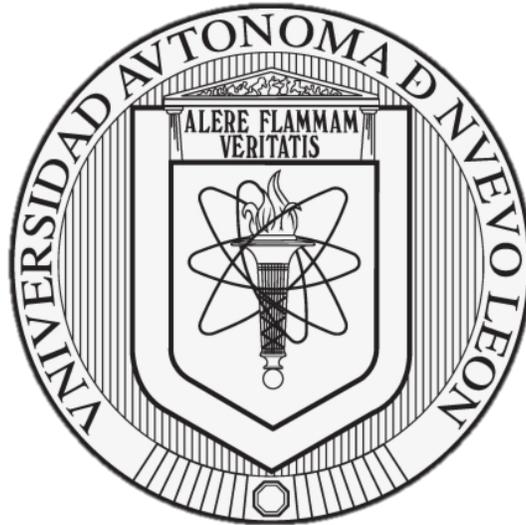


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



IMPACTO DE LA EXPRESIÓN DE PORINAS Y BOMBAS DE EFLUJO EN
LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS DE *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA AISLADA EN HOSPITALES DE MÉXICO

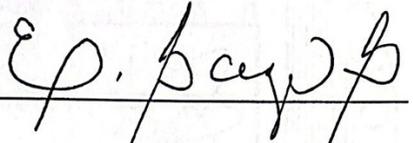
I.B.T. HUMBERTO TORRES RODRÍGUEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA

MONTERREY, N. L. JUNIO DE 2025

IMPACTO DE LA EXPRESIÓN DE PORINAS Y BOMBAS DE EFLUJO EN
LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS DE *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA AISLADAS EN HOSPITALES DE MÉXICO

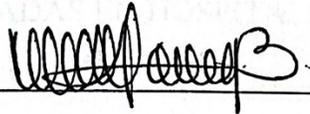
Comité de tesis



Dra. en C. Elyra Garza González
Directora



Dr. en C. Carlos Córdova Fletes
Co-Director



Dra. en C. María del Carmen Barboza Cerda
Miembro de la comisión



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

IMPACTO DE LA EXPRESIÓN DE PORINAS Y BOMBAS DE EFLUJO EN
LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS DE *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA AISLADA EN HOSPITALES DE MÉXICO

Por:

Humberto Torres Rodríguez

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Se tuvo la colaboración del Dr. Luis Esaú López Jácome del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” y de la M.C. Cindy Fabiola Hernández Pérez del Centro Nacional de Referencia de Inocuidad y Bioseguridad Alimentaria de la SENASICA.

DEDICATORIA

A Sultán
2010-2017

A David Bowie
1947-2016

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de maestría, a través de la beca nacional para estudios de posgrado con el registro número 1314976.

Al Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, por haberme permitido formar parte de su programa de posgrado. Agradezco especialmente a las y los doctores adscritos al departamento por sus enseñanzas, así como por el acceso a las instalaciones necesarias para mi desarrollo profesional.

A los centros hospitalarios participantes pertenecientes a la Red Temática de Investigación y Vigilancia de la Farmacorresistencia (INVIFAR) por facilitar las muestras para que este proyecto pudiese realizarse y al Centro Nacional de Referencia de Inocuidad y Bioseguridad Alimentaria de la SENASICA por la secuenciación de las muestras.

A mi asesora de tesis, la Dra. Elvira Garza González, por permitirme integrarme a su grupo de trabajo y confiarme el desarrollo del proyecto. Le agradezco profundamente su guía, enseñanzas, consejos y constante retroalimentación, que las considero fundamentales en mi formación como investigador.

A los miembros de la comisión de tesis, el Dr. Carlos Córdova Fletes y la Dra. María del Carmen Barboza Cerda, por su acompañamiento, apoyo y valiosas observaciones durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Luis Esaú López Jácome por el apoyo fundamental para la conceptualización del proyecto y aporte técnico en el desarrollo de los objetivos del proyecto.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Microbiología Molecular, a Lucy, Luis y Melissa, por todo el apoyo brindado cuando se necesitaba, así como por el asesoramiento en el uso de equipos y técnicas de microbiología y bioinformáticas.

A mis compañeros de generación de maestría por todas las risas y momentos de convivencia, en especial a Melissa, por todos los momentos de apoyo, risa y diversión que tuvimos estos dos años, gracias por ser mi amiga desde el principio.

A Betito, por todo el apoyo, la paciencia y la comprensión al estar a mi lado durante este proceso. Gracias por acompañarme desde el inicio y permanecer hasta el final.

A mi familia —mi madre, padre, hermano y tía—, gracias por apoyar todas mis decisiones de vida, y esta no siendo la excepción. Gracias por ser la mejor familia.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.2 Resistencia antimicrobiana	3
1.3 Mecanismos de resistencia.....	4
1.3.1 Carbapenemasas.....	5
1.3.2 Porinas.....	5
1.3.3 Bombas de eflujo	8
1.4 Situación actual de la resistencia a los antibióticos de <i>P. aeruginosa</i>	10
2. JUSTIFICACIÓN	12
3. HIPÓTESIS	13
4. OBJETIVOS.....	14
4.1 Objetivo general.....	14
4.2 Objetivos específicos	14
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	15
6. METODOLOGÍA.....	16
6.2 Perfil de susceptibilidad a antibióticos	16
6.3 Secuenciación de genoma completo y procesamiento de datos.....	21
6.3.1 Extracción de ADN genómico y plasmídico	21
6.3.2 Secuenciación	22
6.3.3 Evaluación de calidad de genomas	22
6.3.4 Ensamble de genomas.....	22
6.4 Análisis bioinformático.....	22
6.4.1 Tipificación de secuencias multilocus (MLST).....	22
6.4.2 Anotación de secuencias	23
6.4.3 Pangenoma.....	23
6.4.4 Filogenia del genoma central.....	23
6.4.2 Filogenia basada en variantes	24
6.4.8 Identidad nucleotídica promedio.....	24
6.4.9 Resistoma.....	24

6.4.9 Identificación de mutaciones en las secuencias nucleotídicas	24
6.4.10 Docking molecular.....	25
6.5 Selección de cepas	26
6.5 Cinética de crecimiento en cepas	27
6.5 Análisis de la expresión de genes de bombas de eflujo y porinas	27
6.5.1 Extracción de ARN	27
6.5.2 Retrotranscripción y qPCR	28
6.6 Análisis estadístico.....	29
7. RESULTADOS	30
Objetivo 1.....	30
7.1 Perfil de susceptibilidad.....	30
Objetivo 2.....	39
7.2 Secuenciación de genoma completo y procesamiento de datos.....	39
7.2.1 Extracción de ADN genómico	39
7.2.2 Evaluación de calidad y ensamble de los genomas	44
Objetivo 3.....	45
7.3 Análisis bioinformático.....	45
7.3.1 Tipificación de secuencias multilocus (MLST).....	45
7.3.2 Identidad Nucleotídica Promedio (ANI).....	46
7.3.3 Pangenoma.....	47
7.3.3 Filogenia del genoma central	48
7.3.3 Filogenia basada en variantes	52
7.3.4 Resistoma.....	53
7.3.5 Análisis de mutaciones en <i>oprD</i>	55
7.3.6 Docking molecular.....	59
7.3.7 Presencia de genes de bombas de eflujo	63
7.4 Selección de cepas	63
Objetivo 4.....	65
7.5 Cinética de crecimiento.....	65
Objetivo 5.....	68
7.6 Análisis de expresión génica.....	68

7.6.1 Expresión génica en ausencia de antibiótico	68
7.6.2 Expresión génica en presencia de imipenem	71
7.6.2 Expresión génica en presencia de meropenem	74
7.6.3 Expresión génica diferencial en ausencia de antibiótico, en presencia de imipenem y en presencia de meropenem	77
8. DISCUSIÓN	78
9. CONCLUSIONES	85
10. REFERENCIAS.....	86
ANEXOS.....	94

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de las muestras de estudio, ordenadas por fecha de recolección.....	17
Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$) para las cepas de estudio.....	31
Tabla 3. Rangos de CMI, CMI ₅₀ , CMI ₉₀ de las cepas de estudio.....	34
Tabla 4. Interpretación de los puntos de corte para las cepas incluidas en el estudio.....	35
Tabla 5. Parámetros de calidad de la extracción de ADN.....	40
Tabla 6. Parámetros promedio de calidad de los genomas ensamblados de <i>P. aeruginosa</i>	45
Tabla 7. Composición del pangenoma de las cepas de estudio.....	47
Tabla 8. Cepas seleccionadas para el análisis de docking molecular.....	59
Tabla 9. Estructuras tridimensionales modeladas de OprD en cepas seleccionadas.....	60
Tabla 10. Cepas seleccionadas para los análisis de cinética de crecimiento y expresión génica..	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sitios de unión en OprD.....	7
Figura 2. Bombas de eflujo del grupo de resistencia-nodulación-división de <i>P. aeruginosa</i>	8
Figura 3. Esquema de la estrategia general experimental.....	15
Figura 4. Patrones de susceptibilidad de las 136 cepas de <i>P. aeruginosa</i> incluidas en el estudio....	39
Figura 5. Resumen de los análisis de calidad de las lecturas crudas.....	44
Figura 6. Frecuencias de las secuencias tipo (ST) en las cepas de estudio.....	46
Figura 7. Mapa de calor con los valores del ANI.....	47
Figura 8. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el genoma central de las cepas de estudio y las cepas de referencia (PAO1, PA14 y PA7).....	48
Figura 9. Árbol filogenético no enraizado construido a partir del genoma central.....	49
Figura 10. Cladograma de la filogenia del genoma central de las cepas de estudio anotado con el tipo de secuencia (ST), el centro hospitalario de origen y el tipo de muestra.....	51
Figura 11. Filogenia basada en variantes.....	52
Figura 12. Matriz de presencia/ausencia de genes de resistencia adquirida identificados en las cepas de estudio, agrupadas según su filogrupo.....	54
Figura 13. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de genes de resistencia adquirida de las cepas de <i>P. aeruginosa</i>	55
Figura 14. Cladograma de las secuencias de <i>oprD</i> de las cepas de estudio y las cepas de referencia (PAO1, PA14 y PA7).....	57
Figura 15. Correlación entre los mecanismos genéticos de resistencia y los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) para imipenem y meropenem en las cepas de estudio..	58

Figura 16. Energías de acoplamiento molecular (kcal/mol) entre las proteínas OprD modeladas y los antibióticos imipenem y meropenem en cepas seleccionadas de <i>P. aeruginosa</i>	61
Figura 17. Interacciones de imipenem con OprD.....	62
Figura 18. Presencia de bombas de eflujo del grupo RND en las cepas de estudio.....	63
Figura 19. Curvas de crecimiento de cepas seleccionadas en presencia y ausencia de carbapenémicos.....	66
Figura 20. Tasa de crecimiento (h^{-1}) para las cepas seleccionadas en ausencia y presencia de carbapanémico.....	67
Figura 21. Valores de AUC (OD h^{-1}) que refleja el crecimiento total acumulado para cada cepa seleccionada en ausencia y presencia de carbapenémico.....	67
Figura 22. Mapa de calor que muestra el \log_2 del fold change de la expresión génica relativa a la cepa de referencia PAO1 en condiciones sin antibiótico.....	69
Figura 23. Boxplot del \log_2 FoldChange por perfil de susceptibilidad para cada gen de estudio.	70
Figura 24. Boxplot del \log_2 FoldChange por filogrupo para cada gen de estudio.....	70
Figura 25. Distribución del tipo de mutación del gen represor <i>mexR</i> por filogrupo.....	71
Figura 26. Mapa de calor que muestra el \log_2 del fold change de la expresión génica relativa de cada cepa en exposición a imipenem comparado con la misma cepa en ausencia de este.....	72
Figura 27. Boxplot del \log_2 Fold Change por perfil de susceptibilidad para cada gen de estudio.....	73
Figura 28. Boxplot del \log_2 FoldChange por filogrupo en presencia de imipenem para cada gen de estudio.....	73
Figura 29. Mapa de calor que muestra el \log_2 FoldChange de la expresión génica relativa de cada cepa en exposición a meropenem comparado con la misma cepa en ausencia de éste.....	75

Figura 30. Boxplot del \log_2 FoldChange por perfil de susceptibilidad para cada gen de estudio baja presencia de meropenem.....75

Figura 31. Boxplot del \log_2 FoldChange por filogrupo en presencia de meropenem para cada gen de estudio.....76

Figura 32. Boxplot del \log_2 FoldChange en ausencia de antibiótico, en presencia de imipenem y meropenem para cada gen de estudio.....77

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μg	Microgramo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ANI	Identidad nucleotídica promedio
ARN	Ácido ribonucleico
°C	Grados Celsius
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
g	gramos
h	horas
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
mL	mililitro
NCBI	Centro Nacional de Información de Biotecnología.
OD	Densidad óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
rpm	Revoluciones por minuto
ST	Secuencia tipo

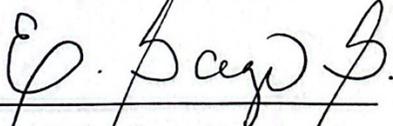
RESUMEN

Introducción: La resistencia a los carbapenémicos en *Pseudomonas aeruginosa* es una creciente preocupación mundial, sin embargo, los estudios que explican los mecanismos de resistencia intrínsecos en México siguen siendo limitados. Este estudio tuvo como objetivo analizar el impacto de la expresión de porinas y bombas de eflujo en la resistencia a los antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* en hospitales de México.

