellos aislamientos del paciente 3 mantuvieron su actividad durante el periodo de observación (Figura 20).

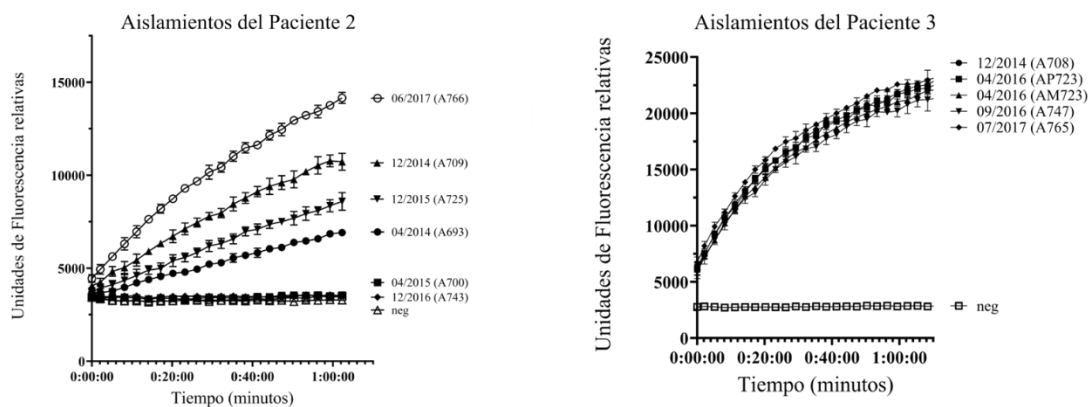


Figura 20: Aumento de la intensidad de fluorescencia relativa (RFI) dependiente de la degradación de elastina marcada con un fluoróforo a lo largo del tiempo para los aislamientos de los pacientes 2 y 3.

3.5. Susceptibilidad a antibióticos.

En general, la mayoría de los aislamientos demuestran un patrón de susceptibilidad para los antibióticos evaluados, a excepción del aislamiento B699 del paciente 5, como se muestra en la Tabla 10. En los aislamientos más recientes del paciente 1 se observa una ganancia de resistencia frente amikacina y ciprofloxacino, al compararse con las cepas no relacionadas de este mismo paciente, estas últimas demostraron sensibilidad a estos antibióticos. Los aislamientos del paciente 2 adquirieron resistencia a ciprofloxacino, mientras que los del paciente 3 perdieron resistencia frente a cefepime, ceftazidima y ceftolozano/tazobactam.

Tabla 10: interpretación de antibiograma para los aislamientos incluidos en el estudio. AMK: amikacina; FEP: cefepime; CAZ: ceftazidima; CZA: ceftazidima/avibactam; CIP: ciprofloxacino; C/T: ceftalozano/tazobactam; IMP: imipenem; MEM: meropenem; TZP: piperacilina/ tazobactam; S: susceptible; I: intermedio; R: resistente; ND: no determinado.

Paciente	Aislamiento	Fecha de aislamiento	AMK	FEP	CAZ	CZA	CIP	C/T	IMP	MEM	TZP
1	A697	01/04/2013	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	A703	27/02/2014	S	I	S	S	S	S	R	R	I
1	A705	12/12/2014	S	I	S	S	S	S	S	S	S
1	A701	16/04/2015	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	A710	10/12/2015	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	A734	19/04/2016	S	S	S	S	I	S	S	S	I
1	A748	02/09/2016	S	S	S	S	R	S	S	S	I
1	A768	24/04/2017	S	S	S	S	R	S	S	S	S
1	A780	22/11/2017	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	A778	02/03/2018	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	AG774	12/10/2018	S	S	S	ND	R	ND	S	S	S
1	AP774	12/10/2018	S	I	S	ND	R	ND	S	I	S
1	A771	11/11/2020	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	A2152	02/07/2021	R	S	S	S	I	S	S	S	S
1	A2155	03/11/2021	R	S	S	S	S	S	S	S	ND
1	A2158	09/02/2022	R	S	S	S	I	S	S	S	S
1	AG2160	28/06/2022	S	S	S	ND	R	ND	S	S	S
1	AP2160	28/06/2022	S	S	S	ND	R	ND	S	S	S
1	A2162	09/01/2023	S	S	S	S	R	S	S	S	S
2	A693	28/04/2014	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	A709	02/12/2014	S	I	S	S	S	S	S	S	S
2	A700	23/04/2015	S	I	R	S	R	R	S	S	R
2	A725	11/12/2015	S	I	S	S	I	S	S	S	I
2	A743	16/12/2016	S	S	S	S	R	S	S	S	ND
2	A766	30/06/2017	S	S	S	S	R	S	S	S	S
3	A708	05/12/2014	S	I	I	R	S	R	S	S	R
3	AM723	19/04/2016	S	R	R	ND	I	ND	S	S	S
3	AP723	19/04/2016	S	R	S	ND	I	ND	S	S	S
3	A747	13/09/2016	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	A765	12/07/2017	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	B972	11/07/2019	S	I	S	ND	S	ND	ND	S	ND
4	A961	08/03/2020	S	R	R	ND	R	ND	R	R	R
5	B699	23/01/2012	R	R	R	R	I	R	S	2	R
6	A773	06/03/2019	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	A776	18/05/2018	S	S	S	S	S	S	R	R	S
8	A928	06/07/2018	S	S	S	S	S	S	S	S	S
9	A931	30/07/2019	S	S	S	ND	S	ND	S	S	S
10	A942	19/05/2018	S	S	R	ND	S	ND	S	S	S
11	A949	02/04/2018	S	S	S	ND	R	ND	S	S	S

Al analizar estos datos según la concentración mínima inhibitoria de cada antibiótico (MIC) (Tabla 11), se observó un incremento en la MIC para amikacina, cefepime, ciprofloxacino y ceftazidima en los aislamientos del paciente 1, la cual fue mayor al compararse con ambas cepas no relacionadas del mismo paciente. Los aislamientos de los pacientes 2 y 3 exhibieron un comportamiento variable de la MIC. Por otra parte, los aislamientos de los pacientes 1 y 2 mostraron una menor MIC frente a ceftazidima cuando esta se evaluó en combinación con avibactam.

Tabla 11: Concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$) para los aislamientos incluidos en el estudio. AMK: amikacina; FEP: cefepime; CAZ: ceftazidima; CZA: ceftazidima/avibactam; CIP: ciprofloxacino; C/T: ceftalozano/tazobactam; IMP: imipinem; MEM: meropenem; TZP: piperacilina/ tazobactam; S: susceptible; I: intermedio; R: resistente; ND: no determinado.

Paciente	Aislamiento	Fecha de aislamiento	AMK	FEP	CAZ	CZA	CIP	C/T	IMP	MEM	TZP
1	A697	01/04/2013	4	8	2	2	0.5	1	1	≤ 0.25	≤ 4
1	A703	27/02/2014	4	16	2	2	0.5	1	2	8	64
1	A705	12/12/2014	4	16	2	2	0.5	2	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 4
1	A701	16/04/2015	4	8	2	2	0.5	1	2	≤ 0.25	≤ 4
1	A710	10/12/2015	≤ 1	1	1	≤ 0.25	0.12	≤ 0.25	≤ 0.5	≤ 0.25	≤ 4
1	A734	19/04/2016	16	8	2	2	1	1	2	≤ 0.25	64
1	A748	02/09/2016	8	8	2	1	≥ 4	1	1	≤ 0.25	64
1	A768	24/04/2017	8	8	2	1	2	1	1	≤ 0.25	8
1	A780	22/11/2017	4	4	1	2	0.5	1	≤ 0.5	≤ 0.25	8
1	A778	02/03/2018	4	2	2	2	0.5	0.5	2	1	8
1	AG774	12/10/2018	16	8	2	ND	≥ 4	ND	ND	≤ 0.25	ND
1	AP774	12/10/2018	16	16	2	ND	≥ 4	ND	ND	4	ND
1	A771	11/11/2020	4	2	2	1	0.5	1	2	≤ 0.25	8
1	A2152	02/07/2021	≥ 64	8	2	2	1	1	1	≤ 0.25	≤ 4
1	A2155	03/11/2021	≥ 64	8	4	1	0.5	1	1	≤ 0.25	ND
1	A2158	09/02/2022	≥ 64	8	2	1	1	1	2	≤ 0.25	≤ 4
1	AG2160	28/06/2022	8	8	8	ND	≥ 4	ND	ND	≤ 0.25	ND
1	AP2160	28/06/2022	8	8	8	ND	≥ 4	ND	ND	≤ 0.25	ND
1	A2162	09/01/2023	8	8	4	1	2	1	1	≤ 0.25	8
2	A693	28/04/2014	≤ 1	4	2	1	0.5	1	1	≤ 0.25	≤ 4
2	A709	02/12/2014	16	16	2	2	0.5	1	1	≤ 0.25	≤ 4
2	A700	23/04/2015	4	16	≥ 64	4	2	16	1	1	≥ 128
2	A725	11/12/2015	16	16	2	2	1	1	2	≤ 0.25	32
2	A743	16/12/2016	2	8	8	1	≥ 4	1	1	≤ 0.25	ND
2	A766	30/06/2017	ND	2	ND	≤ 0.25	ND	≤ 0.25	ND	ND	≤ 4
3	A708	05/12/2014	16	16	8	≥ 16	0.5	≥ 32	2	0.5	≥ 128
3	AM723	19/04/2016	16	≥ 32	32	ND	1	ND	ND	0.5	ND
3	AP723	19/04/2016	16	16	2	ND	1	ND	ND	0.5	ND
3	A747	13/09/2016	ND	8	ND	1	ND	1	1	≤ 0.25	≤ 4
3	A765	12/07/2017	4	8	2	2	0.5	2	≤ 0.5	≤ 0.25	8
4	B972	11/07/2019	16	16	8	ND	0.5	ND	ND	0.5	ND
4	A961	08/03/2020	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	B699	23/01/2012	≥ 64	≥ 32	≥ 64	≥ 16	1	≥ 32	2	S	≥ 128
6	A773	06/03/2019	4	8	2	2	0.5	1	2	≤ 0.25	≤ 4
7	A776	18/05/2018	4	8	2	2	0.25	1	2	≤ 0.25	16
8	A928	06/07/2018	4	8	2	1	0.5	1	≤ 0.5	≤ 0.25	16
9	A931	30/07/2019	2	2	2	ND	0.5	ND	1	≤ 0.25	8
10	A942	19/05/2018	4	2	≥ 64	ND	0.25	ND	2	≤ 0.25	≤ 4
11	A949	02/04/2018	2	2	1	ND	≥ 4	ND	≤ 0.5	1	≤ 4

4. Objetivo 4.

4.1. Diseño de primers para PCR en tiempo real.

La amplificación por PCR punto final y subsecuente electroforesis reveló la presencia de bandas individuales de tamaño esperado para cada par de primers como se observa en la Figura 21. Así mismo, el análisis de las curvas de disociación en la amplificación por qPCR revela la presencia de bandas individuales en los controles positivos y la ausencia de bandas en los controles negativos (Figura 22).