Metodología: Se recolectaron 136 cepas clínicas de *P. aeruginosa* de centros hospitalarios en 16 estados de México entre 2021 y 2023. Se determinó el perfil de susceptibilidad mediante el equipo automatizado VITEK 2. La secuenciación de genoma completo (WGS) se llevó a cabo utilizando la tecnología Illumina NovaSeq. Los análisis bioinformáticos se realizaron a través de diversas herramientas especializadas. Se evaluó la cinética de crecimiento en tres condiciones (sin antibiótico, imipenem y meropenem) y se cuantificó la expresión génica de *oprD*, *mexA*, *mexC*, *mexE* y *mexY* por qPCR en cepas seleccionadas.

Resultados: El análisis filogenético reveló que las cepas se agruparon en los tres grupos filogenéticos de *P. aeruginosa*: PAO1, PA14 y PA7. La ST309 (n=29) fue el linaje predominante en las cepas de estudio. Se identificaron cepas con genes que codifican carbapenemasas (*bla_{VIM}* 16%, *bla_{GES}* 19% y *bla_{IMP}* 11%). El 75% de las cepas de estudio tenían mutaciones potencialmente inactivantes en el gen *oprD*. En presencia de antibióticos, las cepas con genes que codifican carbapenemasas presentaron una fase lag más corta en comparación con aquellas que no los portaban. La expresión de *mexA* fue mayor en el filogrupo PAO1 (mediana \log_2 FoldChange = 1.5017) que en el filogrupo PA14 (mediana \log_2 FoldChange = -5.8659) ($p = 0.0136$).

Conclusión: Existen tres principales filogrupos de *P. aeruginosa* (PAO1, PA14 y PA7) y predominancia del linaje ST309 en hospitales de México. La alta frecuencia de mutaciones potencialmente inactivantes en el gen *oprD* (75%) sugiere que la pérdida de esta porina es un mecanismo clave de resistencia intrínseca, particularmente en cepas que no portan genes de carbapenemasas. La expresión diferencial de *mexA* entre los filogrupos indica que el linaje genético de *P. aeruginosa* influye en la expresión de bombas de eflujo, contribuyendo a la variabilidad fenotípica observada.


Dra. en C. Elvira Garza González

Directora de Tesis

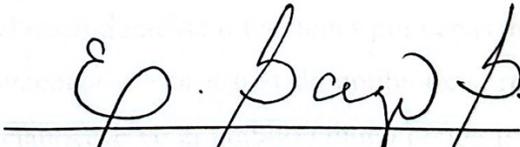
ABSTRACT

Introduction: Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is an increasing global concern; however, studies addressing intrinsic resistance mechanisms in Mexico remain limited. This study aimed to analyze the impact of porin and efflux pump gene expression on antibiotic resistance in *P. aeruginosa* isolated from hospitals in Mexico.

Methodology: A total of 136 clinical isolates of *P. aeruginosa* were collected from hospitals in 16 Mexican states between 2021 and 2023. Antimicrobial susceptibility profiles were determined using the automated VITEK 2 system. Whole genome sequencing (WGS) was performed using Illumina NovaSeq technology. Bioinformatic analyses were conducted using specialized tools. Growth kinetics were evaluated under three conditions (no antibiotic, imipenem, and meropenem), and gene expression of *oprD*, *mexA*, *mexC*, *mexE*, and *mexY* was quantified by qPCR in selected strains.

Results: Phylogenetic analysis revealed that strains clustered into the three major *P. aeruginosa* phylogroups: PAO1, PA14, and PA7. ST309 (n=29) was the most prevalent lineage. Carbapenemase genes were detected in several strains (*blaVIM* 16%, *blaGES* 19%, *blaIMP* 11%). Additionally, 75% of isolates harbored potentially inactivating mutations in *oprD*. In the presence of antibiotics, strains carrying carbapenemase genes exhibited a shorter lag phase compared to non-carbapenemase-producing strains. *mexA* expression was higher in the PAO1 phylogroup (median \log_2 FoldChange = 1.5017) than in PA14 (median \log_2 FoldChange = -5.8659; p = 0.0136).

Conclusion: There are three main phylogroups of *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1, PA14, and PA7), with a predominance of the ST309 lineage in hospitals across Mexico. The high frequency of potentially inactivating mutations in the *oprD* gene (75%) suggests that the loss of this porin is a key mechanism of intrinsic resistance, particularly in strains that do not carry carbapenemase genes. The differential expression of *mexA* among phylogroups indicates that the genetic background of *P. aeruginosa* influences efflux pump expression, contributing to the phenotypic variability observed.



Dra. en C. Elyira Garza González
Directora de Tesis

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa con capacidad de infectar distintos hospedadores, incluido el humano. Posee un genoma relativamente grande (5.5-7 Mb) que codifica un amplio rango de genes reguladores, factores de virulencia y versatilidad metabólica para adaptarse a distintos entornos, lo que contribuye a su propagación en ambientes variados como agua, suelo o animales (1). Es un patógeno oportunista relevante ya que puede causar infecciones asociadas a la atención de la salud (2).

1.2 Resistencia antimicrobiana

Una de las principales preocupaciones en salud global en el siglo XXI es la resistencia antimicrobiana, definida como la capacidad de las bacterias para resistir los efectos de los antibióticos. (3). En el año 2019, se estimó que aproximadamente 1.27 millones de muertes a nivel mundial fueron a infecciones causadas por patógenos resistentes a antibióticos. Este incremento en la resistencia bacteriana se ha asociado, en parte, a la presión selectiva ejercida por el uso indiscriminado de antimicrobianos en humanos y animales. (4).

Recientemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) identificó y clasificó bacterias patógenas prioritarias resistentes a antibióticos en grupos, según la urgencia de la necesidad de desarrollar nuevos fármacos. El grupo catalogado como prioridad alta incluye patógenos multifarmacorresistentes, entre los cuales se incluye *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos (5).

Los carbapenémicos son uno de los grupos de antibióticos más efectivos para el tratamiento de infecciones por bacilos Gram-negativos. Estos antibióticos son de amplio espectro y son comúnmente utilizados para el tratamiento de infecciones por cepas multifarmacorresistentes, por ello, el incremento de la resistencia a este grupo de antibióticos representa una preocupación creciente a nivel global, especialmente en el ámbito clínico donde limita significativamente las opciones terapéuticas disponibles (6).

1.3 Mecanismos de resistencia

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos pueden ser intrínsecos, adquiridos o adaptativos.

- a) Los mecanismos de resistencia intrínsecos son aquellos inherentes a la estructura y fisiología de las bacterias, como la impermeabilidad de la membrana o bombas de eflujo que eflujo. En *P. aeruginosa*, la resistencia intrínseca a los antibióticos puede darse por diversos mecanismos, tales como la actividad de enzimas que inactivan o modifican a los antibióticos, alteración en la expresión de porinas de la membrana externa y el aumento en la expresión de las bombas de eflujo. Cada tipo de mecanismo o la combinación de éstos, puede resultar en un distinto patrón de resistencia y tener diferente distribución por regiones geográficas (7).
- b) Los mecanismos adquiridos surgen de la adquisición de genes de resistencia por transferencia horizontal o como consecuencia de la selección de mutaciones ventajosas para la supervivencia de la bacteria. En *P. aeruginosa*, se ha descrito la transferencia horizontal de genes a través de elementos genéticos móviles que codifican para enzimas que inactivan a diversas clases de antibióticos, como aminoglucósidos y β -lactámicos (7).
- c) Los mecanismos adaptativos son respuestas dinámicas por estímulos ambientales que involucran cambios fenotípicos reversibles una vez que el estímulo es removido del ambiente. En *P. aeruginosa*, uno de los mecanismos adaptativos más estudiados es la formación de biofilm, que le confiere la capacidad de resistir condiciones adversas, incluyendo la exposición a antibióticos y la respuesta inmunitaria del hospedero. La formación de biofilm está regulado por señales ambientales, sistemas de regulación global y quorum sensing (7, 8).

1.3.1 Carbapenemasas

Las carbapenemasas son enzimas β -lactamasas que hidrolizan de manera eficiente los carbapenémicos. De acuerdo con la clasificación de Ambler, se catalogan como clase A, denominadas serina β -lactamasas e incluyen KPC, IMI, SME, GES; clase B, denominadas metalo- β -lactamasas e incluyen VIM, IMP, SIM, NDM y clase D, denominadas oxacilinas e incluyen OXA-23, OXA-24, OXA48-like, y OXA-58, entre otras. (9, 10).

Se ha detectado la presencia de carbapenemasas en *P. aeruginosa* a nivel global, especialmente en Europa, Asia y América, y las de tipo VIM son las más frecuentemente reportadas. Además, desde hace aproximadamente diez años, se han detectado cepas de *P. aeruginosa* productora de KPC en varios países de Asia y América. Las cepas que portan el gen *bla_{KPC}* tienen un impacto clínico y epidemiológico significativo, ya que se asocian con una alta resistencia no solo a β -lactámicos, sino a otras clases de antibióticos y han sido identificadas en brotes de infecciones en entornos hospitalarios, esto debido a que estas enzimas son, en su mayoría, codificadas por elementos genéticos móviles, como plásmidos, integrones y casetes que favorecen su rápida diseminación (6, 11).

1.3.2 Porinas

En *P. aeruginosa*, una gran variedad de porinas contribuye a regular la permeabilidad de la membrana al formar canales de poro que permiten el paso selectivo de moléculas a través de la membrana. Los distintos tipos de porinas se clasifican de acuerdo con su función, ya que pueden ser no específicas, específicas, de compuerta y de eflujo.

- a) Las porinas no específicas son responsables de la permeabilidad general de la membrana externa al permitir el paso de moléculas pequeñas, como iones y nutrientes, entre estas porinas se encuentra OprF (12, 13).
- b) Las porinas específicas transportan nutrientes como azúcares, aminoácidos y péptidos. Entre estas porinas se encuentran OprB, OprD, OprE, OprO y OprP (12, 13).

- c) Las porinas de compuerta tienen la capacidad de abrir y cerrar su estructura de canal de poro en respuesta a ciertas señales o condiciones ambientales lo que permite regular el paso de moléculas a través de la membrana externa. Entre estas porinas se encuentran OprC y OprH (12, 13).
- d) Las porinas de eflujo se asocian con proteínas transportadoras y forman complejos proteicos de eflujo para expulsar compuestos tóxicos para la célula. Entre éstas, se incluyen OprM, OprN y OprJ (12, 13).

Entre las porinas, OprD y las porinas de eflujo se han asociado a resistencia a carbapenémicos, mientras que el resto de las porinas (OprB, OprE, OprC y OprH) no se ha asociado con mecanismos directos de resistencia a los antibióticos, aunque se sugiere que pudieran tener impacto indirecto en la susceptibilidad a los antibióticos debido a su papel en la permeabilidad de la membrana, sin embargo, su mecanismo es específico para diversos compuestos como azúcares, moléculas de oxígeno, aniones, entre otros elementos (14, 15).

1.3.2.1 OprD

La membrana de *P. aeruginosa* es altamente restrictiva debido a la presencia de porinas en la membrana. Una de estas porinas, relevante en el mecanismo de resistencia es OprD, que desempeña una función crucial en el transporte de compuestos específicos, tales como aminoácidos, péptidos pequeños y carbapenémicos hacia dentro de la célula. Por consiguiente, la pérdida o mutación de OprD reduce la entrada de diversas moléculas a la célula bacteriana, incluidos los carbapenémicos, lo cual contribuye a la resistencia de esta clase de antibióticos. OprD posee dominios de unión específicos para los carbapenémicos, localizados en los bucles 2, 3 y 7. Estas regiones forman dos zonas funcionales de reconocimiento: “bolsillo de unión” y “escalera básica”, las cuales están compuestas por residuos de arginina que favorece la unión a moléculas cargadas positivas, como los carbapenémicos, facilitando su transporte a través de la membrana (Figura 1). (16-18).