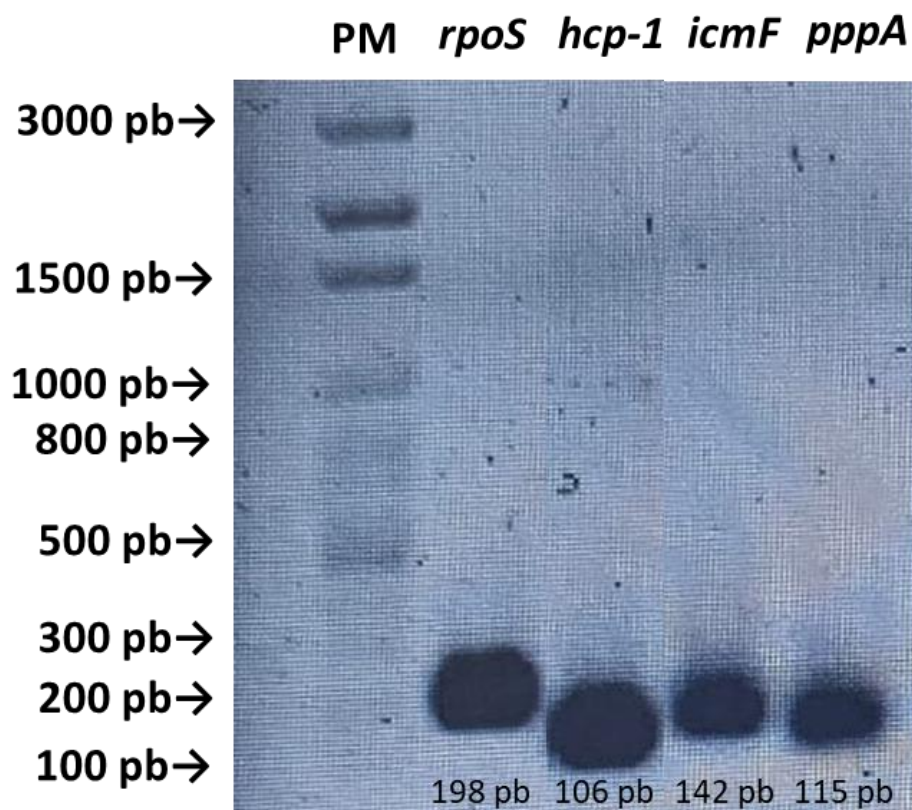


Figura 21: Electroforesis en gel de agarosa para cada uno de los pares de primers evaluados. En la parte superior se indican los genes correspondientes, de lado izquierdo se especifica el tamaño. (PM: peso molecular, pb: pares de bases).

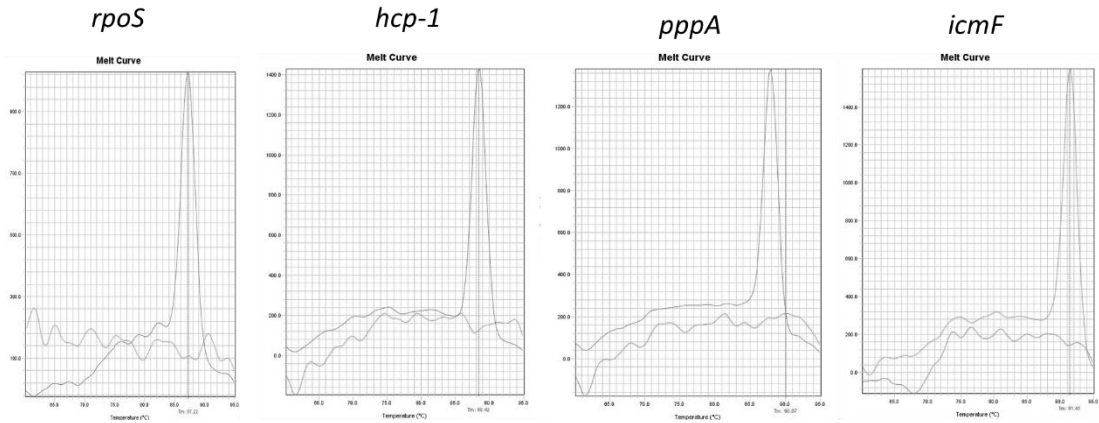


Figura 22: Análisis de las curvas de disociación después de la amplificación por qPCR del cDNA generado. Se observan picos únicos (control positivo) y señal correspondiente a ruido (control negativo) para cada par de primers evaluados.

4.2. Expresión de genes involucrados en la adaptación.

Al compararse con el ancestro, los aislamientos subsecuentes mostraron una sobreexpresión del gen *icmF* y *pppA* en todos los casos, excepto en el aislamiento del 10/2018, donde se observó una subexpresión que no fue estadísticamente significativa. Por su parte, el gen *hcp-1* mostró una sobreexpresión inicial con una tendencia a disminuir. Al comprarse contra la cepa ATCC 27853, se observó sobreexpresión en todos los casos para el gen *hcp-1*, excepto en dos aislamientos. Además, la sobreexpresión del gen *pppA* fue 100 veces mayor (100-fold) al compararse con la sobreexpresión utilizando el primer aislamiento como calibrador (10-fold), como se muestra en la Figura 23.

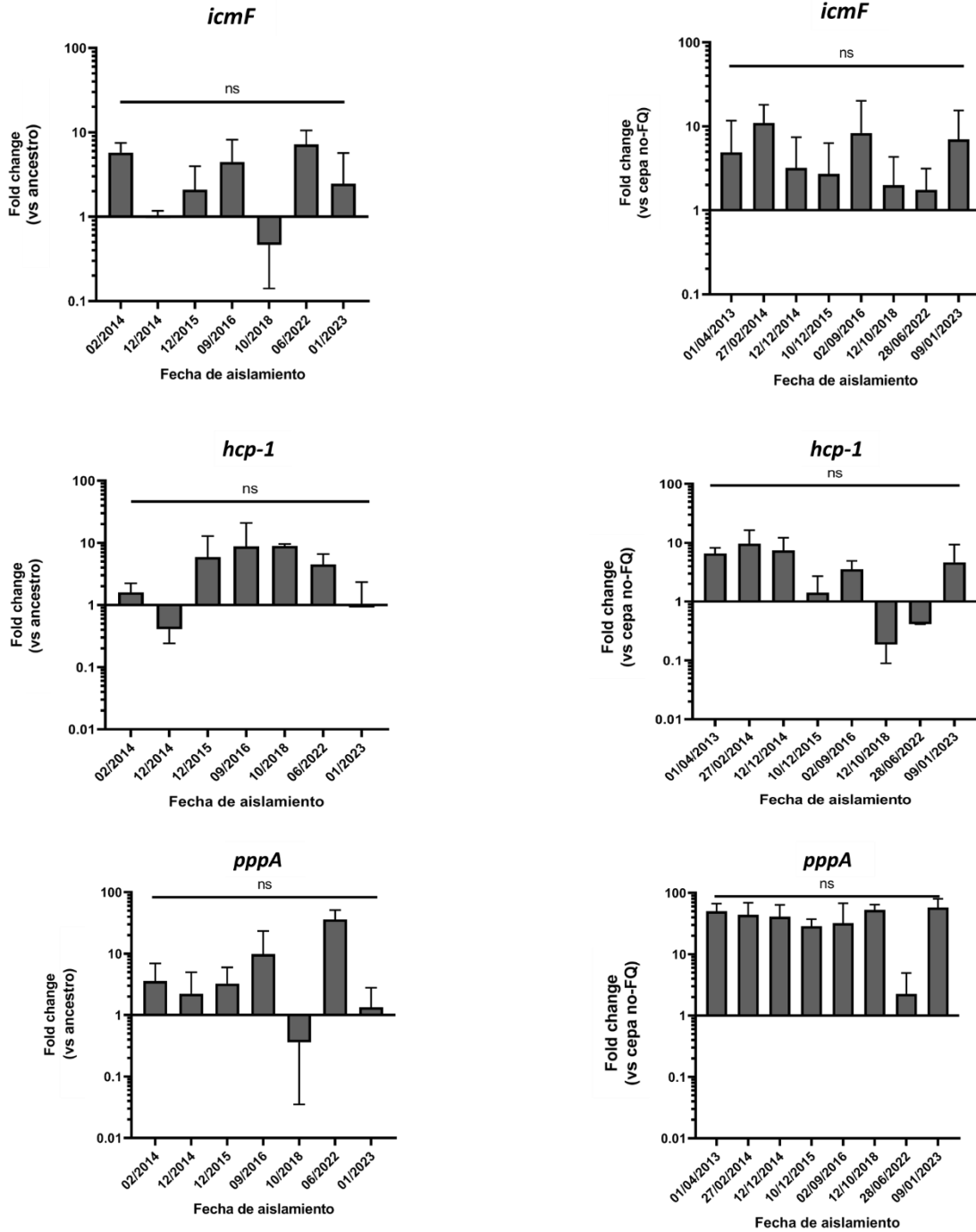


Figura 23: resultados de expresión relativa para los distintos genes evaluados empleando el primer aislamiento como calibrador (izquierda) y la cepa de referencia ATCC 27853 (derecha).

DISCUSIÓN

Para la evaluación de la calidad de los ensamblados, se consideraron todos los genomas públicos disponibles de *P. aeruginosa* en el BV-BRC. Estos genomas se filtraron de acuerdo con los siguientes parámetros: calidad de ensamblado considerada buena según BV-BRC, genomas secuenciados en la plataforma Illumina, porcentaje de GC > 62% y tamaño del genoma > 5 Mb. Así, se obtuvo un total de 6,923 genomas. Los datos fueron promediados y utilizados y comparados con las métricas de calidad obtenidas (anexo 6). Todos los ensamblados presentaron un número de contigs y un contig L50 menor al promedio, a pesar de presentar valores menores de N50, lo cual refleja un ensamblado de genomas adecuado. Los valores de tamaño de genoma, contenido de GC y completitud/contaminación fueron consistentes con lo reportado por el BV-BRC.

El análisis de MLST, wgMLST y filogenia basada en SNPs demostró una distribución no clonal entre los pacientes, lo que indica que no hubo transmisión entre ellos, a pesar de ser atendidos en el mismo centro. Esto es consistente con lo reportado en un estudio previo del grupo de trabajo, en el que al analizar aislamientos clínicos (no relacionados a la fibrosis quística), se encontró una distribución no-clonal para *P. aeruginosa* (44). Por otro lado, en los casos donde se obtuvieron muestras longitudinales, se observó la permanencia de una clona a lo largo del tiempo. Estos hallazgos son consistentes con lo reportado en la literatura, en donde se observa una tendencia de cepas a adaptarse a lo largo del tiempo y permanecer en el paciente durante toda su vida (46, 61-66). Los aislamientos esporádicos de clonas ajenas a la establecida en el caso del paciente 1 (ST934 y ST1800) han sido reportados en estudios previos (64, 65), sin embargo, esto no es algo frecuente.

Al comparar los resistomas generados por EpiSeq CS, no se observa un patrón compartido entre distintas cepas. En los aislamientos longitudinales, se observaron solo dos cambios, ambos relevantes. El primero corresponde a la ganancia de una mutación en *gyrA*, asociada a la resistencia a quinolonas, y el segundo a la pérdida del gen de resistencia a aminoglucósidos *aadA6* en el año 2017. Según la base de datos comprensiva de la resistencia (CARD) (67), existe una prevalencia del 40% para mutaciones en *gyrA* y menos del 1% para *aadA6* en genomas públicos de *P. aeruginosa* en bases de datos de NCBI. Un hallazgo

importante es la pérdida de este último gen, ya que es un fenómeno que no ha sido reportado y posiblemente esté asociado a la presencia de mecanismos de resistencia alternativos como son la pérdida del antígeno-O (ausencia de genes del operón *wbp*) (68) o asociados a la producción de componentes de la biopelícula (10, 69). De manera interesante, al comparar los resistomas de las cepas de este estudio con el de cepas no provenientes de pacientes con fibrosis quística, se observa que estas últimas demuestran un resistoma de mayor diversidad. Estas cepas presentan una mayor proporción de genes de resistencia a aminoglucósidos, así como betalactamasas de relevancia epidemiológica (44).

Al comparar el resistoma de los aislamientos de ambos centros, se observa una elevada frecuencia de genes que codifican betalactamasas tipo *bla_{OXA}*, que en general tienen una baja prevalencia (anexo 7), así como cefalosporinasas derivadas de *Pseudomonas* (*bla_{PDC}*). La mayoría de las betalactamasas tipo *PDC* identificadas tienen una prevalencia cercana al 0% (anexo 7), probablemente debido a su naturaleza polimórfica como betalactamasa cromosómica (70). Es importante destacar que la cepa establecida del paciente 1 presentó una mayor diversidad y espectro de acción en su resistoma en comparación con las cepas no relacionadas del mismo paciente. Esto probablemente desempeñe un papel crucial en la no permanencia de estas últimas cepas, que además mostraron un perfil de mayor susceptibilidad a los antibióticos evaluados. El hallazgo de una menor concentración mínima inhibitoria al evaluar ceftazidima junto con avibactam en comparación con ceftazidima sola sugiere que la resistencia a este antibiótico se debe a la presencia de betalactamasas, lo que indica la participación de las enzimas mencionadas anteriormente.

En cuanto al viruloma de las cepas, se observa una tendencia a poseer pocos factores de virulencia. En general, se observa una ausencia de genes relacionados con la dinámica y estructura del flagelo (*flaI/flag*, *fleP*, *flgK*, *flgL*, *filC*, *filD* y *filS*), síntesis de lipopolisacárido (*hisF-1*, *hisH-1*, *wbpA*, *wbpB*, *wbpC*, *wbpD*, *wbpE*, *wbpG*, *wbpH*, *wbpI*, *wbpJ*, *wbpK* y *wbpL*), síntesis del antígeno-O (*wzx*, *wzy* and *wzz*) biogénesis y estructura de pili tipo-IV (*pilA* y *pilB*) y metabolismo de pioverdina (*fpvA*, *pvdE*, *pvdJ*, *pvdP*). Este patrón de viruloma fue observado en la mayoría de las cepas, a excepción de los aislamientos del paciente 2, los cuales exhibieron una mayor frecuencia de genes de virulencia, como *exoY* (exotoxina secretada), *phzA1* (síntesis de fenazinas), *pvdA*, *pvdF* (pioverdina) y *vgrG1b* (sistema de

secreción tipo-III). Además, al comparar las cepas no relacionadas del paciente 1 con la cepa establecida, se observa una mayor virulencia *in silico* en las primeras, ya que poseen una frecuencia más alta de genes relacionados a la estructura del flagelo, el sistema de secreción tipo III y la producción de pioverdina.

En general, los genes que tienden a estar ausentes se localizan en la superficie de *P. aeruginosa* y han visto asociados con la respuesta inmunológica, como la activación de receptores tipo toll (TLRs) por parte de la flagelina y antígeno-O (71), así como la activación del inflamósoma por parte de pilis de tipo IV (72). Esto sugiere una menor detección por parte del sistema inmunológico en aquellas cepas que carecían de estos genes, como la cepa establecida del paciente 1 y cepas del paciente 3.

Estos hallazgos son consistentes con lo observado en la literatura, donde se ha documentado una disminución a lo largo del tiempo de la capacidad siderófora (relacionada a la producción de pioverdina) (46, 63-65, 73), al igual que en la actividad elastolítica. Este último aspecto fue confirmado a nivel fenotípico en la cepa establecida del paciente 1, lo cual concuerda con los hallazgos de Llanos *et al.* (74), quienes describieron una producción de elastasa.

En cuanto a la motilidad, aunque varias cepas presentaron la ausencia de genes relacionados con la motilidad dependiente de flagelo (swimming y swarming), ésta fue relativamente común para la motilidad por nado (80%) y considerablemente menor para la motilidad tipo swarming (28%). Por su parte, la motilidad dependiente de pili de tipo-IV (twitching) fue prácticamente ausente en los aislamientos, lo cual probablemente se deba a la ausencia del gen *pilA* en todos los aislamientos evaluados (75). Ésto es consistente con lo reportado en la literatura, ya que la pérdida de pilinas superficiales se aceptada como un cambio pato-adaptativo en el contexto de la adaptación al paciente con fibrosis quística (10, 45, 46).

A pesar de carecer de varios genes involucrados en el flagelo, la motilidad dependiente de este organelo es conservada a nivel fenotípico en varios aislamientos, como se mencionó anteriormente, los genes ausentes son en su mayoría superficiales, mientras que la estructura basal del flagelo se mantiene íntegra (71), sugiriendo un papel crucial de los

genes altamente conservados para la motilidad tipo swimming. La pérdida de la motilidad se reconoce como un cambio adaptativo común en gran parte de la literatura (10, 45, 72). Sin embargo, estudios como el presente y el realizado por el grupo de Cramer *et al.* (64) reportan resultados opuestos, mostrando un aumento y mantenimiento de la motilidad dependiente de flagelo y pilis tipo-IV. Esto puede asociarse al hecho de que varios estudios se limitan a una caracterización a nivel genómico y no a nivel fenotípico.

Para la producción de biopelícula, solo el 56% de los aislamientos fueron clasificados como productores, lo cual resulta controversial, ya que la transición a una vida en biopelícula se considera un cambio pato-adaptativo común en el contexto de la adaptación al paciente con fibrosis quística (76, 77). A pesar de esto, al compararse con estudios que evalúan esta capacidad utilizando el mismo modelo de biopelícula empleado, se obtienen resultados similares. En estos estudios, una proporción considerable de cepas son catalogadas como no productoras de biopelícula y una baja cantidad fueron productoras fuertes (78, 79). Es de suma importancia considerar las limitaciones del modelo de biopelícula empleado. Por ejemplo, un estudio de evolución *in vitro* realizado por Vandeplassche *et al.* (80) demostró un aumento en la capacidad de producción de biopelícula a lo largo del tiempo utilizando un modelo desarrollado por su grupo de trabajo, mientras que se observó una disminución al evaluar esto mediante el método de placa de 96-pocillios. Además, es crucial tener en cuenta que hasta la fecha no existe un modelo de biopelícula accesible que considere la alta complejidad del microambiente presente en los pacientes con fibrosis quística, que incluye el sistema inmunológico, condiciones osmóticas, y la microbiota aerobia y anaerobia.

A pesar de lo mencionado anteriormente, el análisis genómico reveló una alta conservación de los genes relacionados con la producción de biopelícula (operón *pel*, *psl*, *alg*, *las* y *rhl*). Esto refuerza la idea de que la capacidad de formación de biopelícula es una característica mantenida *in vivo*, pero no es observada *in vitro* debido a cuestiones metodológicas. Por otro lado, la disminución en la tasa de crecimiento observada en los aislamientos del paciente 1 también se ha considerado como un cambio característico de cepas adaptadas al paciente con fibrosis quística, según el estudio de Yang *et al.* en el año 2008 (81). Existe evidencia que relaciona esta disminución en la tasa de crecimiento con un

aumento en la resistencia a antibióticos, especialmente en *P. aeruginosa* aislada de pacientes con fibrosis quística (27).

Todos los aislamientos longitudinales mostraron una tasa de mutación que, según Camus *et al.* (46), podrían considerarse como hipermutantes. Sin embargo, la cepa del paciente 2 presentó una tasa de mutación considerablemente mayor, lo que probablemente esté asociado con mutaciones en la enzima reparadora de DNA *mutL* (82). La hipermutabilidad es un fenómeno común en las cepas provenientes de pacientes con fibrosis quística, ya que favorece la adaptación mediante la selección de variantes o mutantes beneficiosas en este contexto (50, 64, 83). Esto se ve reflejado en el hecho de que la mayoría de las variantes o mutaciones afectan genes involucrados en la regulación a nivel transcripcional, en el metabolismo energético, y la resistencia a antibióticos y otros estresores. Además, la alta proporción de elementos del moviloma, aunque no ampliamente estudiada, se ha relacionado principalmente con la presencia de islas de patogenicidad y profagos (46); sin embargo, estos elementos no fueron considerados en este estudio.

Finalmente, el análisis de expresión de genes involucrados en la adaptación fue consistente con lo reportado por Camus *et al.* (46), donde se observó una sobreexpresión de los genes *pppA*, *icmF* y *pppA* al comparar cepas de aislamiento reciente con sus ancestros. Sin embargo, este patrón fue opuesto al compararse con una cepa no relacionada con el ambiente de fibrosis quística, ya que este grupo de trabajo reportó una subexpresión. Esto puede estar asociado al uso de diferentes modelos experimentales, dado que Camus *et al.* compararon los niveles de expresión con la cepa PAO1 en un modelo de cultivo en placa.

Los genes evaluados están involucrados en el sistema de secreción tipo VI, siendo *pppA* notablemente sobreexpresado, especialmente en comparación contra la cepa no proveniente de pacientes con fibrosis quística. Este gen promueve la disociación de *hcp-1* (84), el cual juega un rol tanto en la formación de biopelícula (en su forma polimerizada) como en la citotoxicidad (en su forma disociada) (85). La sobreexpresión de *pppA* sugiere una mayor promoción de la adhesión y una reducción del efecto citotóxico.

Aunque estos resultados fueron obtenidos en un modelo monoclonal *in vitro*, el hecho de que *pppA* esté sobreexpresado en comparación con el primer aislamiento y con una cepa

que no relacionada con fibrosis quística indica una tendencia hacia una mayor agregación y formación de biopelícula.

CONCLUSIONES

- No se encontró evidencia de transmisión de cepas entre pacientes o centros de atención (distribución no clonal), y se detectó la persistencia de una misma cepa a lo largo del tiempo en los pacientes con aislamientos longitudinales.
- Las cepas ST829 (paciente 1) y ST2234 (paciente 3) presentan características de cepas adaptadas al paciente con fibrosis quística, a diferencia de la ST244 (paciente 2).
- Los aislamientos no relacionados del paciente 1 (ST1800 y ST934) son más virulentos *in silico* comparándose con la cepa establecida (ST829).
- No se encontró una correlación genotipo-fenotipo entre la motilidad dependiente de flagelo y la producción de biopelícula.

ANEXOS

Anexo 1: Secuencias de primers utilizadas.