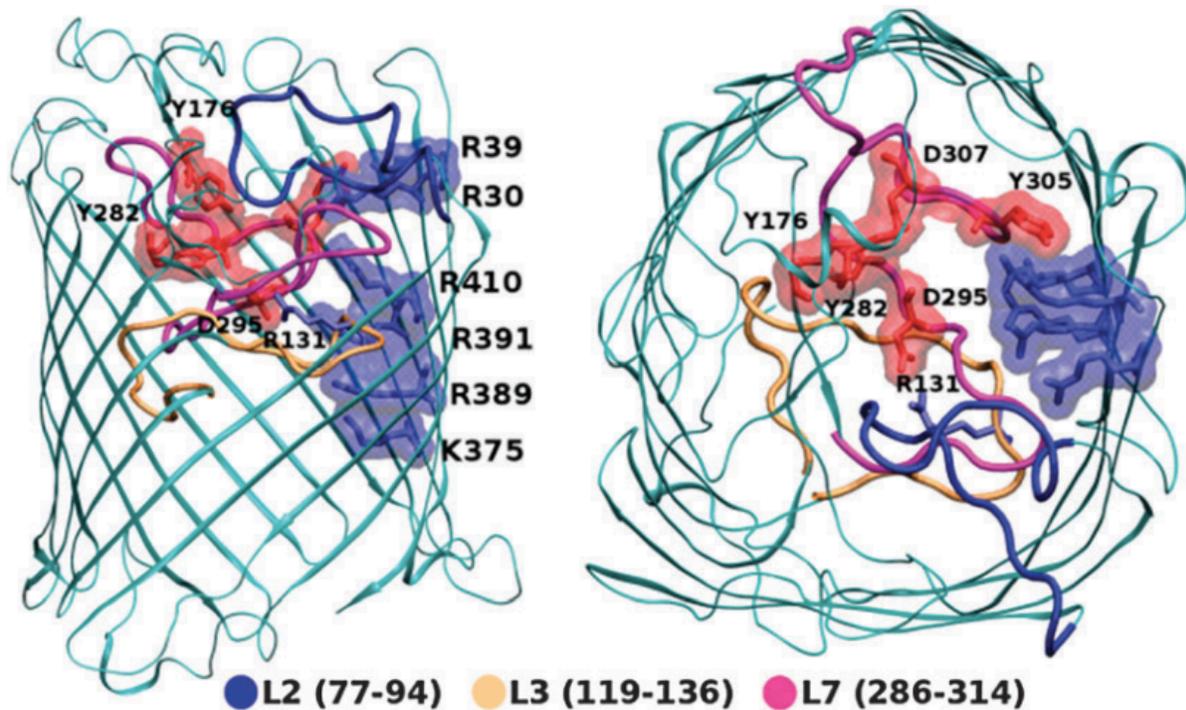


Figura 1. Sitios de unión de OprD. En rojo: Bolsillo de unión; En azul: Escalera básica de arginina L2: Bucle 2; L3: Bucle 3; L7: Bucle 7. Imagen obtenida de Samanta, S., Scorciapino, M. A., & Ceccarelli, M. (2015). Molecular basis of substrate translocation through the outer membrane channel OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(37), 23867–23876. doi:10.1039/c5cp02844b.

1.3.2.2 Porinas de eflujo

OprM, OprN y OprJ forman canales que facilitan la expulsión de antibióticos a través de la membrana externa, como parte del sistema de bombas de eflujo. Un incremento en su expresión está asociado a un aumento en la resistencia a los antibióticos (19).

1.3.3 Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo en *P. aeruginosa* son fundamentales para expulsar compuestos tóxicos, incluidos antibióticos fuera de la célula. Entre las bombas de eflujo, son de relevancia las bombas de la familia de resistencia-nodulación-división (RND). A este grupo se le denomina bombas de eflujo de múltiples fármacos (Mex), las cuales incluyen a MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprN y MexXY (20). Estas bombas de eflujo están constituidas por complejos proteicos tripartitos formados por tres proteínas diferentes:

- una proteína adaptadora periplásmica, conocida como proteína de fusión de la membrana periplásmica (PMFP), como MexA, MexX, MexC o MexE.
- un transportador RND, como MexB, MexY, MexD o MexF.
- un factor de membrana externa formador de canales (OMF), como OprM, OprJ o OprN (21).

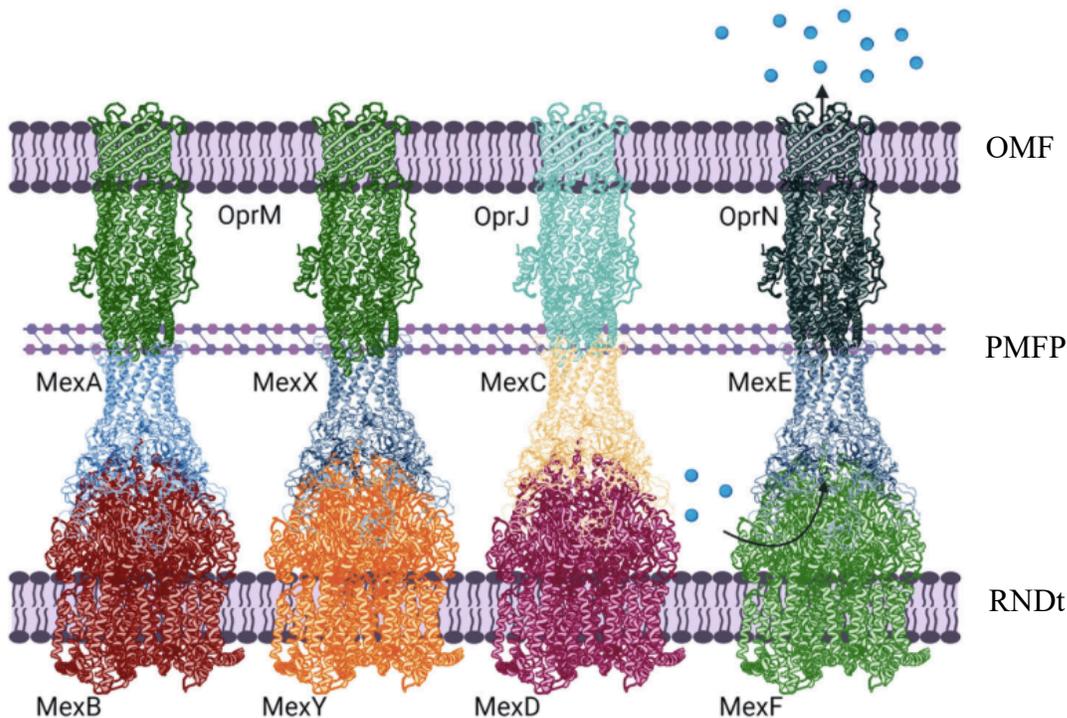


Figura 2. Bombas de eflujo del grupo de resistencia-nodulación-división (RND) de *P. aeruginosa*. Imagen obtenida de: Andre Bittencourt, et al. Role of efflux pumps on antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Int J molec sci, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms232415779>.

Las bombas de eflujo son importantes en el desarrollo de la resistencia a múltiples fármacos en bacterias y su sobreexpresión está asociada con la resistencia de *P. aeruginosa* a la mayoría de los fármacos y puede potencialmente reducir la eficacia de nuevas clases de fármacos (22).

1.3.3.1 MexAB-OprM

La bomba MexAB-OprM es una de las más estudiadas y se considera uno de los principales factores que contribuyen a la resistencia a los antibióticos. Esta bomba tiene amplio espectro de acción ya que expulsa distintas clases de fármacos, como β -lactámicos y fluoroquinolonas. Su mecanismo de acción se activa cuando la concentración del fármaco aumenta en su proximidad lo que induce un cambio conformacional en MexB y expulsar moléculas activas hacia un túnel formado por MexA y OprM a través del periplasma y la membrana externa (23, 24). La sobreexpresión de MexAB-OprM, inducida por mutaciones en el regulador transcripcional MexR, se asocia a un alto nivel de resistencia. En cepas productoras de carbapenemasas se observa una mayor expresión de esta bomba, lo que contribuye a su resistencia a los carbapenémicos (21).

1.3.3.2 MexCD-OprJ

Otra bomba de eflujo relevante en la resistencia a antibióticos es MexCD-OprJ. En condiciones sin estímulo, esta bomba permanece inactiva o con niveles de expresión bajos, por lo que no contribuye a la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa*, sin embargo, la sobreexpresión de esta bomba se asocia a reducción en la susceptibilidad a fluoroquinolonas. Aunque esta bomba no es el principal mecanismo de resistencia para β -lactámicos, su sobreexpresión puede tener un impacto adicional en la resistencia cuando se combina con otras bombas de eflujo y mecanismos de resistencia (25).

1.3.3.3. MexEF-OprN

La bomba MexEF-OprN se encuentra inactiva o expresada a niveles basales en *P. aeruginosa*. Su sobreexpresión está asociada con una reducción en la expresión de la porina OprD, debido a que el activador transcripcional MexT de MexEF-OprN actúa como represor transcripcional de *oprD*.

Como resultado, las cepas que sobreexpresan MexEF-OprN pueden presentar resistencia a antibióticos que no son expulsados por esta bomba de eflujo, como los carbapenémicos (20, 26).

1.3.3.4. MexXY

La bomba de eflujo MexXY está compuesta por la PMFP MexX y el RNDt MexY, los cuales junto con OprM, forman un complejo tripartita funcional. Su sobreexpresión se asocia al incremento en la resistencia a aminoglucósidos, β -lactámicos y fluoroquinolonas (27).

Estos mecanismos de resistencia combinados contribuyen a la capacidad de *P. aeruginosa* para resistir una amplia gama de antibióticos, lo que complica el tratamiento de las infecciones causadas por esta bacteria (20).

1.4 Situación actual de la resistencia a los antibióticos de *P. aeruginosa*

En entornos hospitalarios, se puede facilitar la transmisión de cepas resistentes entre los pacientes y el intercambio de genes de resistencia a los antibióticos, por lo que es esencial mantener una vigilancia epidemiológica adecuada sobre estas cepas y los mecanismos involucrados en su resistencia (28). A nivel global, diversos estudios han reportado un incremento en la presencia de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos portadoras de genes que codifican carbapenemasas; sin embargo, se ha demostrado que múltiples mecanismos de resistencia coexisten en aislados clínicos de esta especie (29-31).

En México, estudios realizados por el grupo de trabajo de la Red Temática de Investigación y Vigilancia de la Farmacorresistencia (INVIFAR) han reportado un incremento en la resistencia a carbapenémicos en cepas clínicas de *P. aeruginosa*, así como la presencia de genes que codifican carbapenemasas en aislados clínicos de *P. aeruginosa* en centros hospitalarios. Así mismo, se ha observado una mayor frecuencia de resistencia antimicrobiana en pacientes hospitalizados en Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), no obstante, en un porcentaje de aislados resistentes a carbapenémicos no se encontraron genes que codificaran a carbapenemasas, sugiriendo resistencia asociada a porinas y bombas de eflujo (32, 33).

1.5 Secuenciación como herramienta para el análisis de resistencia a los antibióticos

La secuenciación de genoma completo (Whole Genome Sequencing, WGS) es una de las principales herramientas para la genotipificación de cepas, así como para la realización de estudios de genómica comparativa y análisis filogenéticos de cepas en brotes hospitalarios (34). Entre las distintas plataformas disponibles, las técnicas de secuenciación de Sanger y la tecnología Illumina son las más empleadas en investigaciones sobre resistencia bacteriana. Estas tecnologías permiten identificar con alta precisión mutaciones asociadas a resistencia a antibióticos y ofrecen una visión integral de los mecanismos genéticos involucrados, lo que contribuye al monitoreo, control y entendimiento de la farmacorresistencia (35).