<i>hcp_fw</i> : 5' – CCTGGTGTCCCTCGGTG – 3'
<i>hcp_rv</i> : 5' – CTTCTGCCGGCTGGTAGTC – 3'
<i>icmF_fw</i> : 5' – CATCGCCATCAGCCTTTC – 3'
<i>icmF_rv</i> : 5' – GAACTTGGTCAGCATCACG – 3'
<i>pppA_fw</i> : 5' – GTGCCCAACTCAGTCAGC – 3'
<i>pppA_rv</i> : 5' – CGACCACCCAGAGTCCC – 3'

Anexo 2: Distribución de las muestras incluidas en el estudio, ordenadas por fecha de aislamiento

Muestra	Fecha de aislamiento	Paciente	Hospital
A693	28/04/2014	2	Hospital de especialidades pediátricas
A697	01/04/2013	1	Hospital de especialidades pediátricas
B699	23/01/2012	5	Hospital de especialidades pediátricas
A700	23/04/2015	2	Hospital de especialidades pediátricas
A701	16/04/2015	1	Hospital de especialidades pediátricas
A703	27/02/2014	1	Hospital de especialidades pediátricas
A705	12/12/2014	1	Hospital de especialidades pediátricas
A708	05/12/2014	3	Hospital de especialidades pediátricas
A709	02/12/2014	2	Hospital de especialidades pediátricas
A710	10/12/2015	1	Hospital de especialidades pediátricas
AP723	19/04/2016	3	Hospital de especialidades pediátricas
AM723	19/04/2016	3	Hospital de especialidades pediátricas
A725	11/12/2015	2	Hospital de especialidades pediátricas
A734	19/04/2016	1	Hospital de especialidades pediátricas
A743	16/12/2016	2	Hospital de especialidades pediátricas
A747	13/09/2016	3	Hospital de especialidades pediátricas
A748	02/09/2016	1	Hospital de especialidades pediátricas
A765	12/07/2017	3	Hospital de especialidades pediátricas
A766	30/06/2017	2	Hospital de especialidades pediátricas
A768	24/04/2017	1	Hospital de especialidades pediátricas
A771	11/11/2020	1	Hospital de especialidades pediátricas
A773	06/03/2019	6	Hospital de especialidades pediátricas
AG774	12/10/2018	1	Hospital de especialidades pediátricas
AP774	12/10/2018	1	Hospital de especialidades pediátricas
A776	18/05/2018	7	Hospital de especialidades pediátricas
A778	02/03/2018	1	Hospital de especialidades pediátricas
A780	22/11/2017	1	Hospital de especialidades pediátricas
A928	06/07/2018	8	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
A931	30/07/2019	9	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
A942	19/05/2018	10	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
A949	02/04/2018	11	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
A961	08/03/2020	4	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
B972	11/07/2019	4	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
A2152	02/07/2021	1	Hospital de especialidades pediátricas
A2155	03/11/2021	1	Hospital de especialidades pediátricas
A2158	09/02/2022	1	Hospital de especialidades pediátricas
AG2160	28/06/2022	1	Hospital de especialidades pediátricas
AP2160	28/06/2022	1	Hospital de especialidades pediátricas
A2162	09/01/2023	1	Hospital de especialidades pediátricas

Anexo 3: Evaluación de la calidad del DNA por el servicio externo Novogene CSS.

No.	Muestra	Concentración (ng/μl)	Volumen (μl)	Cantidad (μg)	Interpretación
1	A693	62.6	89	5.5714	Aceptable
2	A697	112.4	89	10.0036	Aceptable
4	B699	101.2	91	9.2092	Aceptable
5	A700	144.8	89	12.8872	Aceptable
6	A701	136.4	93	12.6852	Aceptable
7	A703	228	40	9.12	Aceptable
8	A705	182.4	41	7.4784	Aceptable
9	A708	162.4	47	7.6328	Aceptable
10	A709	65.6	91	5.9696	Aceptable
11	A710	165.6	82	13.5792	Aceptable
12	AP723	20	101	2.02	Aceptable
13	AM723	78.4	91	7.1344	Aceptable
14	A725	195.6	95	18.582	Aceptable
15	A734	79.8	91	7.2618	Aceptable
16	A743	26.4	91	2.4024	Aceptable
17	A747	65.2	94	6.1288	Aceptable
18	A748	148.8	89	13.2432	Aceptable
19	B765	20.4	94	1.9176	Aceptable
20	A766	173.6	92	15.9712	Aceptable
21	A768	142.8	95	13.566	Aceptable
22	A771	204	92	18.768	Aceptable
23	A773	174.4	92	16.0448	Aceptable
24	AG774	136	90	12.24	Aceptable
25	AP774	47.4	86	4.0764	Aceptable
26	A776	120	92	11.04	Aceptable
27	A778	114	92	10.488	Aceptable
28	A780	108	94	10.152	Aceptable
29	A928	118	94	11.092	Aceptable
30	A931	110	90	9.9	Aceptable
31	A942	116	96	11.136	Aceptable
32	A949	116	94	10.904	Aceptable
33	A961	19.2	84	1.6128	Aceptable
34	B972	42.4	83	3.5192	Aceptable
35	A2152	104	93	9.672	Aceptable
36	A2155	97.6	92	8.9792	Aceptable
37	A2158	114	94	10.716	Aceptable
38	AG2160	108	93	10.044	Aceptable
39	AP2160	12.2	90	1.098	Aceptable
40	A2162	76.8	92	7.0656	Aceptable

No.: número de muestra interno del servicio externo.

Aceptable: calidad adecuada para la preparación de la biblioteca.

Anexo 4: Variantes acumuladas de aislamientos longitudinales.

Paciente 1					
Posición	Tipo	Región	Hebra	Gen	Producto
624	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
7557	del	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
16478	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
16932	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
17048	snp	Codificante	Sentido	gyrA	DNA gyrase subunit A
20857	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
25029	ins	Codificante	Sentido	lifO_1	Lipase chaperone
26227	del	Codificante	Antisentido	hexR_2	HTH-type transcriptional regulator HexR
27398	snp	Codificante	Sentido	lptE	LPS-assembly lipoprotein LptE
44192	del	Codificante	Antisentido	mexB_2	Multidrug resistance protein MexB
47381	del	Intergénica	N/A	N/A	N/A
55707	del	Codificante	Antisentido	mpl	UDP-N-acetylmuramate--L- alanyl-gamma-D-glutamyl- meso- 2,6-diaminoheptandioate ligase
57311	ins	Codificante	Sentido	apeB	putative M18 family aminopeptidase 2
60725	snp	Codificante	Antisentido	rpsC	30S ribosomal protein S3
64990	snp	Codificante	Antisentido	glmM_2	Phosphoglucosamine mutase
65988	snp	Codificante	Antisentido	fusA	Elongation factor G 1
72439	del	Intergénica	N/A	N/A	N/A
76132	snp	Codificante	Sentido	pyrC'	Dihydroorotase-like protein
78401	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
82512	snp	tRNA	Antisentido	N/A	tRNA-Thr
88979	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
106549	snp	Codificante	Antisentido	glyA_1	Serine hydroxymethyltransferase
106667	ins	Codificante	Antisentido	glyA_1	Serine hydroxymethyltransferase
106671	del	Codificante	Antisentido	glyA_1	Serine hydroxymethyltransferase
118562	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
120020	complex	Codificante	Sentido	ant1	Streptomycin 3"- adenyltransferase
120054	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
120060	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
122732	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
125611	del	Codificante	Antisentido	mucA	Sigma factor AlgU negative regulatory protein

125676	ins	Codificante	Antisentido	mucA	Sigma factor AlgU negative regulatory protein
139627	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
141001	ins	Codificante	Antisentido	ptsP	Phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system
171379	snp	Codificante	Sentido	accC_1	Biotin carboxylase
172044	snp	Codificante	Sentido	accC_1	Biotin carboxylase
197967	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
227132	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
246520	snp	Codificante	Antisentido	opgH	Glucans biosynthesis glucosyltransferase H
252331	snp	Codificante	Sentido	citG	2-(5"-triphosphoribosyl)-3'-dephosphocoenzyme-A synthase
262187	ins	Codificante	Sentido	copA_5	Copper resistance protein A
316397	snp	Codificante	Sentido	norG_1	HTH-type transcriptional regulator NorG
351380	snp	Codificante	Antisentido	abaF	Fosfomicin resistance protein AbaF
392294	del	Codificante	Antisentido	rscC_4	Sensor histidine kinase RcsC
411643	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
414801	snp	Codificante	Sentido	fadD3	3-[(3aS,4S,7aS)-7a-methyl-1, 5-dioxo-octahydro-1H-inden-4-yl]propanoyl:CoA ligase
421862	snp	Codificante	Antisentido	yaaA	Peroxide stress resistance protein YaaA
474730	snp	Codificante	Antisentido	argO	Arginine exporter protein ArgO
500509	del	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
517082	ins	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
533960	del	Codificante	Sentido	lasR	Transcriptional activator protein LasR
633352	complex	Intergénica	N/A	N/A	N/A
677214	ins	Codificante	Antisentido	glnQ_2	Glutamine transport ATP-binding protein GlnQ
695225	ins	Codificante	Sentido	rhtA	Threonine/homoserine exporter RhtA
904142	del	Intergénica	N/A	N/A	N/A
991651	del	Codificante	Antisentido	alyA_2	Alginate lyase
1129717	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética

Paciente 2					
Posición	Tipo	Región	Hebra	Gen	Producto
55	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
82	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
94	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
115	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
121	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
130	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
177	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
227	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
283	del	Intergénica	N/A	N/A	N/A
458	snp	Codificante	Sentido	pqqA	Coenzyme PQQ synthesis protein A
484	del	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
561	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
652	snp	Codificante	Sentido	pstS	Phosphate-binding protein PstS
735	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
1121	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
1388	snp	Codificante	Antisentido	msrP	Protein-methionine-sulfoxide reductase catalytic subunit MsrP
1681	snp	Codificante	Sentido	pqqC	Pyrroloquinoline-quinone synthase
1808	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
1865	snp	Codificante	Sentido	fpvA_2	Ferripyoverdine receptor
1874	snp	Codificante	Sentido	nodD2_1	Nodulation protein D 2
2071	del	Intergénica	N/A	N/A	N/A
2097	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
2496	snp	Codificante	Sentido	exaA	Quinoprotein alcohol dehydrogenase (cytochrome c)
2723	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
2813	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
2945	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
2981	snp	Codificante	Sentido	davD	Glutarate-semialdehyde dehydrogenase
3062	snp	Codificante	Sentido	tufA_1	Elongation factor Tu
3083	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
3330	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
3481	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
3865	snp	Codificante	Antisentido	aer	Aerotaxis receptor
4186	snp	Codificante	Sentido	ubiX	Flavin prenyltransferase UbiX
4496	snp	Codificante	Sentido	zapE_1	Cell division protein ZapE
4754	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A

4840	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
4939	snp	rRNA	Sentido	N/A	23S ribosomal RNA
5158	del	Codificante	Antisentido	sulA_2	Cell division inhibitor Sula
5545	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
5716	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
5746	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
5892	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
6050	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
6090	snp	Codificante	Sentido	oqxB7	multidrug efflux RND transporter permease subunit OqxB7
6674	snp	Codificante	Sentido	tyrS_2	Tyrosine--tRNA ligase
6798	del	Codificante	Sentido	spuE_3	Spermidine-binding periplasmic protein SpuE
7311	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
7684	snp	Codificante	Antisentido	rcsC_15	Sensor histidine kinase RcsC
8287	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
8552	ins	Codificante	Sentido	acoC	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of acetoin cleaving system
8598	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
9146	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
9783	snp	Codificante	Antisentido	yofA_1	HTH-type transcriptional regulator YofA
9814	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
9861	snp	Codificante	Antisentido	mrcB	Penicillin-binding protein 1B
10187	snp	Codificante	Sentido	sdiA	Regulatory protein SdiA
10332	ins	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
11250	snp	Codificante	Sentido	farB_2	Fatty acid resistance protein FarB
11298	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
11345	snp	Codificante	Antisentido	yycB_3	putative transporter YycB
11540	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
11656	del	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
12077	del	Codificante	Sentido	farB_2	Fatty acid resistance protein FarB
12209	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
12269	del	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
12507	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
13394	snp	Codificante	Antisentido	xpsE	Type II secretion system protein E
13826	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
13852	snp	Codificante	Antisentido	btuB_9	Vitamin B12 transporter BtuB
14597	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
14744	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A