- a) La secuenciación de Sanger se fundamenta en la síntesis de cadenas de ADN complementarias mediante la incorporación de desoxirribonucleótidos marcados con fluoróforos. Estos nucleótidos permiten la detección de los fragmentos generados a través de escáner de fluorescencia. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para la identificación de mutaciones puntuales en genes específicos asociados con los mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa* (35-37).
- b) En contraste, la tecnología Illumina utiliza la secuenciación de nueva generación (NGS) basada en síntesis reversible. Este método consiste en la generación de fragmentos de ADN cortos que se secuencian de manera masiva y en paralelo sobre una superficie sólida (38). Su implementación ha ampliado las capacidades de análisis, permitiendo estudios de distribución clonal (39, 40) y la identificación de variantes en genomas completos o en múltiples regiones genómicas específicas de interés de esta misma especie (41, 42).

2. JUSTIFICACIÓN

La resistencia antimicrobiana es un problema de salud que amenaza la eficacia de los tratamientos antibióticos y aumenta la mortalidad asociada a las infecciones bacterianas.

A nivel mundial, la frecuencia de infecciones causadas por cepas multifármacorresistentes de *P. aeruginosa* ha aumentado, lo que ha incrementado la carga sobre los sistemas de salud.

En *P. aeruginosa* se ha detectado la presencia de múltiples mecanismos asociados a la resistencia a los antibióticos, incluyendo la presencia de porinas y bombas de eflujo, por lo que es relevante investigar, además de la presencia de carbapenemasas, la participación de estos mecanismos en la resistencia a los antibióticos en aislados clínicos provenientes de hospitales en México, lo cual proporciona información que podría ayudar a la optimización del uso de antibióticos y la implementación de medidas preventivas en entornos hospitalarios nacionales.

3. HIPÓTESIS

La sobreexpresión de bombas de eflujo y la subexpresión de *oprD* impacta en la farmacorresistencia en cepas de *P. aeruginosa* aisladas en México.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Analizar el impacto de la expresión de porinas y bombas de eflujo en la resistencia a los antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* en hospitales de México.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar el perfil de susceptibilidad a los antibióticos en cepas de *P. aeruginosa*.
2. Obtener las secuencias de genoma completo de aislados de *P. aeruginosa*.
3. Llevar a cabo el análisis bioinformático de la secuencias obtenidas de *P. aeruginosa*.
4. Analizar la cinética de crecimiento en cepas seleccionadas
5. Evaluar la expresión de genes de porinas y bombas de eflujo en cepas seleccionadas.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

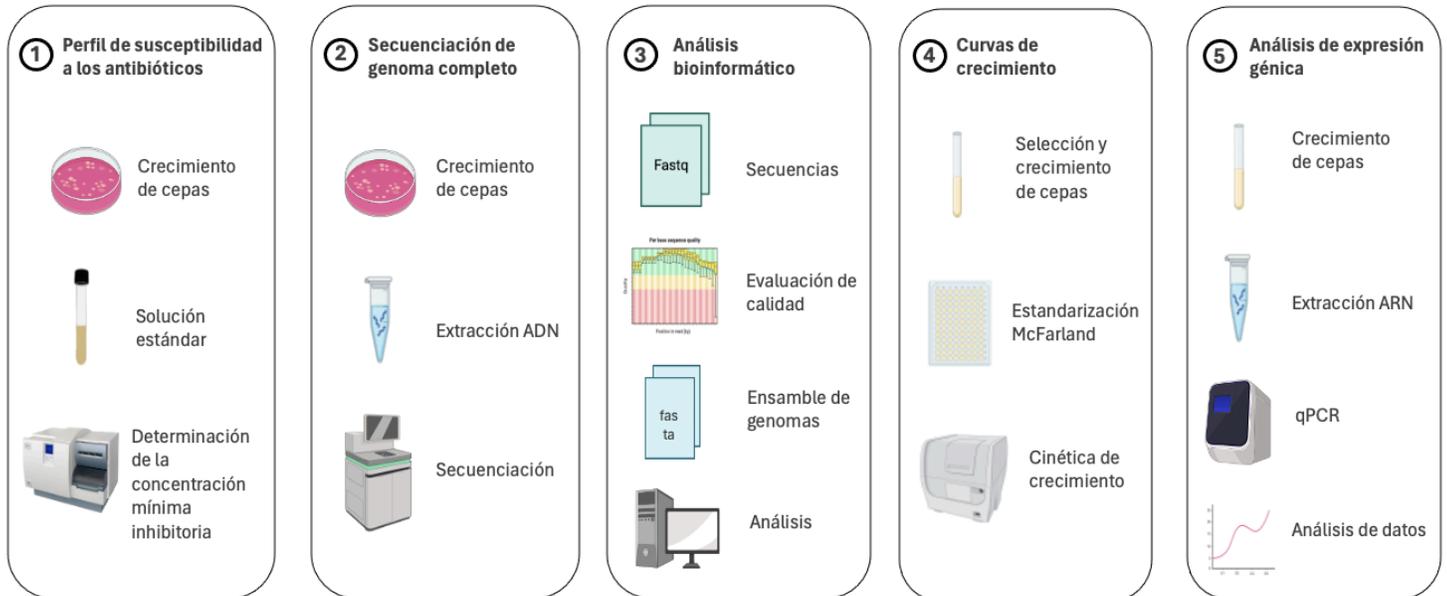


Figura 3. Esquema de la estrategia general experimental.

La estrategia general del estudio consistió en cinco enfoques metodológicos: primero, se determinó el perfil de susceptibilidad de las cepas mediante la obtención de la concentración mínima inhibitoria (CMI) ; posteriormente, se llevó a cabo la secuenciación del genoma completo y se realizaron los análisis bioinformáticos correspondientes con las secuencias obtenidas. Como cuarto paso, se evaluó la cinética de crecimiento de las cepas y finalmente, se analizó la expresión génica por qPCR en tiempo real.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cepas de estudio

Se incluyeron 136 cepas de *P. aeruginosa* almacenadas en el cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular a -70 °C en caldo nutritivo con glicerol al 15%. Estas cepas fueron recolectadas entre los años 2021 y 2023 a partir de diferentes tipos de muestras clínicas, principalmente de sangre, secreciones bronquiales y orina. Las cepas se recolectaron de 16 estados de la República Mexicana, y las entidades con mayor número de cepas fueron el Estado de México, Jalisco, Chiapas y Michoacán. Se seleccionaron cepas con no susceptibilidad al menos un carbapenémico. La distribución detallada de las cepas se presenta en la Tabla 1.

Objetivo 1

6.2 Perfil de susceptibilidad a antibióticos

Se determinó el perfil de susceptibilidad a los antibióticos de cada aislamiento usando el equipo VITEK 2® (bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, Francia), el cual utiliza una variante del método de microdilución en caldo. Para esto, se seleccionaron colonias bacterianas a partir de cultivos incubados durante 18-24 horas a 37 °C. Estas colonias se resuspendieron en solución salina estéril hasta alcanzar una turbidez de 0.5 McFarland. La suspensión preparada se colocó en viales estériles, que junto con las tarjetas se insertaron en el módulo de llenado del sistema. Las tarjetas se llenaron de manera automatizada y se sellaron. Las tarjetas selladas se colocaron en el lector del VITEK 2®, donde se incubaron a 37 °C. El equipo realizó lecturas periódicas para monitorear el crecimiento bacteriano en las diferentes concentraciones de la tarjeta. El equipo calculó la CMI para cada antibiótico incluido en la tarjeta. Se incluyeron piperacilina/tazobactam (TZP), ceftazidima (CAZ), cefepima (FEP), ceftazidima/avibactam (CZA), ceftalozano/tazobactam (CT), imipenem (IPM), meropenem (MRP), amikacina (AMK), tobramicina (TOB), ciprofloxacino (CIP), levofloxacino (LVX), aztreonam (ATM) y colistina (CL).

La interpretación de resultados se realizó de acuerdo con las directrices de la guía M100 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) 2024.

Tabla 1. *Distribución de las muestras de estudio, ordenadas por fecha de recolección.*

Cepa	Fecha	Muestra	Hospital	Estado
56	28/01/21	Sangre	Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia	Estado de México
70	28/01/21	Sangre	Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia	Estado de México
74	28/01/21	Sangre	Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia	Estado de México
76	28/01/21	Sangre	Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia	Estado de México
77	28/01/21	Sangre	Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia	Estado de México
78	28/01/21	Sangre	Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia	Estado de México
92	28/01/21	Sangre	Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia	Estado de México
127	28/01/21	Sangre	Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia	Estado de México
180	02/02/21	Orina	Hospital Regional de Alta Especialidad del Bajío	Guanajuato
220	20/02/21	Traqueal	Laboratorio Clínico Hospital Galenia	Quintana Roo
221	20/02/21	Bronquial	Laboratorio Clínico Hospital Galenia	Quintana Roo
249	16/03/21	Bronquial	Hospital General del Estado "Dr. Ernesto Ramos Bours"	Sonora
250	16/03/21	Bronquial	Hospital General del Estado "Dr. Ernesto Ramos Bours"	Sonora
264	15/03/21	Bronquial	Centro Médico Dr. Ignacio Chávez, ISSSTESON	Sonora
265	15/03/21	Bronquial	Centro Médico Dr. Ignacio Chávez, ISSSTESON	Sonora
281	23/07/21	Diverso	Instituto nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"	Ciudad de México
282	08/02/21	Diverso	Instituto nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"	Ciudad de México
283	08/05/21	Diverso	Instituto nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"	Ciudad de México
296	28/01/21	Sangre	Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia	Estado de México
317	12/01/21	Orina	Hospital general de Zona No.21 IMSS Tepatitlán de Morelos, Jalisco	Jalisco
318	12/01/21	Orina	Hospital general de Zona No.21 IMSS Tepatitlán de Morelos, Jalisco	Jalisco
319	26/01/21	Orina	Hospital regional de Alta Especialidad de Oaxaca	Oaxaca
321	26/01/21	Orina	Hospital regional de Alta Especialidad de Oaxaca	Oaxaca
618	26/01/21	Bronquial	Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca	Oaxaca
629	26/01/21	Bronquial	Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca	Oaxaca
660	08/02/21	Sangre	Hospital Centenario "Miguel Hidalgo"	Aguascalientes
662	08/02/21	Sangre	Hospital Centenario "Miguel Hidalgo"	Aguascalientes
665	08/02/21	Sangre	Hospital Centenario "Miguel Hidalgo"	Aguascalientes
787	10/03/21	Diverso	Hospital General "Dr. Raymundo Abarca Alarcón"	Guerrero
788	10/03/21	Diverso	Hospital General "Dr. Raymundo Abarca Alarcón"	Guerrero
789	10/03/21	Diverso	Hospital General "Dr. Raymundo Abarca Alarcón"	Guerrero
790	10/03/21	Diverso	Hospital General "Dr. Raymundo Abarca Alarcón"	Guerrero
805	17/01/21	Traqueal	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"	Ciudad de México
806	17/01/21	Traqueal	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"	Ciudad de México
807	17/01/21	Traqueal	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"	Ciudad de México

808	17/01/21	Traqueal	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”	Ciudad de México
990	2021	Orina	Hospital general de Zona No. 21 IMSS	Jalisco
993	2021	Sangre	Hospital general de Zona No. 21 IMSS	Jalisco
1038	15/09/21	Sangre	Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia	Estado de México
1043	15/09/21	Sangre	Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia	Estado de México
1060	15/09/21	Sangre	Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia	Estado de México
1062	15/09/21	Sangre	Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia	Estado de México
1063	15/09/21	Sangre	Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia	Estado de México
1087	15/09/21	Sangre	Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia	Estado de México
1189	19/01/22	Sangre	Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia	Estado de México
1395	09/09/22	Sangre	Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia	Estado de México
1489	22/09/22	Sangre	Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”	Jalisco
1516	22/09/22	Sangre	Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”	Jalisco
1545	22/09/22	Sangre	Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”	Jalisco
1553	22/09/22	Líquido cefalorraquídeo	Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”	Jalisco
1573	22/09/22	Líquido cefalorraquídeo	Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”	Jalisco
1574	22/09/22	Sangre	Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”	Jalisco
1590	22/09/22	Sangre	Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”	Jalisco
1593	22/09/22	Sangre	Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”	Jalisco
1597	22/09/22	Sangre	Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”	Jalisco
1601	22/09/22	Sangre	Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”	Jalisco
1609	22/09/22	Sangre	Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”	Jalisco
1669	22/09/22	Sangre	Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”	Jalisco
1670	22/09/22	Líquido cefalorraquídeo	Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”	Jalisco
1675	22/09/22	Líquido peritoneal	Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”	Jalisco
1676	22/09/22	Líquido peritoneal	Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”	Jalisco
1681	22/09/22	Líquido pleural	Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”	Jalisco
1683	22/09/22	Sangre	Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”	Jalisco
1685	30/09/22	Bronquial	Laboratorios del Centro	Michoacán
1686	30/09/22	Traqueal	Laboratorios del Centro	Michoacán
1687	30/09/22	Bronquial	Laboratorios del Centro	Michoacán
1689	11/10/22	Sangre	Hospital General “Juan María Salvatierra”	Baja California Sur
1690	11/10/22	Absceso	Hospital General “Juan María Salvatierra”	Baja California Sur
1701	18/10/22	Líquido pericárdico	Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca	Oaxaca
1702	18/10/22	Bronquial	Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca	Oaxaca
1703	18/10/22	Orina	Hospital Regional de Alta Especialidad de Oaxaca	Oaxaca
1777	15/11/22	Bronquial	Hospital Ángeles Chihuahua	Chihuahua
1778	15/11/22	Bronquial	Hospital Ángeles Chihuahua	Chihuahua