15333	snp	Codificante	Sentido	menH_3	2-succinyl-6-hydroxy-2, 4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase
15594	snp	Codificante	Antisentido	dhaT_2	1,3-propanediol dehydrogenase
16082	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
16330	ins	Codificante	Antisentido	eptA_2	Phosphoethanolamine transferase EptA
16617	snp	Codificante	Sentido	rpsL	30S ribosomal protein S12
17041	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
17250	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
17982	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
18650	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
18708	snp	Codificante	Antisentido	hpcH	4-hydroxy-2-oxo-heptane-1,7-dioate aldolase
18718	ins	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
18839	snp	Codificante	Sentido	dctD_3	C4-dicarboxylate transport transcriptional regulatory protein DctD
18885	ins	Codificante	Antisentido	hemS	Hemin transport protein HemS
19145	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
19353	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
19382	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
19527	del	Intergénica	N/A	N/A	N/A
19861	snp	Codificante	Antisentido	fliY_2	L-cystine-binding protein FliY
20458	snp	Codificante	Sentido	hemR	Hemin receptor
20492	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
20632	snp	Codificante	Sentido	hemR	Hemin receptor
20719	ins	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
20914	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
20984	snp	Codificante	Sentido	fecR_6	Protein FecR
21118	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
21326	snp	Codificante	Antisentido	norR_3	Anaerobic nitric oxide reductase transcription regulator NorR
21661	snp	Codificante	Sentido	puuB_7	Gamma-glutamylputrescine oxidoreductase
21770	snp	Codificante	Sentido	rhIE_4	ATP-dependent RNA helicase RhIE
22502	snp	Codificante	Sentido	ybiT	putative ABC transporter ATP-binding protein YbiT
22807	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
23142	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A

23979	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
25306	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
25721	snp	Codificante	Antisentido	cysL_2	HTH-type transcriptional regulator CysL
25971	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
26038	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
26080	snp	Codificante	Antisentido	zipA	Cell division protein ZipA
26270	snp	Codificante	Antisentido	uppP	Undecaprenyl-diphosphatase
26940	snp	Codificante	Sentido	yefF_2	putative ABC transporter ATP-binding protein YefF
28411	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
28445	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
28792	snp	Codificante	Sentido	rplR	50S ribosomal protein L18
29414	snp	Codificante	Sentido	fabY	Beta-ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase FabY
29623	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
29913	snp	Codificante	Sentido	hcf136_2	Ycf48-like protein
30411	snp	Codificante	Sentido	lcdH_1	L-carnitine dehydrogenase
31083	snp	Codificante	Antisentido	bauD	putative GABA permease
31177	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
31624	snp	Codificante	Antisentido	potB	Spermidine/putrescine transport system permease protein PotB
32966	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
33331	del	Codificante	Sentido	N/A	5'-nucleotidase
36198	snp	Codificante	Sentido	N/A	Beta-peptidyl aminopeptidase BapA
36538	snp	Codificante	Antisentido	novN	Decarbamoylnovobiocin carbamoyltransferase
36656	snp	Codificante	Sentido	sucD	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha
36680	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
37238	snp	Codificante	Antisentido	lgrB_2	Linear gramicidin synthase subunit B
37385	snp	Codificante	Antisentido	novN	Decarbamoylnovobiocin carbamoyltransferase
37765	snp	Codificante	Sentido	brnQ_1	Branched-chain amino acid transport system 2 carrier protein
38105	snp	Codificante	Sentido	brnQ_1	Branched-chain amino acid transport system 2 carrier protein
38278	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
38662	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética

38947	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
39019	snp	Codificante	Antisentido	lgrB_2	Linear gramicidin synthase subunit B
39063	snp	Codificante	Sentido	rcsC_14	Sensor histidine kinase RcsC
40370	snp	Codificante	Antisentido	miaB	tRNA-2-methylthio-N(6)- dimethylallyl adenosine synthase
40692	snp	Codificante	Antisentido	acrE	Multidrug export protein AcrE
41287	del	Codificante	Sentido	ttgR	HTH-type transcriptional regulator TtgR
42874	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
42973	snp	Codificante	Sentido	htpG_2	Chaperone protein HtpG
43428	snp	Codificante	Antisentido	pchB	Isochorismate pyruvate lyase
43561	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
43623	ins	Codificante	Antisentido	cdhR_4	HTH-type transcriptional regulator CdhR
43724	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
44291	snp	Codificante	Antisentido	mdtC_1	Multidrug resistance protein MdtC
45678	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
48443	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
49086	snp	Codificante	Sentido	aidB	Putative acyl-CoA dehydrogenase AidB
49298	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
50556	snp	Codificante	Sentido	norG_4	HTH-type transcriptional regulator NorG
50572	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
50582	snp	Codificante	Antisentido	aaeB_6	p-hydroxybenzoic acid efflux pump subunit AaeB
52085	snp	Codificante	Sentido	ssuB_2	Aliphatic sulfonates import ATP- binding protein SsuB
52799	snp	Codificante	Sentido	cmoA_2	Carboxy-S-adenosyl-L-methionine synthase
53053	snp	Codificante	Sentido	dmlR_23	HTH-type transcriptional regulator DmlR
55040	snp	Codificante	Antisentido	paoB	Aldehyde oxidoreductase FAD-binding subunit PaoB
55444	del	Intergénica	N/A	N/A	N/A
56030	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
56230	del	Intergénica	N/A	N/A	N/A
57184	snp	Codificante	Antisentido	ompR_3	Transcriptional regulatory protein OmpR

60489	snp	Codificante	Antisentido	metE	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase
62573	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
62597	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
62887	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
63406	mnp	Codificante	Sentido	fptA	Fe(3+)-pyochelin receptor
63557	del	Intergénica	N/A	N/A	N/A
63794	snp	Codificante	Antisentido	hpaB_2	4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase oxygenase component
63818	snp	Codificante	Sentido	fptA	Fe(3+)-pyochelin receptor
63871	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
63941	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
64441	del	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
65879	snp	Codificante	Antisentido	folP	Dihydropteroate synthase
67153	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
67308	snp	Codificante	Sentido	ssuD_3	Alkanesulfonate monooxygenase
67494	snp	Codificante	Antisentido	phzS	5-methylphenazine-1-carboxylate 1-monooxygenase
67894	del	Intergénica	N/A	N/A	N/A
68410	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
68538	snp	Codificante	Sentido	N/A	L-lactate transporter
69159	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
69714	snp	Codificante	Antisentido	greA	Transcription elongation factor GreA
70035	snp	Codificante	Sentido	menH_4	2-succinyl-6-hydroxy-2, 4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase
70112	snp	Codificante	Antisentido	nimR_10	HTH-type transcriptional regulator NimR
70116	snp	Codificante	Sentido	pbuE_3	Purine efflux pump PbuE
70140	del	Codificante	Sentido	malT_6	HTH-type transcriptional regulator MalT
70235	snp	Codificante	Antisentido	carB	Carbamoyl-phosphate synthase large chain
70442	snp	Codificante	Sentido	menH_4	2-succinyl-6-hydroxy-2, 4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase

70586	snp	Codificante	Sentido	malT_6	HTH-type transcriptional regulator MalT
70717	del	Codificante	Antisentido	cirA	Colicin I receptor
72245	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
73887	ins	Codificante	Sentido	rng	Ribonuclease G
74852	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
75179	snp	Codificante	Antisentido	lldR_1	Putative L-lactate dehydrogenase operon regulatory protein
75672	del	Intergénica	N/A	N/A	N/A
76453	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
77222	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
77659	snp	Codificante	Sentido	bvgS_2	Virulence sensor protein BvgS
77820	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
79196	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
79547	snp	Codificante	Sentido	yedA_2	putative inner membrane transporter YedA
80564	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
81567	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
81574	snp	Codificante	Sentido	fecR_5	Protein FecR
82235	snp	Codificante	Antisentido	lgrD	Linear gramicidin synthase subunit D
82591	snp	Codificante	Antisentido	acsA_1	Acetyl-coenzyme A synthetase
82679	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
83251	snp	Codificante	Sentido	pmbA	Metalloprotease PmbA
84034	snp	Codificante	Antisentido	N/A	Glycine betaine transporter
84786	snp	Codificante	Antisentido	pdhR	Pyruvate dehydrogenase complex repressor
85773	ins	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
86525	del	Codificante	Sentido	sasA_8	Adaptive-response sensory-kinase SasA
87892	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
88433	snp	Codificante	Antisentido	ygfZ	tRNA-modifying protein YgfZ
88897	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
89574	ins	Codificante	Sentido	malK	Maltose/maltodextrin import ATP-binding protein MalK
90632	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
91691	snp	Codificante	Antisentido	lptB_3	Lipopolysaccharide export system ATP-binding protein LptB
91740	snp	Codificante	Antisentido	entS_3	Enterobactin exporter EntS
91933	snp	Codificante	Sentido	algU_2	RNA polymerase sigma-H factor
92420	snp	Codificante	Sentido	speE_2	Polyamine aminopropyltransferase

93007	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
93184	snp	Codificante	Sentido	seU	tRNA 2-selenouridine synthase
93705	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
93859	snp	Codificante	Antisentido	ompW	Outer membrane protein W
94149	snp	Codificante	Antisentido	yigB	5-amino-6-(5-phospho-D-riboitylamino)uracil phosphatase YigB
95643	snp	Codificante	Sentido	mIaF	Intermembrane phospholipid transport system ATP-binding protein MlaF
97823	ins	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
97875	snp	Codificante	Antisentido	adh	Alcohol dehydrogenase
99109	snp	Codificante	Antisentido	ascD	CDP-6-deoxy-L-threo-D-glycero-4-hexulose-3- dehydrase reductase
99683	snp	Codificante	Sentido	metQ_2	D-methionine-binding lipoprotein MetQ
100293	snp	Codificante	Antisentido	N/A	Cyclic di-GMP phosphodiesterase
100742	snp	Codificante	Antisentido	nosL	Copper-binding lipoprotein NosL
101246	snp	Codificante	Antisentido	nosY	putative ABC transporter permease protein NosY
102081	snp	Codificante	Sentido	pdxJ	Pyridoxine 5'-phosphate synthase
102676	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
103232	snp	Codificante	Antisentido	cmoA_1	Carboxy-S-adenosyl-L-methionine synthase
103235	snp	Codificante	Antisentido	degS	Serine endoprotease DegS
103863	snp	Codificante	Antisentido	nosD	putative ABC transporter binding protein NosD
106286	snp	Codificante	Antisentido	kynA	Tryptophan 2,3-dioxygenase
107147	snp	Codificante	Antisentido	msuD_2	Methanesulfonate monooxygenase
108091	snp	Codificante	Antisentido	lon_1	Lon protease
108116	snp	Codificante	Sentido	cysNC	Bifunctional enzyme CysN/CysC
108218	snp	Codificante	Sentido	cysNC	Bifunctional enzyme CysN/CysC
108523	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
109632	snp	Codificante	Antisentido	sfnR_3	Sigma54-dependent transcriptional activator SfnR
109775	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
110903	snp	Codificante	Antisentido	N/A	putative TonB-dependent receptor
111571	snp	Codificante	Antisentido	dxs	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase
112136	snp	Codificante	Antisentido	rcsC_1	Sensor histidine kinase RcsC