1783	01/12/22	Orina	Laboratorio Futura médica	Michoacán
1784	01/12/22	Orina	Laboratorio Futura médica	Michoacán
1785	01/12/22	Líquido cefalorraquídeo	Hospital General del Estado "Dr. Ernesto Ramos Bours"	Sonora
1788	01/12/22	Líquido cefalorraquídeo	Hospital General del Estado "Dr. Ernesto Ramos Bours"	Sonora
1803	01/12/22	Sangre	Hospital general de zona No.1 Nueva Frontera	Chiapas
1815	01/12/22	Tejido	Hospital Centenario "Miguel Hidalgo"	Aguascalientes
1819	01/12/22	Sangre	Hospital Centenario "Miguel Hidalgo"	Aguascalientes
1826	01/12/22	Bronquial	Hospital General de Zona No. 46 IMSS	Tabasco
1837	02/12/22	Bronquial	Laboratorio Koch	Estado de México
1838	02/12/22	Bronquial	Laboratorio Koch	Estado de México
1839	02/12/22	Bronquial	Laboratorio Koch	Estado de México
1841	02/12/22	Sangre	Laboratorio Koch	Estado de México
1842	02/12/22	Bronquial	Laboratorio Koch	Estado de México
1847	02/12/22	Orina	Laboratorio Koch	Estado de México
1868	05/12/22	Diverso	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío"	Ciudad de México
1869	05/12/22	Diverso	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío"	Ciudad de México
1871	05/12/22	Diverso	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío"	Ciudad de México
1878	05/12/22	Diverso	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío"	Ciudad de México
1879	05/12/22	Diverso	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío"	Ciudad de México
1884	05/12/22	Diverso	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío"	Ciudad de México
1885	05/12/22	Diverso	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío"	Ciudad de México
1894	08/12/22	Bronquial	Sanatorio la Luz	Michoacán
1939	09/12/22	Orina	Hospital de Especialidades Pediátricas	Chiapas
1940	09/12/22	Orina	Hospital de Especialidades Pediátricas	Chiapas
1942	09/12/22	Orina	Hospital de Especialidades Pediátricas	Chiapas
1943	09/12/22	Orina	Hospital de Especialidades Pediátricas	Chiapas
1944	09/12/22	Orina	Hospital de Especialidades Pediátricas	Chiapas
1959	09/12/22	Bronquial	Hospital de Especialidades Pediátricas	Chiapas
1960	09/12/22	Bronquial	Hospital de Especialidades Pediátricas	Chiapas
1961	09/12/22	Bronquial	Hospital de Especialidades Pediátricas	Chiapas
1962	09/12/22	Bronquial	Hospital de Especialidades Pediátricas	Chiapas
1964	09/12/22	Bronquial	Hospital de Especialidades Pediátricas	Chiapas
1985	09/12/22	Sangre	Hospital de Especialidades Pediátricas	Chiapas
1986	09/12/22	Sangre	Hospital de Especialidades Pediátricas	Chiapas
1989	09/12/22	Sangre	Hospital de Especialidades Pediátricas	Chiapas
1993	09/12/22	Sangre	Hospital de Especialidades Pediátricas	Chiapas
1994	09/12/22	Sangre	Hospital de Especialidades Pediátricas	Chiapas
2008	09/12/22	Líquido pleural	Hospital de Especialidades Pediátricas	Chiapas

2014	09/12/22	Sangre	Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia	Estado de México
2023	09/12/22	Sangre	Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia	Estado de México
2218	23/02/23	Líquido cefalorraquídeo	Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde"	Jalisco
2224	01/03/23	Sangre	Hospital General Sabinas Hidalgo	Nuevo León
2237	10/01/21	Bronquial	Hospital general de zona No.1 Nueva Frontera	Chiapas
2238	14/03/23	Orina	Hospital general de zona No.1 Nueva Frontera	Chiapas
2240	22/03/23	Traqueal	Hospital Ángeles de Morelia	Michoacán
2276	24/03/23	Sangre	Hospital Regional Universitario de Colima	Colima
2279	24/03/23	Secreción hepática	Hospital Regional Universitario de Colima	Colima
2280	24/03/23	Orina	Hospital Regional Universitario de Colima	Colima
2310	27/03/23	Sangre	Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia	Estado de México
2355	27/03/23	Sangre	Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia	Estado de México
2386	28/04/23	Líquido pleural	Centro Médico Dr. Ignacio Chávez, ISSSTESON	Sonora
2447	09/06/23	Líquido cefalorraquídeo	Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde"	Jalisco
2588	04/07/23	Líquido se ascitis	Centenario Hospital "Miguel Hidalgo"	Aguascalientes
2590	04/07/23	Biopsia	Centenario Hospital "Miguel Hidalgo"	Aguascalientes
2594	04/07/23	Líquido de ascitis	Centenario Hospital "Miguel Hidalgo"	Aguascalientes
2622	11/07/23	Orina	Hospital general de zona No.1 Nueva Frontera	Chiapas
2623	11/07/23	Hueso	Laboratorios Galindo	Oaxaca
2638	11/08/23	Orina	Laboratorio Dipromi	Michoacán
2639	11/08/23	Orina	Laboratorio Dipromi	Michoacán
2642	18/08/23	Sangre	Hospital General del Estado "Dr. Ernesto Ramos Bours"	Sonora
2922	06/10/23	Líquido Pleural	Laboratorio Dipromi	Michoacán
2941	16/10/23	Sangre	Hospital General "Dr. Miguel Silva"	Michoacán
2943	16/10/23	Sangre	Hospital General "Dr. Miguel Silva"	Michoacán
2946	16/10/23	Lavado bronquial	Hospital General "Dr. Miguel Silva"	Michoacán
2948	16/10/23	Lavado bronquial	Hospital General "Dr. Miguel Silva"	Michoacán
2954	16/10/23	Lavado bronquial	Hospital General "Dr. Miguel Silva"	Michoacán
2956	16/10/23	Líquido cefalorraquídeo	Hospital General "Dr. Miguel Silva"	Michoacán

Objetivo 2

6.3 Secuenciación de genoma completo y procesamiento de datos

6.3.1 Extracción de ADN genómico y plasmídico

Se cultivaron las 136 cepas de estudio en placas con agar MacConkey y se incubaron por 24 horas a 37 °C. Una vez que hubo crecimiento bacteriano, se procedió a la lisis celular, para lo cual se resuspendieron colonias del cultivo en 200 µL de Tris-HCl 100 mM, se añadió 150 µg de lisozima (VWR Life Science, Pensilvania, Estados Unidos) y se incubó por 2 horas a 37 °C. Posteriormente, se adicionaron 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 55 °C por 2 horas. Se procedió con la separación de fases y se añadieron 250 µL de fenol saturado (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos), 250 µL de SEVAG (24:1 Cloroformo-alcohol isoamílico) (Sigma-Aldrich), 100 µL de TE 1X y se mezcló agitando por inversión durante 5 min. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se volvió a extraer con fenol saturado, SEVAG y TE 1X utilizando los volúmenes previamente mencionados. Se transfirió la fase acuosa de la segunda extracción en un tubo nuevo y se añadieron 2.33 volúmenes de etanol absoluto frío (Sigma-Aldrich) y se dejó precipitar a -20 °C toda la noche. El precipitado se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos y se decantó el etanol. Se realizó 2 veces el lavado del sedimento con etanol al 70% y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos entre cada lavado. Se decantó el etanol y el sedimento fue secado a temperatura ambiente durante toda la noche. Se resuspendió el sedimento en 50 µL de TE 1X y se calentó a 65 °C por 15 minutos.

La concentración del ADN extraído se midió mediante espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Los valores entre 1.7 y 2.1 para la relación A260/A280 y entre 1.8 y 2.2 para la relación A260/A230 se usaron como criterios de calidad de la pureza del ADN (43), así como una concentración mínima de 75 ng/µL.

6.3.2 Secuenciación

Los ADN extraídos se secuenciaron en colaboración con el Servicio Nacional de Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) mediante la plataforma Illumina NovaSeq6000.

6.3.3 Evaluación de calidad de genomas

Se evaluó la calidad de las lecturas crudas en formato. fastq utilizando la herramienta --fastqc (<https://github.com/s-andrews/FastQC>) para cada lectura individual y se generó un reporte global de la calidad de los genomas para lo que se utilizó la herramienta --multiqc (<https://github.com/MultiQC/MultiQC>). Posterior a ello, se utilizó la herramienta Trim Galore (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>) para retirar adaptadores de secuenciación y eliminar las secuencias correspondientes a lecturas de calidad no óptimas.

6.3.4 Ensamble de genomas

Se ensamblaron las lecturas limpias de secuenciación *de novo* y se utilizó la herramienta informática Unicycler v0.4.9b (<https://github.com/rrwick/Unicycler>). Cada genoma ensamblado se evaluó en función de los siguientes parámetros: tamaño de genoma, % de GC, número total de contigs, N50, L50 a través de la herramienta (<https://github.com/ablab/quast>). Además, se utilizó el algoritmo weeSAM (<https://github.com/centre-for-virus-research/weeSAM>) para determinar la profundidad y el porcentaje de cobertura.

Objetivo 3

6.4 Análisis bioinformático

6.4.1 Tipificación de secuencias multilocus (MLST)

Se utilizó la herramienta PubMLST (<https://github.com/tseemann/mlst>) para la asignación de secuencias tipo (STs) a cada genoma.

6.4.2 Anotación de secuencias

Se realizó la anotación de los genomas ensamblados en formato FASTA y se usó la herramienta Prokka v1.14.6 (<https://github.com/tseemann/prokka>) ejecutado con los parámetros por defecto y se especificó el organismo como *P. aeruginosa*.

6.4.3 Pangenoma

El análisis del pangenoma se realizó utilizando la herramienta bioinformática Panaroo (<https://github.com/gtonkinhill/panaroo>), a partir de los archivos de anotación en formato GFF de cada genoma y de las cepas de referencia PAO1 (RefSeq: GCF_000006765.1), PA14 (RefSeq: GCF_000014625.1) y PA7 (GCF_000014625.1). Se empleó el modo estricto de limpieza de errores (`--clean_mode strict`) para minimizar errores de anotaciones inconsistentes. La identificación de genes del genoma core se efectuó con un umbral de presencia del 99% entre los genomas analizados (`--core_threshold 0.99`). Para el alineamiento de los genes del genoma central se utilizó MAFFT como alineador interno y se generaron tanto el alineamiento concatenado del genoma central como los archivos de presencia/ausencia de genes para su posterior análisis filogenético.

6.4.4 Filogenia del genoma central

Para la construcción del árbol filogenético basado en el genoma central, se utilizó el archivo de alineamiento concatenado del pangenoma. Este alineamiento fue dividido en particiones correspondientes a cada gen del genoma central mediante un script en Python y se generó un archivo en formato Nexus.

El análisis filogenético se llevó a cabo con IQ-TREE 2 (<https://github.com/iqtree/iqtree2>), se utilizó la opción `-p` para definir el esquema de particiones, lo cual permitió la selección de modelos evolutivos independientes por gen. Se aplicó el modelo MFP+MERGE, que permite la selección automática del mejor modelo evolutivo por partición.

La robustez del árbol fue evaluada mediante 1,000 replicados de ultrafast bootstrap (-B 1000). El árbol resultante fue visualizado y anotado usando el software en línea iTOL (<https://itol.embl.de/>).

6.4.2 Filogenia basada en variantes

El llamado de variantes se realizó utilizando la herramienta Snippy v4.6.0 (<https://github.com/tseemann/snippy>), que alinea las secuencias crudas de cada aislado contra el genoma de referencia de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y se generó un alineamiento consenso entre todas las cepas. A partir de este alineamiento, se construyó un árbol filogenético basado en variantes empleando IQ-TREE 2, y la visualización del árbol fue realizada con el software iTOL.

6.4.8 Identidad nucleotídica promedio

Se construyó un mapa de calor a partir de los valores de Identidad Nucleotídica Promedio (ANI) obtenidos de las secuencias genómicas en formato FASTA, para la cual se utilizó la herramienta ANIclustermap (<https://github.com/moshi4/ANIclustermap>), la cual emplea el algoritmo de FastANI (<https://github.com/ParBLiSS/FastANI>) para el cálculo de similitudes entre genomas.

6.4.9 Resistoma

Se identificaron los genes relacionados con la resistencia antimicrobiana mediante el software EPISEQ® CS de bioMérieux (<https://www.biomerieux-episeq.com/cs-how-it-works>) así como otras bases de datos como ResFinder (<http://genepi.food.dtu.dk/resfinder>) (44) y Resistance Gene Identifier de The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (<https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>). Se catalogó a los genes que codifican carbapenemasas de acuerdo con la Beta-Lactamase DataBase (<http://bldb.eu/>).

6.4.9 Identificación de mutaciones en las secuencias nucleotídicas

Se identificaron los tipos de mutaciones presentes en las secuencias nucleotídicas para lo cual se utilizaron los archivos generados por Snippy v4.6.0, y se extrajeron las variantes anotadas que

correspondieran a los genes *oprD*, *mexA*, *mexB*, *oprM*, *mexC*, *mexD*, *oprJ*, *mexE*, *mexF*, *oprN*, *mexX* y *mexY*.

Además, a partir de los archivos de anotación del genoma, se extrajeron las secuencias nucleotídicas y se alinearon las secuencias de estos genes en las cepas de estudio con respecto a las secuencias de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1, para lo cual se utilizó el software de alineamiento múltiple MAFFT (<https://github.com/GSLBiotech/mafft>).

6.4.9.1 Análisis de mutaciones en *oprD*

Se construyó un cladograma a partir del alineamiento de las secuencias nucleotídicas de *oprD* y se visualizó en el software iTOL. En este árbol se integraron los datos del perfil de susceptibilidad, la presencia o ausencia de genes que codifican carbapenemasas y las mutaciones encontradas según su tipo (mutaciones sin sentido, mutaciones con cambio de sentido, desplazamiento de marco de lectura, inserciones). Así mismo, se realizó un análisis de correlación entre los tipos de mutaciones en *oprD* y la presencia o ausencia de genes que codifican carbapenemasas con los valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) para imipenem y meropenem, para lo cual se usó el software estadístico R (<https://www.r-project.org/>) y la librería ggplot (<https://ggplot2.tidyverse.org/>).

6.4.10 Docking molecular

Se realizó un análisis de acoplamiento molecular entre las porinas OprD en cepas seleccionadas y los antibióticos carbapenémicos imipenem y meropenem.

Las secuencias aminoacídicas, obtenidas de los archivos de anotación del genoma, fueron ingresadas en el servidor de Alphafold (<https://alphafoldserver.com/>) para la predicción estructural tridimensional de la proteína OprD. Las estructuras de los ligandos imipenem y meropenem fueron obtenidas en formato. sdf desde la base de datos PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

La preparación de las estructuras se llevó a cabo en el software UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>), se añadieron los hidrógenos faltantes, se asignaron cargas parciales y se realizó la minimización de energía mediante los algoritmos de descenso más pronunciado (100 pasos) y gradiente conjugado (1000 pasos).

La caja de búsqueda (*grid box*) fue definida para cubrir las regiones potenciales de reconocimiento de sustratos en OprD, con las siguientes coordenadas y dimensiones:

center_x = 5.19286	size_x = 22.5691
center_y = 16.6316	size_y = 15.4834
center_z = -5.68987	size_z = 27.7502

Se realizó el docking utilizando Autodock Vina (<https://vina.scripps.edu/>) mediante la ejecución del archivo de configuración personalizado `vina.sh`, utilizando los parámetros `energy_range = 3`, `exhaustiveness = 24` y `num_modes = 1`.

Como control, se realizó el acoplamiento con la estructura de OprD correspondiente a la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 y arginina como sustrato específico.

Las interacciones proteína-ligando fueron analizadas y visualizadas mediante LigPlot+ (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>) usando los archivos .pdb resultantes del acoplamiento molecular.

6.5 Selección de cepas

Con base en los resultados obtenidos en los objetivos 1 a 3, se seleccionaron cepas para los análisis de los objetivos 4 y 5, tomando en cuenta la presencia y cobertura de genes que codifican para bombas y porinas, el perfil de susceptibilidad y el resultado de MLST.

Objetivo 4

6.5 Cinética de crecimiento en cepas

Las cepas seleccionadas se cultivaron en agar MacConkey durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente, se inocularon en caldo LB bajo tres condiciones experimentales: sin antibiótico, con imipenem y con meropenem. Para cada cepa, se utilizó su correspondiente CMI, determinada previamente en el objetivo 1. Para ello, se prepararon soluciones stock de imipenem y meropenem por el método de difusión en caldo a partir de discos comerciales (Sensidisk®, BD-BBL), asegurando la concentración deseada para cada cepa. Una vez se observó crecimiento en los cultivos, se ajustó la densidad celular a 0.5 unidades en la escala de McFarland y se usó caldo LB o caldo LB suplementado con antibiótico, según la condición correspondiente. Posteriormente, se inoculó 1 µL de esta suspensión ajustada en 99 µL de caldo LB fresco, con o sin antibiótico, en placas de 96 pozos, respetando en todos los casos el tipo y la concentración de antibiótico previamente establecidos para cada cepa. Las placas fueron incubadas en el equipo Cytation I (BioTek, Vermont, Estados Unidos), y se realizaron lecturas de densidad óptica a 600 nm cada 10 minutos durante 48 horas a 37 °C. Las mediciones se realizaron con lectura por intervalos y con agitación orbital continua a 300 rpm. Se seleccionaron los tiempos de extracción de ARN en la fase exponencial para cada cepa y condición.

Objetivo 5

6.5 Análisis de la expresión de genes de bombas de eflujo y porinas

6.5.1 Extracción de ARN

Las cepas seleccionadas se incubaron en caldo LB bajo cada una de las condiciones previamente descritas, a 37 °C durante los tiempos definidos en el objetivo 4. Los cultivos fueron centrifugados a 15,000 rpm durante 3 minutos y el sobrenadante fue descartado. La biomasa se resuspendió en una solución de lisozima (150 µg) y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 6 µL de proteinasa K (10 mg/mL) y la mezcla se incubó por 1 hora a 55 °C. Una vez pasada el tiempo de incubación se añadió 1 mL de TRIZOL LS y el contenido fue almacenado a -20°C hasta su extracción. Se agregaron 200 µL de cloroformo, se incubó 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 14.000 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado, se añadieron 500 µL

de isopropanol para su precipitación y se incubó a -80°C por una hora. Se realizó una centrifugación a 14,000 rpm por 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se añadió 1 mL de etanol al 70 % y se agitó por vortex brevemente. Se realizó una centrifugación a 14,000 rpm por 10 min a 4°C , el etanol fue descartado y la pastilla fue secado a temperatura ambiente para ser resuspendida en 30 μL de agua libre de nucleasas y almacenado a -80°C hasta su uso. Se verificó la concentración por espectrofotometría en el equipo Nanodrop 2000 así como la pureza del ARN (45).

6.5.2 Retrotranscripción y qPCR

El ARN total fue tratado con DNasa I (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante, con el fin de eliminar posibles residuos de ADN genómico. Se llevó a cabo la síntesis de ADN complementario (cDNA) utilizando los kits SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher) y M-MLV Reverse Transcriptase, conforme a las recomendaciones de cada fabricante. El cDNA obtenido fue almacenado a -80°C hasta su uso (46).

Se midió la expresión de los genes *oprD*, *mexA*, *mexC*, *mexE*, *mexY* y se para comparar con el nivel de expresión de cada gen con la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1. Así mismo, se determinó en paralelo la expresión del gen endógeno *rpsL* para normalizar las lecturas c (46, 47). Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas en el estudio se encuentran en el Anexo 1.

Las reacciones de PCR se realizaron en tubos de 0.1 μL utilizando un volumen final de 10 μL . La mezcla de reacción consistió en 1 μL ADNc, 1 μL cebador, 1.5 μL SYBR Green PCR Master Mix, 2.5 μL de Buffer, 1.5 μL de dNTPs y 2.5 μL agua libre de nucleasas. El programa de ciclado tuvo una activación inicial a 95°C durante 15 min, seguida de 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 s, apareamiento a 60°C durante 25 s, y elongación a 72°C durante 15 s. Después de la amplificación, se realizó una curva de disociación con una fase de 5 s a 95°C , seguida de 1 min a 65°C y un aumento final a 97°C . Cada reacción se hizo por triplicado. Se utilizó el método de Livak $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para determinar la sobreexpresión de los genes. Se aplicó el logaritmo base 2 para normalizar los valores de foldchange y se consideró subexpresión cuando el valor de $\log_2\text{FoldChange}$ fuese 1 unidad menor al de la cepa de referencia y sobreexpresión cuando el valor de $\log_2\text{FoldChange}$ correspondiente fuese 1 unidad mayor que el de la cepa de referencia (13).

6.6 Análisis estadístico

Se llevaron a cabo diferentes comparaciones entre los valores obtenidos tanto en la expresión génica de los diferentes genes de bombas de eflujo analizados, y de *oprD* así como mutaciones en el gen regulador *mexR*, la tasa de crecimiento y el fenotipo de resistencia a carbapenémicos de las cepas en las diferentes condiciones o filogrupos. Las comparaciones realizadas se muestran a continuación.

Se determinó la distribución de los valores de \log_2 FoldChange para cada gen (*oprD*, *mexA*, *mexC*, *mexE* y *mexY*) utilizando la prueba de Shapiro-Wilk.

Posteriormente se comparó la expresión de *oprD* y los genes de bombas de eflujo (*mexA*, *mexC*, *mexE* y *mexY*) en las tres condiciones (sin antibiótico, con imipenem y con meropenem). Para los datos paramétricos se usó ANOVA de medidas pareadas y prueba post-hoc de t. Para los datos no paramétricos se usó prueba de Friedman y prueba post-hoc de Wilcoxon con corrección de Bonferroni.

Se asoció la expresión de *oprD* y los genes de bombas de eflujo (*mexA*, *mexC*, *mexE* y *mexY*) en las tres condiciones (sin antibiótico, con imipenem y con meropenem) con el fenotipo de las cepas (susceptible, intermedio, resistente) a los carbapenémicos utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. Se comparó la expresión de *oprD* y los genes de bombas de eflujo (*mexA*, *mexC*, *mexE* y *mexY*) entre los filogrupos (PAO1 vs PA14 vs PA7) en las tres condiciones (sin antibiótico, con imipenem y con meropenem) utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y prueba post-hoc de Dunn con corrección de Bonferroni.

Se determinó si existe asociación entre las mutaciones en el gen regulador *mexR* con la expresión de *mexA* entre los filogrupos (PAO1 vs PA14 vs PA7) utilizando la prueba de Chi-Cuadrada.

Finalmente se correlacionó la tasa de crecimiento y el área bajo la curva con la expresión de *oprD* y la expresión de los genes de bombas de eflujo (*mexA*, *mexC*, *mexE* y *mexY*) en las tres condiciones (sin antibiótico, con imipenem y con meropenem) utilizando la prueba de correlación de Spearman.

Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo para todas las pruebas. El análisis se llevó a cabo usando el software R (<https://www.r-project.org/>, accesado el 10 de mayo de 2025).

7. RESULTADOS

Objetivo 1

7.1 Perfil de susceptibilidad

Los valores de CMI, rango, CMI₅₀ y CMI₉₀, así como la interpretación de los valores se detalla en la Tablas 2, 3 y 4.

En los carbapenémicos, el rango de CMI para IPM fue de 0.25 µg/mL->16 µg/mL y MRP de 0.5 µg/mL->16 µg/mL. Algunas cepas fueron resistentes a ambos antibióticos y otras mostraron resistencia selectiva, ya que fueron susceptibles a IPM, pero no a MRP, o viceversa. Los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ para IPM y MRP fueron >16 µg/mL, lo que indica un alto nivel de resistencia a estos antibióticos en las cepas estudiadas.