112909	snp	Codificante	Antisentido	xseB	Exodeoxyribonuclease 7 small subunit
114287	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
114872	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
115385	snp	Codificante	Sentido	madA	Acetyl-S-ACP:malonate ACP transferase
115694	snp	Codificante	Sentido	clpV1_1	Protein ClpV1
117699	snp	Codificante	Antisentido	gcvA_1	Glycine cleavage system transcriptional activator
118217	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
118711	ins	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
119513	snp	Codificante	Sentido	cheR2	Chemotaxis protein methyltransferase Cher2
120601	del	Codificante	Sentido	acrA	Multidrug efflux pump subunit AcrA
121901	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
123945	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
124098	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
124675	snp	Codificante	Sentido	clpV1_2	Protein ClpV1
125773	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
125843	del	Intergénica	N/A	N/A	N/A
126404	snp	Codificante	Antisentido	fdoH	Formate dehydrogenase-O iron-sulfur subunit
127761	snp	Codificante	Sentido	kefB	Glutathione-regulated potassium-efflux system protein KefB
127989	ins	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
128100	snp	Codificante	Sentido	amiC_3	Aliphatic amidase expression-regulating protein
128967	snp	Codificante	Sentido	yknY	putative ABC transporter ATP-binding protein YknY
129701	snp	Codificante	Sentido	ftsI	Peptidoglycan D,D-transpeptidase FtsI
130161	snp	Codificante	Sentido	macB_1	Macrolide export ATP-binding/permease protein MacB
130618	snp	Codificante	Antisentido	ssuA_3	Putative aliphatic sulfonates-binding protein
132146	del	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
132344	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
132984	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
133339	snp	Codificante	Sentido	prmB	50S ribosomal protein L3 glutamine methyltransferase

136721	snp	Codificante	Sentido	folE2	GTP cyclohydrolase FolE2
136956	snp	Codificante	Sentido	ycaD_2	putative MFS-type transporter YcaD p-hydroxybenzoic acid efflux pump subunit AaeB
140560	snp	Codificante	Sentido	aaeB_4	proteína hipotética
141014	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
141469	ins	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
141757	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
141782	snp	Codificante	Sentido	speE_3	Polyamine aminopropyltransferase
143420	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética putative zinc-binding alcohol dehydrogenase
143812	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
143855	snp	Codificante	Antisentido	N/A	Ubiquinone biosynthesis O- methyltransferase, mitochondrial
145131	ins	Codificante	Antisentido	COQ3_5	
145206	snp	Codificante	Antisentido	yscU	Yop proteins translocation protein U
146120	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
147738	ins	Codificante	Antisentido	mntH_1	Divalent metal cation transporter MntH
150219	snp	Codificante	Antisentido	srlR	Glucitol operon repressor
150561	snp	Codificante	Sentido	slyA	Transcriptional regulator SlyA
150914	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
151036	snp	Codificante	Antisentido	malQ	4-alpha-glucanotransferase
151165	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
151726	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
151745	snp	Codificante	Sentido	yfcF	Glutathione S-transferase YfcF
153688	snp	Codificante	Sentido	yscX	Yop proteins translocation protein X
154034	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
155555	snp	Codificante	Antisentido	glgA	Glycogen synthase
156415	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
157049	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
157347	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
157478	snp	Codificante	Sentido	narK	Nitrate/nitrite transporter NarK
157597	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
159418	snp	Codificante	Antisentido	gltD_2	Glutamate synthase [NADPH] small chain
160020	snp	Codificante	Antisentido	parB	putative chromosome-partitioning protein ParB

160583	snp	Codificante	Antisentido	speA	Biosynthetic arginine decarboxylase
160755	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
162128	del	Intergénica	N/A	N/A	N/A
162454	del	Codificante	Sentido	narG	Respiratory nitrate reductase 1 alpha chain
163300	ins	Codificante	Sentido	pucI_2	putative allantoin permease
163506	snp	Codificante	Sentido	narY	Respiratory nitrate reductase 2 beta chain
163861	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
164925	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
165843	snp	Codificante	Antisentido	dhbF	Dimodular nonribosomal peptide synthase
166796	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
168634	del	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
168847	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
170380	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
172679	snp	Codificante	Antisentido	N/A	Beta-xylosidase
176958	del	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
176974	snp	Codificante	Antisentido	acrB_1	Multidrug efflux pump subunit AcrB
179351	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
184235	snp	Codificante	Sentido	pcs	Phosphatidylcholine synthase
184350	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
185453	snp	Codificante	Sentido	pdeB_2	putative cyclic di-GMP phosphodiesterase PdeB
185588	snp	Codificante	Sentido	amiC_1	Aliphatic amidase expression-regulating protein
186619	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
187808	snp	Codificante	Sentido	clpB	Chaperone protein ClpB
188817	snp	Codificante	Antisentido	rsmB	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase B
188827	ins	Codificante	Antisentido	gltJ_2	Glutamate/aspartate import permease protein GltJ
190716	snp	Codificante	Antisentido	def_2	Peptide deformylase
190959	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
190963	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
191573	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
191754	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
191862	snp	Codificante	Antisentido	yibF	putative GST-like protein YibF

192353	snp	Codificante	Sentido	argP_4	HTH-type transcriptional regulator ArgP
192477	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
192854	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
194524	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
197851	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
202978	snp	Codificante	Antisentido	betC	Choline-sulfatase
203176	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
203315	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
203593	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
203698	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
205147	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
206319	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
206424	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
207965	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
208462	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
209554	snp	Codificante	Sentido	hipO_2	Hippurate hydrolase
210075	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
211872	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
212893	ins	Codificante	Sentido	nimR_7	HTH-type transcriptional regulator NimR
215308	snp	Codificante	Sentido	ywiE_1	putative cardiolipin synthase YwiE
221535	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
223602	snp	Codificante	Sentido	zntB_1	Zinc transport protein ZntB
224309	snp	Codificante	Sentido	bioB	Biotin synthase
225299	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
225426	snp	Codificante	Sentido	uctC	Acetyl-CoA:oxalate CoA-transferase
226443	snp	Codificante	Sentido	oprF	Outer membrane porin F
228756	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
232841	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
232882	snp	Codificante	Sentido	argT_1	Lysine/arginine/ornithine-binding periplasmic protein
236069	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
236195	snp	Codificante	Sentido	hisP_2	Histidine transport ATP-binding protein HisP
238524	snp	Codificante	Antisentido	mftC	Putative mycofactocin radical SAM maturase MftC
241902	snp	Codificante	Antisentido	acnB	Aconitate hydratase B

243280	snp	Codificante	Sentido	astD	N-succinylglutamate 5-semialdehyde dehydrogenase
243779	snp	Codificante	Sentido	ybdL	Methionine aminotransferase
244746	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
245379	snp	Codificante	Sentido	astE	Succinylglutamate desuccinylase
250714	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
255049	del	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
256829	snp	Codificante	Antisentido	rstA	Transcriptional regulatory protein RstA
262543	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
264796	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
266085	ins	Codificante	Antisentido	cpdA_2	3',5'-cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterase CpdA
266562	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
271793	snp	Codificante	Antisentido	srpC	putative chromate transport protein
272097	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
272654	snp	Codificante	Antisentido	ldhA	D-lactate dehydrogenase
275496	snp	Codificante	Antisentido	hflK	Modulator of FtsH protease HflK
276754	ins	Codificante	Sentido	baeR_2	Transcriptional regulatory protein BaeR
278129	del	Intergénica	N/A	N/A	N/A
278580	snp	Codificante	Antisentido	mutL	DNA mismatch repair protein MutL
278608	snp	Codificante	Sentido	recC_2	RecBCD enzyme subunit RecC
279049	snp	Codificante	Antisentido	mutL	DNA mismatch repair protein MutL
280617	snp	Codificante	Sentido	pfeA_2	Ferric enterobactin receptor Membrane-bound lytic murein transglycosylase F
280620	snp	Codificante	Antisentido	mltF_2	transglycosylase F
282422	del	Intergénica	N/A	N/A	N/A
284122	snp	Codificante	Antisentido	yeH	6-phosphogluconate phosphatase
284928	ins	Codificante	Antisentido	rhIE_1	ATP-dependent RNA helicase RhIE
285987	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
287806	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
288338	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
292784	ins	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
295138	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
295728	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética

295864	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
296931	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
300325	ins	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
300658	snp	Codificante	Antisentido	sir_2	Sulfite reductase [ferredoxin]
302874	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
304843	snp	Codificante	Antisentido	metH	Methionine synthase
310661	snp	Codificante	Sentido	aspS	Aspartate--tRNA(Asp/Asn) ligase
315183	del	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
316066	snp	Codificante	Antisentido	pdxA	4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase
328049	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
333669	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
333872	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
334698	snp	Codificante	Sentido	gph	Phosphoglycolate phosphatase
339026	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
340987	snp	Codificante	Sentido	pqsB	2-heptyl-4(1H)-quinolone synthase subunit PqsB
341715	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
343878	snp	Codificante	Antisentido	msbA	Lipid A export ATP-binding/permease protein MsbA
344762	del	Intergénica	N/A	N/A	N/A
344973	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
347131	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
347996	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
350743	snp	Codificante	Sentido	wspC	putative biofilm formation methyltransferase WspC
352830	snp	Codificante	Antisentido	bcp	Peroxiredoxin Bcp
354019	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
366859	snp	Codificante	Antisentido	allR	HTH-type transcriptional repressor AllR
370070	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
374756	ins	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
375520	ins	Codificante	Sentido	paaF_1	2,3-dehydroadipyl-CoA hydratase
377019	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
379723	snp	Codificante	Sentido	mscK	Mechanosensitive channel MscK
382047	ins	Codificante	Sentido	gabD	Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP(+)]
383515	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
383583	snp	Codificante	Sentido	puuB_2	Gamma-glutamylputrescine oxidoreductase
387265	ins	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética

389757	snp	Codificante	Sentido	ynfM_1	Inner membrane transport protein YnfM
390805	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
403506	snp	Codificante	Antisentido	glnD	Bifunctional uridylyltransferase/uridylyl-removing enzyme
406802	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
407118	snp	Codificante	Sentido	tsf	Elongation factor Ts
407201	snp	Codificante	Sentido	dsdX	D-serine transporter DsdX
424977	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
431731	snp	Codificante	Sentido	eno	Enolase
436304	snp	Codificante	Sentido	oprD_3	Porin D
437305	snp	Codificante	Sentido	flgH	Flagellar L-ring protein
437774	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
441495	snp	Codificante	Sentido	crt_1	Short-chain-enoyl-CoA hydratase
442815	del	Intergénica	N/A	N/A	N/A
442832	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
443264	ins	Codificante	Antisentido	opgH	Glucans biosynthesis glucosyltransferase H
447858	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
450937	ins	Codificante	Antisentido	yfdC	Inner membrane protein YfdC
451807	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
452786	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
453053	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
453135	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
453588	ins	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
453869	snp	Codificante	Sentido	fliD	B-type flagellar hook-associated protein 2
455764	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
456439	snp	Codificante	Antisentido	spuD_1	Putrescine-binding periplasmic protein SpuD
456831	snp	Codificante	Antisentido	N/A	Cardiolipin synthase
457625	snp	Codificante	Sentido	atoS	Signal transduction histidine-protein kinase AtoS
458977	snp	Codificante	Sentido	cpg2	Carboxypeptidase G2
469593	snp	Codificante	Antisentido	hutH_2	Histidine ammonia-lyase
475068	snp	Codificante	Sentido	N/A	Putative multidrug export ATP- binding/permease protein
488886	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
512502	ins	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
514020	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A