En los aminoglucósidos, el rango de CMI de AMK fue de 2 µg/mL->64 µg/mL y para TOB de 6 µg/mL->64 µg/mL. En algunos casos, las cepas fueron resistentes a TOB, pero mantuvieron susceptibilidad a AMK. Los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ para AMK fueron de >64 µg/mL en ambos casos, mientras que para TOB fueron >6 µg/mL y >24 µg/mL respectivamente, lo cual reflejó un patrón de resistencia elevado y variable.

Para las fluoroquinolonas, el rango de CMI de CIP fue de 0.25 µg/mL->4 µg/mL y LVX de 6 µg/mL-44 µg/mL. Similar a las otras clases de antibióticos, algunas cepas presentaron fueron resistentes a levofloxacin, pero no a ciprofloxacino. Los valores de CMI₅₀ y CMI₉₀ para CIP fueron de >4 µg/mL en ambos casos, mientras que para LVX fueron de 6 µg/mL y 32 µg/mL.

En la Tabla 4 se detalla muestra que todas las cepas presentaron fenotipo resistente al menos a dos categorías de antibióticos evaluados. La mayor resistencia se observó en los carbapenémicos (IPM y MRP, 90%), seguida de las fluoroquinolonas (LVX Y CIP, 100% y 71%, respectivamente) y los aminoglucósidos (TOB y AMK, 100% y 64%, respectivamente) (Figura 4). En contraste, la resistencia de ATM (9%) fue la menor, mientras que todas las cepas fueron intermedias para CL.

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$) para las cepas de estudio.

Cepa	TZP	CAZ	FEP	CZA	CT	IPM	MRP	AMK	TOB	CIP	LVX	ATM	CL
56	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	<2
70	8	2	2	2	0.5	2	<0.25	2	22	0.5	23	26	<2
74	16	8	8	2	1	2	0.5	4	20	0.25	23	22	<2
76	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	<2
77	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	14	>4	6	25	<2
78	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	13	>4	6	24	<2
92	64	>64	>32	>16	>32	>16	4	>64	14	>4	6	24	<2
127	64	>64	>32	>16	>32	>16	16	>64	14	>4	6	23	<2
180	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	<2
220	32	2	8	2	0.5	>16	>16	2	24	0.5	19	17	<2
221	<4	2	2	2	1	2	<0.25	2	21	0.25	26	24	<2
249	64	32	8	8	1	>16	>16	8	6	>4	6	20	<2
250	64	32	8	8	1	8	>16	8	6	>4	6	18	<2
264	8	16	8	2	1	>16	>16	>64	6	>4	6	25	<2
265	>128	>64	16	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	21	<2
281	64	32	>32	2	>32	2	<0.25	>64	6	1	15	24	<2
282	8	2	4	1	0.5	2	2	1	24	>4	12	27	<2
283	16	4	8	2	1	>16	8	1	27	2	10	24	<2
296	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	<2
317	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	12	<2
318	64	4	16	2	1	>16	>16	>64	6	>4	6	6	<2
319	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	10	<2
321	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	10	<2
618	8	2	2	2	1	8	8	2	23	0.12	26	27	<2
629	8	2	2	2	1	8	4	2	22	0.25	27	25	<2
660	64	>64	>32	8	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	15	<2
662	64	>64	>32	8	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	12	<2
665	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	25	<2
787	>128	32	16	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	23	<2
788	>128	>64	>32	>16	>32	>16	8	>64	6	>4	6	6	<2
789	32	8	16	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	23	<2
790	32	16	16	>16	>32	>16	>16	16	6	>4	6	26	<2
805	8	2	2	2	0.5	8	8	2	30	0.062	42	32	<2
806	>128	32	16	4	4	>16	>16	2	16	0.25	27	31	<2
807	16	2	2	2	0.5	8	>16	1	28	0.5	20	22	<2
808	32	2	8	4	1	>16	>16	4	28	1	16	21	<2
990	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	<2
993	>128	32	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	33	<2
1038	64	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	22	>4	6	31	<2
1043	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	14	6	<2
1060	>128	32	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	31	<2
1062	>128	32	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	14	6	<2
1063	64	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	22	>4	6	31	<2
1087	>128	32	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	<2
1189	>128	32	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	10	6	<2
1395	>128	32	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	31	<2
1489	>128	32	16	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	12	6	<2
1516	32	16	2	2	4	>16	>16	>64	6	0.5	34	36	<2
1545	16	2	8	2	1	2	1	4	28	0.125	38	28	<2
1553	8	2	2	2	1	>16	>16	>64	10	0.125	36	27	<2
1573	>128	32	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	30	<2
1574	8	2	2	2	1	>16	>16	32	10	0.125	43	36	<2
1590	8	2	2	2	1	>16	>16	>64	6	0.125	42	43	<2
1593	8	2	2	2	1	>16	>16	>64	6	0.125	44	41	<2
1597	32	2	4	4	0.5	4	8	1	33	0.5	26	28	<2
1601	8	2	2	2	1	>16	>16	>64	6	0.062	44	41	<2
1609	8	2	2	2	1	>16	>16	32	6	0.125	42	41	<2
1669	8	2	2	2	1	>16	>16	32	12	0.062	40	38	<2
1670	8	2	2	2	1	>16	>16	32	10	0.125	40	36	<2
1675	16	2	4	4	1	>16	>16	4	27	0.125	43	36	<2
1676	>128	2	8	2	1	8	>16	4	26	0.25	32	16	<2
1681	>128	32	16	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	34	<2
1683	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	<2
1685	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	<2
1686	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	<2
1687	16	2	4	2	1	>16	>16	4	20	>4	6	23	<2

1689	<4	2	2	2	0.5	8	4	2	24	0.125	34	30	↔
1690	<4	1	1	1	0.5	>16	4	2	23	2	29	30	↔
1701	64	32	16	>16	>32	>16	>16	64	6	>4	6	25	↔
1702	32	>64	16	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	26	↔
1703	32	16	8	>16	32	>16	>16	>64	6	>4	6	27	↔
1777	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	↔
1778	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	↔
1783	64	>64	16	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	21	↔
1784	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	↔
1785	>128	>64	>32	>16	>32	>16	4	>64	6	>4	6	6	↔
1788	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	↔
1803	32	16	8	8	1	8	>16	2	23	1	13	17	↔
1815	8	>64	>32	>16	>32	>16	8	>64	17	2	16	26	↔
1819	8	2	2	2	1	>16	4	4	20	>4	19	24	↔
1826	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	↔
1837	32	8	8	>16	0.5	>16	>16	2	21	1	16	17	↔
1838	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	↔
1839	8	2	2	2	0.5	>16	4	2	21	0.25	26	24	↔
1841	<4	2	2	1	2	>16	8	4	6	0.5	18	23	↔
1842	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	↔
1847	16	2	8	2	1	>16	>16	16	16	1	16	23	↔
1868	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	↔
1869	>128	32	>32	>16	>32	>16	>16	8	10	>4	6	12	↔
1871	32	2	8	2	0.5	2	1	4	20	1	17	18	↔
1878	64	16	8	8	1	>16	>16	4	23	0.5	20	13	↔
1879	32	16	8	8	1	>16	>16	2	21	0.5	18	15	↔
1884	64	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	↔
1885	>128	32	16	8	4	4	8	2	21	>4	12	17	↔
1894	8	2	2	2	0.5	>16	8	4	20	>4	10	20	↔
1939	8	2	2	2	1	2	>16	1	24	0.006	24	21	↔
1940	8	2	2	2	1	8	4	4	18	0.062	31	25	↔
1942	32	2	8	4	0.5	8	>16	2	21	0.5	18	17	↔
1943	8	2	4	2	1	>16	8	4	20	0.25	23	23	↔
1944	32	2	4	2	0.5	>16	>16	1	23	0.125	24	21	↔
1959	8	2	2	2	1	2	8	1	24	0.062	30	26	↔
1960	>128	>64	16	2	4	8	8	4	21	0.125	24	26	↔
1961	>128	>64	>32	>16	1	>16	>16	16	17	0.5	19	15	↔
1962	8	2	4	2	1	>16	8	4	20	0.5	24	25	↔
1964	8	2	2	2	1	2	<0.125	>64	6	0.125	26	25	↔
1985	8	2	2	2	1	2	8	1	25	0.06	26	23	↔
1986	64	16	8	8	1	>16	>16	2	20	>4	21	20	↔
1989	32	2	8	8	1	>16	>16	32	24	1	18	16	↔
1993	8	2	2	2	0.5	>16	>16	2	23	0.25	24	20	↔
1994	16	8	4	2	0.5	>16	>16	>64	6	0.5	21	26	↔
2008	>128	16	8	8	1	>16	>16	2	20	0.5	20	20	↔
2014	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	↔
2023	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	26	↔
2218	8	2	2	2	0.5	>16	4	2	22	0.06	33	30	↔
2224	32	>64	16	4	8	>16	>16	>64	6	>4	6	18	↔
2237	16	2	16	8	1	>16	>16	2	24	>4	12	25	↔
2238	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	↔
2240	64	>64	>32	4	>32	>16	>16	16	12	>4	6	14	↔
2276	>128	16	16	8	1	>16	>16	32	6	>4	6	17	↔
2279	>128	32	16	8	4	>16	>16	>64	6	>4	6	15	↔
2280	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	↔
2310	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	↔
2355	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	↔
2386	>128	>64	16	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	21	↔
2447	32	32	16	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	23	↔
2588	64	8	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	16	↔
2590	16	2	8	2	1	>16	>16	4	23	0.5	16	18	↔
2594	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	↔
2622	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	↔
2623	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	↔
2638	32	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	12	↔
2639	16	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	↔
2642	32	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	26	↔
2922	32	2	8	2	1	>16	>16	>64	6	>4	6	21	↔
2941	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	↔
2943	16	2	8	4	1	>16	>16	4	23	0.5	21	20	↔

2946	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	6	<2
2948	>128	>64	>32	>16	>32	4	4	>64	6	>4	6	6	<2
2954	>128	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	12	<2
2956	64	>64	>32	>16	>32	>16	>16	>64	6	>4	6	14	<2

TZP: piperacilina/tazobactam; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepima; CZA: ceftazidima/avibactam; CT: ceftalozano/tazobactam; IPM: imipenem; MRP: meropenem; AMK: amikacina; TOB: tobramicina; CIP: ciprofloxacino; LVX: levofloxacino; ATM: aztreonam; CL: colistina

Tabla 3. Rangos de CMI, CMI₅₀, CMI₉₀ de las cepas de estudio.

Antibiótico	Rango CMI			CMI ₅₀	CMI ₉₀
Piperacilina/Tazobactam	<4	-	>128	64	>128
Ceftazidima	1	-	>64	32	>64
Cefepime	1	-	>32	16	>32
Cefotaxima	0.5	-	>32	>32	>32
Ceftazidima/Avibactam	1	-	>16	>16	>16
Imipenem	2	-	>16	>16	>16
Meropenem	<0.125	-	>16	>16	>16
Amikacina	1	-	>64	>64	>64
Tobramicina	6	-	33	6	24
Ciprofloxacino	0.006	-	>4	>4	>4
Levofloxacino	6	-	44	6	32
Aztreonam	6	-	43	21	31
Colistina	<2	-	<2	<2	<2

CMI= concentración mínima inhibitoria (µg/mL); CMI₅₀: concentración que inhibe el 50% de las cepas; CMI₉₀: concentración que inhibe el 90% de la cepa.

Tabla 4. Interpretación de los puntos de corte para las cepas incluidas en el estudio.