514432	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
514524	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
520118	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
523201	snp	Codificante	Antisentido	algF	Alginate biosynthesis protein AlgF
526309	snp	Codificante	Antisentido	rlmA	23S rRNA (guanine(745)-N(1))-methyltransferase
526846	snp	Codificante	Antisentido	mIaA	Intermembrane phospholipid transport system lipoprotein MlaA
537358	snp	Codificante	Sentido	lox	Linoleate 9/13-lipoxygenase
539597	snp	Codificante	Sentido	fadE	Acyl-coenzyme A dehydrogenase
551748	snp	Codificante	Antisentido	N/A	putative HTH-type transcriptional regulator
553884	del	Intergénica	N/A	N/A	N/A
586439	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
586495	snp	Codificante	Antisentido	N/A	Homocitrate synthase
593726	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
594793	del	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
598058	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
600872	snp	Codificante	Sentido	aaeB_2	p-hydroxybenzoic acid efflux pump subunit AaeB
605216	snp	Codificante	Antisentido	pgrR_1	HTH-type transcriptional regulator PgrR
627499	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
634847	snp	Codificante	Antisentido	sir_1	Sulfite reductase [ferredoxin]
636080	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
651898	snp	Codificante	Sentido	btuR	Corrinoid adenosyltransferase
665752	snp	Codificante	Sentido	N/A	L-lactate transporter
676926	snp	Codificante	Antisentido	cobN_1	Aerobic cobaltochelataze subunit CobN
678421	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
678433	ins	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
688783	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
695968	snp	Codificante	Antisentido	mltG	Endolytic murein transglycosylase
699237	snp	Codificante	Antisentido	acpP_1	Acyl carrier protein
704149	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
706056	snp	Codificante	Sentido	ilvA_1	L-threonine dehydratase biosynthetic IlvA
711116	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
719735	snp	Codificante	Antisentido	lolD	Lipoprotein-releasing system ATP-binding protein LolD

737158	snp	Codificante	Sentido	mfd	Transcription-repair-coupling factor
745227	del	Codificante	Sentido	iutA_1	Ferric aerobactin receptor
745896	snp	Codificante	Antisentido	topA	DNA topoisomerase 1
755283	snp	Codificante	Antisentido	uup	ABC transporter ATP-binding protein uup
757242	snp	Codificante	Sentido	slt	Soluble lytic murein transglycosylase
767492	ins	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
769094	snp	Codificante	Antisentido	rpfC	Sensory/regulatory protein RpfC
787069	snp	Codificante	Antisentido	rlmL_1	Ribosomal RNA large subunit methyltransferase K/L
787797	del	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
801957	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
805090	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
806607	snp	Codificante	Sentido	ctpF	putative cation-transporting ATPase F
807537	ins	Codificante	Sentido	ctpF	putative cation-transporting ATPase F
815527	snp	Codificante	Sentido	mdtB_2	Multidrug resistance protein MdtB
819719	ins	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
827918	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
840025	snp	Codificante	Antisentido	apaH_1	Bis(5'-nucleosyl)-tetraphosphatase, symmetrical
878042	snp	Codificante	Antisentido	leuC	3-isopropylmalate dehydratase large subunit
889461	del	Intergénica	N/A	N/A	N/A
901350	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
930197	snp	Codificante	Antisentido	serC	Phosphoserine aminotransferase
951465	snp	Codificante	Antisentido	oprB_1	Porin B
1024026	snp	Codificante	Antisentido	fkIB_1	FKBP-type 22 kDa peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
1034923	snp	Codificante	Sentido	rcsC_3	Sensor histidine kinase RcsC
1035498	snp	Codificante	Sentido	rcsC_3	Sensor histidine kinase RcsC
1038527	snp	Codificante	Antisentido	srmB	ATP-dependent RNA helicase SrmB
1057362	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A

Paciente 3					
Posición	Tipo	Región	Hebra	Gen	Producto
116	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
1785	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
4710	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
7272	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
11137	snp	Codificante	Antisentido	quiP_3	Acyl-homoserine lactone acylase QuiP
28181	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
29719	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
34459	snp	Codificante	Sentido	gyrB	DNA gyrase subunit B
39941	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
41484	snp	Codificante	Sentido	ttgR	HTH-type transcriptional regulator TtgR
41925	snp	Codificante	Sentido	ttgR	HTH-type transcriptional regulator TtgR
41980	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
44572	snp	Codificante	Sentido	gtaB	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase
44932	snp	Codificante	Antisentido	xthA_2	Exodeoxyribonuclease III
46688	snp	Codificante	Antisentido	cheW_1	Chemotaxis protein CheW
48314	snp	Codificante	Sentido	lrp_5	Leucine-responsive regulatory protein
63804	snp	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
79067	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
79334	snp	Codificante	Antisentido	msuD_2	Methanesulfonate monooxygenase
84268	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
105738	snp	Codificante	Antisentido	iorB_2	Isoquinoline 1-oxidoreductase subunit beta
106567	ins	Intergénica	N/A	N/A	N/A
111090	del	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
129885	snp	Codificante	Sentido	rng	Ribonuclease G
176750	snp	Codificante	Sentido	algG	Mannuronan C5-epimerase
177997	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A
230979	del	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
277911	ins	Codificante	Antisentido	N/A	proteína hipotética
284652	del	Intergénica	N/A	N/A	N/A
298327	snp	Codificante	Antisentido	rpoD	RNA polymerase sigma factor RpoD
337213	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética

345507	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
365218	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
368631	snp	Codificante	Antisentido	perB	GDP-perosamine N- acetyltransferase
370001	snp	Codificante	Antisentido	pknD_2	Serine/threonine-protein kinase PknD
502475	snp	Codificante	Sentido	N/A	NAD(P)H dehydrogenase (quinone)
567732	complex	Intergénica	N/A	N/A	N/A
662139	snp	Codificante	Sentido	N/A	proteína hipotética
705413	snp	Codificante	Antisentido	degP	Periplasmic serine endoprotease DegP
708251	snp	Intergénica	N/A	N/A	N/A

Anexo 5: Tasa de crecimiento específica de los aislamientos de ambos centros.

Hospital de especialidades pediátricas		
Paciente	Fecha de recolección de muestra	Tasa de crecimiento específica (μ)
1	01/04/2013	0.078
	27/02/2014	0.087
	12/12/2014	0.057
	16/04/2015	0.091
	10/12/2015	0.066
	19/04/2016	0.077
	02/09/2016	0.086
	24/04/2017	0.075
	22/11/2017	0.064
	02/03/2018	0.100
	12/10/2018	0.078
	12/10/2018	0.073
	11/11/2020	0.079
	02/07/2021	0.041
	03/11/2021	0.051
	09/02/2022	0.053
	28/06/2022	0.038
	28/06/2022	0.038
09/01/2023	0.045	
2	28/04/2014	0.078
	02/12/2014	0.084
	23/04/2015	0.031
	11/12/2015	0.085
	16/12/2016	0.041
	30/06/2017	0.039
3	05/12/2014	0.062
	19/04/2016	0.062
	19/04/2016	0.069
	13/09/2016	0.058
	12/07/2017	0.053
5	23/01/2012	0.053
6	06/03/2019	0.064
7	18/05/2018	0.105

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias		
Paciente	Fecha de recolección de muestra	Tasa de crecimiento específica (μ)
4	11/07/2019	0.034
	08/03/2020	0.039
8	02/04/2018	0.049
9	19/05/2018	0.062
10	06/07/2018	0.071
11	30/07/2019	0.081

Anexo 6: Tasa de crecimiento específica de los aislamientos de ambos centros.

Contigs	141
Tamaño de genoma (pb)	6610978
%GC	66
Contig L50	15
Contig N50	450429
Secuencias codificantes	6409
Compleitud (CheckM)	99
Contaminación (CheckM)	2

Anexo 7: Prevalencia de betalactamasas encontradas por el análisis de resistoma.

Gen	Prevalencia en genomas NCBI (%)	Espectro de acción
<i>bla_{OXA}-395</i>	8	cefalosporinas, carbapenémicos
<i>bla_{OXA}-396</i>	6	cefalosporinas, carbapenémicos
<i>bla_{OXA}-486</i>	11	cefalosporinas, carbapenémicos
<i>bla_{OXA}-494</i>	13	cefalosporinas, carbapenémicos
<i>bla_{OXA}-50</i>	20	cefalosporinas, carbapenémicos
<i>bla_{OXA}-847</i>	5.52	cefalosporinas, carbapenémicos
<i>bla_{OXA}-847</i>	5.52	cefalosporinas, carbapenémicos
<i>bla_{OXA}-903</i>	2.3	cefalosporinas, carbapenémicos
<i>bla_{OXA}-904</i>	3	cefalosporinas, carbapenémicos
<i>bla_{OXA}-905</i>	1.38	cefalosporinas, carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-114</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-14</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-146</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-162</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-164</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-176</i>	desconocida	cefalosporinas, carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-183</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-191</i>	desconocida	cefalosporinas, carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-192</i>	desconocida	cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos
<i>bla_{PDC}-212</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-227</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-272</i>	desconocida	cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos
<i>bla_{PDC}-279</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-3</i>	20%	cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos
<i>bla_{PDC}-303</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-31</i>	2.15	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-314</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-335</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-363</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-366</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-375</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-380</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-415</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-423</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-430</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-45</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-5</i>	14	cefalosporinas, cefamicina, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-60</i>	1	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-72</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-80</i>	< 1%	cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos
<i>bla_{PDC}-95</i>	desconocida	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos
<i>bla_{PDC}-95</i>	0	cefalosporinas, monobactámico y carbapenémicos

REFERENCIAS

1. Dickinson KM, Collaco JM. Cystic Fibrosis. *Pediatrics In Review*. 2021;42(2):55-67.
2. Chen Q, Shen Y, Zheng J. A review of cystic fibrosis: Basic and clinical aspects. *Animal Models and Experimental Medicine*. 2021;4(3):220-32.
3. Castellani C, Assael BM. Cystic fibrosis: a clinical view. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017;74(1):129-40.
4. De Boeck K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatrica*. 2020;109(5):893-9.
5. Omim. CYSTIC FIBROSIS TRANSMEMBRANE CONDUCTANCE REGULATOR: National Center for Biotechnology Information; [24/4/2023]. Available from: <https://omim.org/entry/602421>.
6. Cutting GR, Engelhardt J, Zeitlin PL. Genetics and Pathophysiology of Cystic Fibrosis. *Kendig's Disorders of the Respiratory Tract in Children*: Elsevier; 2019. p. 757-68.e6.
7. Hanssens LS, Duchateau J, Casimir GJ. CFTR Protein: Not Just a Chloride Channel? *Cells*. 2021;10(11):2844.
8. Bergeron C, Cantin AM. Cystic Fibrosis: Pathophysiology of Lung Disease. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 2019;40(06):715-26.
9. Lukasiak A, Zajac M. The Distribution and Role of the CFTR Protein in the Intracellular Compartments. *Membranes*. 2021;11(11):804.
10. Malhotra S, Hayes D, Wozniak DJ. Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the Host-Microbe Interface. *Clinical Microbiology Reviews*. 2019;32(3):e00138-18.
11. Guo J, Garratt A, Hill A. Worldwide rates of diagnosis and effective treatment for cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2022;21(3):456-62.
12. Gobierno de M. Secretaria de Salud [Internet]2022 2022/01/19/. Available from: <https://www.gob.mx/salud/articulos/fibrosis-quistica-enfermedad-que-se-detecta-con-tamiz-neonatal-ampliado?idiom=es#:~:text=La%20fibrosis%20qu%C3%ADstica%20es%20una%20enfermedad%20gen%C3%A9tica%20hereditaria%2C,nacen%20en%20promedio%20300%20personas%20con%20este%20padecimiento>.
13. Quística AMdF. Información General. Asociación Mexicana de Fibrosis Quística.
14. Rafeeq MM, Murad HAS. Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *Journal of Translational Medicine*. 2017;15(1):84.
15. Brown SD, White R, Tobin P. Keep them breathing: Cystic fibrosis pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Journal of the American Academy of Physician Assistants*. 2017;30(5):23-7.
16. Antos NJ, Savant AP. Cystic fibrosis year in review 2020: Section 2 pulmonary disease, infections, and inflammation. *Pediatric Pulmonology*. 2022;57(2):347-60.
17. Cogen JD, Nichols DP, Goss CH, Somayaji R. Drugs, Drugs, Drugs: Current Treatment Paradigms in Cystic Fibrosis Airway Infections. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 2022;11(Supplement_2):S32-S9.
18. LiPuma JJ. The Changing Microbial Epidemiology in Cystic Fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010;23(2):299-323.
19. Delfino E, Del Puente F, Briano F, Sepulcri C, Giacobbe DR. Respiratory Fungal Diseases in Adult Patients With Cystic Fibrosis. *Clinical Medicine Insights: Circulatory, Respiratory and Pulmonary Medicine*. 2019;13:117954841984993.
20. Blanchard AC, Waters VJ. Microbiology of Cystic Fibrosis Airway Disease. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 2019;40(06):727-36.

21. Schurr MJ. *Pseudomonas aeruginosa* Alginate Benefits *Staphylococcus aureus*? *Journal of Bacteriology*. 2020;202(8).
22. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiología médica*. 9th ed: Elsevier; 2021 2021.
23. Wu W, Jin Y, Bai F, Jin S. *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Medical Microbiology*: Elsevier; 2015. p. 753-67.
24. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022;7(1):199.
25. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, et al. *Koneman: diagnóstico microbiológico : texto y atlas : 7.ª edición*. L'Hospitalet de Llobregat: Wolters Kluwer; 2017 2017.
26. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin T-J, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*. 2019;37(1):177-92.
27. La Rosa R, Rossi E, Feist AM, Johansen HK, Molin S. Compensatory evolution of *Pseudomonas aeruginosa*'s slow growth phenotype suggests mechanisms of adaptation in cystic fibrosis. *Nature Communications*. 2021;12(1):3186.
28. Alhazmi A. *Pseudomonas aeruginosa* – Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms. *International Journal of Biology*. 2015;7(2):p44.
29. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*. 2021;82(11):801-11.
30. Illumina I. An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology 2011 [updated 2011. Available from: [https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/systems/miseq/Introduction to Next-Generation Sequencing Technology.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/systems/miseq/Introduction_to_Next-Generation_Sequencing_Technology.pdf).
31. Illumina I. Understanding the NGS workflow [Available from: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners/ngs-workflow.html>].
32. Illumina I. Illumina Knowledge [Available from: <https://knowledge.illumina.com/>].
33. Illumina I. Advantages of paired-end and single-read sequencing [Available from: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/paired-end-vs-single-read.html>].
34. Kchouk M, Gibrat JF, Elloumi M. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biology and Medicine*. 2017;09(03).
35. Ben Khedher M, Ghedira K, Rolain J-M, Ruimy R, Croce O. Application and Challenge of 3rd Generation Sequencing for Clinical Bacterial Studies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(3):1395.
36. Binnewies TT, Motro Y, Hallin PF, Lund O, Dunn D, La T, et al. Ten years of bacterial genome sequencing: comparative-genomics-based discoveries. *Funct Integr Genomics*. 2006;6(3):165-85.
37. Tang P, Croxen MA, Hasan MR, Hsiao WWL, Hoang LM. Infection control in the new age of genomic epidemiology. *American Journal of Infection Control*. 2017;45(2):170-9.
38. Segerman B. The Most Frequently Used Sequencing Technologies and Assembly Methods in Different Time Segments of the Bacterial Surveillance and RefSeq Genome Databases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020;10:527102.
39. Kobras CM, Fenton AK, Sheppard SK. Next-generation microbiology: from comparative genomics to gene function. *Genome Biology*. 2021;22(1):123.

40. Edwards DJ, Holt KE. Beginner's guide to comparative bacterial genome analysis using next-generation sequence data. *Microbial Informatics and Experimentation*. 2013;3(1):2.
41. He Y. *Bacterial Whole-Genome Determination and Applications*. Molecular Medical Microbiology: Elsevier; 2015. p. 357-68.
42. Anani H, Zgheib R, Hasni I, Raoult D, Fournier P-E. Interest of bacterial pangenome analyses in clinical microbiology. *Microbial Pathogenesis*. 2020;149:104275.
43. BIOMÉRIEUX. BIOMÉRIEUX EPISEQ [Available from: <https://www.biomerieux-episeq.com/>].
44. Garza-Ramos U, Rodríguez-Medina N, Córdova-Fletes C, Rubio-Mendoza D, Alonso-Hernández CJ, López-Jácome LE, et al. Whole genome analysis of Gram-negative bacteria using the EPISEQ CS application and other bioinformatic platforms. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2023;33:61-71.
45. Rossi E, La Rosa R, Bartell JA, Marvig RL, Haagensen JAJ, Sommer LM, et al. *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. *Nature Reviews Microbiology*. 2021;19(5):331-42.
46. Camus L, Vandenesch F, Moreau K. From genotype to phenotype: adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis environment. *Microbial Genomics*. 2021;7(3).
47. Mena A, Smith EE, Burns JL, Speert DP, Moskowitz SM, Perez JL, et al. Genetic Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the Airways of Cystic Fibrosis Patients Is Catalyzed by Hypermutation. *Journal of Bacteriology*. 2008;190(24):7910-7.
48. Oliver A, Mena A. Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010;16(7):798-808.
49. Colque CA, Albarracín Orió AG, Feliziani S, Marvig RL, Tobares AR, Johansen HK, et al. Hypermutator *Pseudomonas aeruginosa* Exploits Multiple Genetic Pathways To Develop Multidrug Resistance during Long-Term Infections in the Airways of Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020;64(5):e02142-19.
50. Rees VE, Deveson Lucas DS, López-Causapé C, Huang Y, Kotsimbos T, Bulitta JB, et al. Characterization of Hypermutator *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis in Australia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2019;63(4):e02538-18.
51. Krueger F, James F, Ewels P, Afyounian E, Weinstein M, Schuster-Boeckler B, et al. TrimGalore: v0.6.10. Zenodo; 2023.
52. Andrews S. Babraham bioinformatics-FastQC a quality control tool for high throughput sequence data. URL: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. 2010.
53. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLOS Computational Biology*. 2017;13(6):e1005595.
54. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*. 2015;25(7):1043-55.
55. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2014;30(14):2068-9.
56. Seemann T. Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads. 2015.
57. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 2014;30(9):1312-3.
58. Savli H, Karadenizli A, Kolayli F, Gundes S, Ozbek U, Vahaboglu H. Expression stability of six housekeeping genes: a proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. *Journal of Medical Microbiology*. 2003;52(5):403-8.
59. Bikandi J, Millán RS, Rementeria A, Garaizar J. In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics*. 2004;20(5):798-9.

60. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
61. Yang L, Jelsbak L, Marvig RL, Damkiær S, Workman CT, Rau MH, et al. Evolutionary dynamics of bacteria in a human host environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(18):7481-6.
62. Markussen T, Marvig RL, Gómez-Lozano M, Aanæs K, Burleigh AE, Høiby N, et al. Environmental Heterogeneity Drives Within-Host Diversification and Evolution of *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*. 2014;5(5):e01592-14.
63. Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, et al. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(22):8487-92.
64. Cramer N, Klockgether J, Wrasman K, Schmidt M, Davenport CF, Tümmler B. Microevolution of the major common *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14 in cystic fibrosis lungs. *Environmental Microbiology*. 2011;13(7):1690-704.
65. Bianconi I, D'Arcangelo S, Esposito A, Benedet M, Piffer E, Dinnella G, et al. Persistence and Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* in the Cystic Fibrosis Lung: A Single-Patient Longitudinal Genomic Study. *Frontiers in Microbiology*. 2019;9:3242.
66. Van Mansfeld R, De Been M, Paganelli F, Yang L, Bonten M, Willems R. Within-Host Evolution of the Dutch High-Prevalent *Pseudomonas aeruginosa* Clone ST406 during Chronic Colonization of a Patient with Cystic Fibrosis. *PLOS ONE*. 2016;11(6):e0158106.
67. McMaster U. The Comprehensive Antibiotic Resistance Database 2023 [updated 2023. Available from: <https://card.mcmaster.ca/home>.
68. Maldonado RF, Sá-Correia I, Valvano MA. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiology Reviews*. 2016;40(4):480-93.
69. Jacobs HM, O'Neal L, Lopatto E, Wozniak DJ, Bjarnsholt T, Parsek MR. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Can Produce Calcium-Gelled Biofilms Independent of the Matrix Components Psl and CdrA. *Journal of Bacteriology*. 2022;204(5):e00568-21.
70. Colque CA, Orio AGa, Tomatis PE, Dotta G, Moreno DM, Hedemann LG, et al. Longitudinal Evolution of the *Pseudomonas*-Derived Cephalosporinase (PDC) Structure and Activity in a Cystic Fibrosis Patient Treated with β -Lactams. *mBio*. 2022;13(5):e01663-22.
71. Lund-Palau H, Turnbull AR, Bush A, Bardin E, Cameron L, Soren O, et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2016;10(6):685-97.
72. Sainz-Mejías M, Jurado-Martín I, McClean S. Understanding *Pseudomonas aeruginosa*-Host Interactions: The Ongoing Quest for an Efficacious Vaccine. *Cells*. 2020;9(12).
73. Jazayeri JA, Nguyen K, Kotsanas D. Comparison of Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Cystic Fibrosis Patients. *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis*. 2016;05(04).
74. Llanos A, Achard P, Bousquet J, Lozano C, Zalacain M, Sable C, et al. Higher levels of *Pseudomonas aeruginosa* LasB elastase expression are associated with early-stage infection in cystic fibrosis patients. *Scientific Reports*. 2023;13(1):14208.
75. Craig L, Forest KT, Maier B. Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences. *Nature Reviews Microbiology*. 2019;17(7):429-40.
76. Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiology*. 2010;5(11):1663-74.
77. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(22):8671.

78. Perez LRR, Costa MCN, Freitas ALP, Barth AL. Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas Aeruginosa* isolates recovered from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. *Brazilian Journal of Microbiology*: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]. 2011;42(2):476-9.
79. Kodori M, Nikmanesh B, Hakimi H, Ghalavand Z. Antibiotic Susceptibility and Biofilm Formation of Bacterial Isolates Derived from Pediatric Patients with Cystic Fibrosis from Tehran, Iran. *Archives of Razi Institute*. 2021;76(2):397-406.
80. Vandeplassche E, Sass A, Lemarcq A, Dandekar AA, Coenye T, Crabbé A. In vitro evolution of *Pseudomonas aeruginosa* AA2 biofilms in the presence of cystic fibrosis lung microbiome members. *Scientific Reports*. 2019;9(1):12859.
81. Yang L, Haagensen JAJ, Jelsbak L, Johansen HK, Sternberg C, Høiby N, et al. In Situ Growth Rates and Biofilm Development of *Pseudomonas aeruginosa* Populations in Chronic Lung Infections. *Journal of Bacteriology*. 2008;190(8):2767-76.
82. Oliver A, Baquero F, Blázquez J. The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Molecular Microbiology*. 2002;43(6):1641-50.
83. Ciofu O, Mandsberg LF, Bjarnsholt T, Wassermann T, Høiby N. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in *mucA* and/or *lasR* mutants. *Microbiology (Reading)*. 2010;156(Pt 4):1108-19.
84. Liebl D, Robert-Genthon M, Job V, Cogoni V, Attrée I. Baseplate Component TssK and Spatio-Temporal Assembly of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2019;10:1615.
85. Chen L, Zou Y, She P, Wu Y. Composition, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res*. 2015;172:19-25.