Cepa	TZP	CAZ	FEP	CZA	CT	IPM	MRP	AMK	TOB	CIP	LVX	ATM	CL
56	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
70	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	I	I
74	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	I	I
76	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
77	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
78	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
92	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	I	I
127	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
180	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
220	I	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	I	I
221	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	I	I
249	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	I	I
250	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	I	I
264	S	I	S	S	S	R	R	R	R	R	R	I	I
265	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
281	R	R	R	S	R	S	S	R	R	I	R	I	I
282	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	I	I
283	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	I	I
296	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
317	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
318	R	S	I	S	S	R	R	R	R	R	R	S	I
319	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
321	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
618	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	I	I
629	S	S	S	S	S	R	I	S	R	S	R	I	I
660	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	I	I
662	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	I	I
665	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
787	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
788	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
789	I	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
790	I	I	I	R	R	R	R	S	R	R	R	I	I
805	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	I
806	R	R	I	S	S	R	R	S	R	S	R	I	I
807	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	I	I
808	I	S	S	S	S	R	R	S	R	I	R	I	I
990	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
993	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I
1038	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I

1043	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
1060	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
1062	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
1063	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
1087	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
1189	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
1395	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
1489	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
1516	I	I	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	I
1545	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	I	I
1553	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	I	I
1573	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
1574	S	S	S	S	S	R	R	I	R	S	R	R	I
1590	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	I
1593	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	I
1597	I	S	S	S	S	I	R	S	R	S	R	I	I
1601	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	I
1609	S	S	S	S	S	R	R	I	R	S	R	R	I
1669	S	S	S	S	S	R	R	I	R	S	R	R	I
1670	S	S	S	S	S	R	R	I	R	S	R	R	I
1675	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	I
1676	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	I	I
1681	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I
1683	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
1685	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
1686	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
1687	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	I	I
1689	R	S	S	S	S	R	I	S	R	S	R	I	I
1690	R	S	S	S	S	R	I	S	R	R	R	I	I
1701	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
1702	I	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
1703	I	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
1777	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
1778	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
1783	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
1784	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
1785	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	I
1788	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
1803	I	I	S	S	S	R	R	S	R	I	R	I	I
1815	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
1819	S	S	S	S	S	R	I	S	R	R	R	I	I
1826	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
1837	I	S	S	R	S	R	R	S	R	I	R	I	I

1838	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
1839	S	S	S	S	S	R	I	S	R	S	R	I	I
1841	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	I	I
1842	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
1847	S	S	S	S	S	R	R	S	R	I	R	I	I
1868	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
1869	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	I	I
1871	I	S	S	S	S	S	S	S	R	I	R	I	I
1878	R	I	S	S	S	R	R	S	R	S	R	I	I
1879	I	I	S	S	S	R	R	S	R	S	R	I	I
1884	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
1885	R	R	I	S	S	I	R	S	R	R	R	I	I
1894	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R	I	I
1939	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	I	I
1940	S	S	S	S	S	R	I	S	R	S	R	I	I
1942	I	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	I	I
1943	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	I	I
1944	I	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	I	I
1959	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	I	I
1960	R	R	I	S	S	R	R	S	R	S	R	I	I
1961	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	I	I
1962	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	I	I
1964	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	I	I
1985	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	I	I
1986	R	I	S	S	S	R	R	S	R	R	R	I	I
1989	I	S	S	S	S	R	R	I	R	I	R	I	I
1993	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	I	I
1994	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	I	I
2008	R	I	S	S	S	R	R	S	R	S	R	I	I
2014	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
2023	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
2218	S	S	S	S	S	R	I	S	R	S	R	I	I
2224	I	R	I	S	I	R	R	R	R	R	R	I	I
2237	S	S	I	S	S	R	R	S	R	R	R	I	I
2238	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
2240	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	I	I
2276	R	I	I	S	S	R	R	I	R	R	R	I	I
2279	R	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R	I	I
2280	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
2310	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
2355	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
2386	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
2447	I	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I

2588	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
2590	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	I	I
2594	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
2622	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
2623	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
2638	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
2639	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
2642	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
2922	I	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	I	I
2941	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
2943	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	I	I
2946	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I
2948	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	S	I
2954	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I
2956	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	I

TZP: piperacilina/tazobactam; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepima; CZA: ceftazidima/avibactam; CT: ceftalozano/tazobactam; IPM: imipenem; MRP: meropenem; AMK: amikacina; TOB: tobramicina; CIP: ciprofloxacino; LVX: levofloxacino; ATM: aztreonam; CL: colistina.
R: resistente; I: intermedio; S: susceptible.

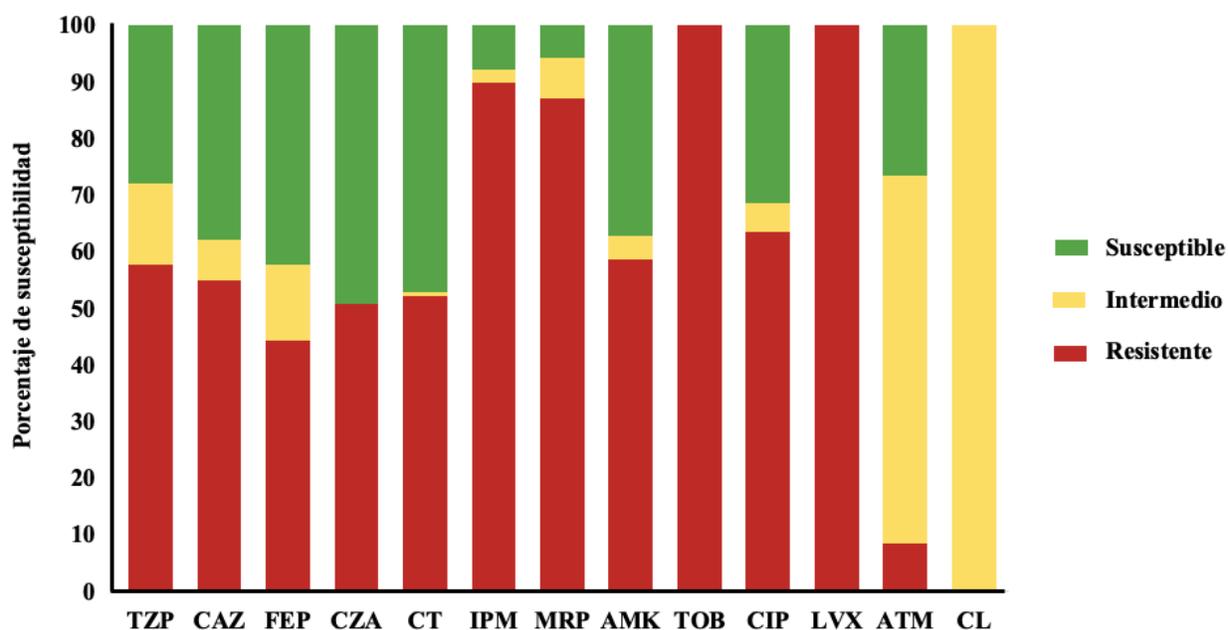


Figura 4. Patrones de susceptibilidad de las 136 cepas de *P. aeruginosa* incluidas en el estudio. TZP: piperacilina/tazobactam; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepima; CZA: ceftazidima/avibactam; CT: ceftalozano/tazobactam; IPM: imipenem; MRP: meropenem; AMK: amikacina; TOB: tobramicina; CIP: ciprofloxacino; LVX: levofloxacino; ATM: aztreonam; CL: colistina.

Objetivo 2

7.2 Secuenciación de genoma completo y procesamiento de datos

7.2.1 Extracción de ADN genómico

Las métricas de calidad de la extracción de ADN se resumen en la Tabla 5. Se consideraron parámetros de calidad las relaciones de la absorbancia 260/280 y 260/230 dentro del rango 1.8 y 2.0. Todas las muestras incluidas en el estudio cumplieron con los parámetros de calidad establecidos.

Tabla 5. *Parámetros de calidad de la extracción de ADN*

Cepa	Concentración [ng/μL]	Relación $\lambda_{260/280}$	Relación $\lambda_{260/230}$
56	2403.5	2.12	2.34
70	778.3	2.04	2.21
74	1818.1	2.08	2.21
76	159.9	2.05	2.13
77	482.6	2.02	1.73
78	1645.8	2.02	2.24
92	351.8	1.97	1.8
127	1088.1	2.07	2.3
180	204.9	2.04	2.33
220	1848.3	2.03	2.24
221	1044.6	2.06	2.26
249	785.2	1.82	2.1
250	821.2	2.04	2.33
264	793.8	1.93	2.29
265	771.6	1.99	2.16
281	996.1	1.79	1.93
282	798	1.97	2.25
283	1193.5	2.03	2.18
296	218.6	2.02	2.25
317	1708	2.09	2.28
318	1016.1	2.03	2.24
319	382.3	2.09	2.28
321	1814.6	2.13	2.1
618	581.5	1.92	1.94
629	1052.4	2.04	2.2
660	123.9	2.16	2.07
662	254.5	2.13	2.13
665	246.5	1.95	2.16
787	880	2.01	2.17
788	254.3	2.11	2.13
789	406.2	2.02	2.23
790	294.2	2.15	2.19
805	430.9	1.98	2.22
806	507.3	1.99	2.16
807	450.7	2	2.21
808	2042	2.02	2.2
990	1181.1	2.1	2.31
993	581.4	2	2.21

1038	837.2	1.95	2.13
1043	463.7	1.98	2.19
1060	731.1	1.99	2.18
1062	1590.6	2.11	2.09
1063	713.2	1.99	2.18
1087	216.2	1.97	2.11
1189	1321.5	2.06	2.35
1395	193.3	2.01	2.16
1489	874	1.98	2.03
1516	1593.3	2.1	2.26
1545	1631.6	2.12	2.24
1553	2067.7	2.09	2.29
1573	1192.7	1.96	1.88
1574	1316.8	2.08	2.26
1590	2382.4	2.09	2.29
1593	1021.8	2.11	2.3
1597	1253.5	2.01	2.07
1601	1396.7	2.04	2.22
1609	2377.9	2.06	2.24
1669	2795.5	2.05	2.22
1670	1291.2	2.11	2.29
1675	537.9	1.95	1.8
1676	229.6	2.06	2.43
1681	736.3	2.06	2.01
1683	315.2	1.95	2.29
1685	2020	2.08	2.13
1686	168.3	2.13	1.87
1687	859.5	2.07	2.39
1689	241.4	2.05	2.23
1690	1994	2.13	2.33
1701	1247.7	2.05	2.24
1702	1664.8	2.02	2.21
1703	244.8	2.06	2.48
1777	1806	2.06	2.25
1778	1750.2	2.06	2.28
1783	175.1	1.98	2.97
1784	1040.7	2.06	2.28
1785	1994.7	2.1	2.34
1788	1143.7	2.04	2.28
1803	711.3	2.05	2.49
1815	370.3	2.01	2.6

1819	1950.8	2.03	2.23
1826	357.5	2.1	2.17
1837	1594.7	2.07	2.11
1838	211.1	1.93	2.01
1839	554.8	2.01	2.06
1841	1459.5	2.09	2.34
1842	2033.6	2.08	2.3
1868	1154.6	2.11	2.26
1847	2227.3	2.1	2.3
1871	760	2.09	2.17
1878	377.4	2.02	2.01
1879	378	2	1.98
1884	3283.1	2.09	2.31
1885	1615.8	2.05	2.3
1894	1294	2	2.24
1939	510.2	2.1	2.09
1940	747	2.01	2.13
1942	683	2.04	2.17
1943	1593.3	2.04	2.23
1944	928.5	1.93	2.1
1959	366	1.94	1.9
1960	1417.3	2	2.14
1961	891.4	1.9	1.95
1962	1434.3	2.05	2.13
1964	1121.6	2.05	2.29
1985	315.7	1.84	1.85
1986	1577.4	2.06	2.31
1989	227.6	1.98	2.4
1993	1917.4	2.07	2.35
1994	189.6	1.86	2.41
2008	891.8	2.13	2.32
2014	1529.6	2.16	2.39
2023	910.2	2.05	2.03
2218	635.1	2.06	2.05
2224	763.8	2.09	2.34
2237	591.1	2.03	2.39
2238	205.7	2.11	2.43
2240	776.3	1.84	1.74
2276	885.6	1.95	1.64
2279	934.6	2.07	1.97
2280	1115.4	2.01	2.28

2310	507.3	2.01	2.29
2355	718	2.07	2.32
2386	424.3	1.91	1.99
2447	803.4	1.93	1.89
2588	298.6	2.06	2.59
2590	1286.7	2.06	2.28
2594	947.7	1.97	1.84
2622	809.5	2.11	2.37
2623	354.6	2.02	2.54
2628	1490.6	2.01	1.64
2629	1401.4	2.04	2.04
2642	444	2.14	2.34
2922	625	2.07	2.43
2941	245.6	1.88	2.25
2943	437.4	1.97	1.77
2946	549.5	1.8	2.4
2948	964.5	2.12	2.22
2954	440.6	1.98	1.84
2956	1166.9	1.98	1.84

7.2.2 Evaluación de calidad y ensamblaje de los genomas

Todas las lecturas crudas presentaron un puntaje de Phred superior a 30 (Figura 5) lo que indica una precisión en la identificación de los nucleótidos del 99.9%, garantizando la fiabilidad de los datos para análisis posteriores.

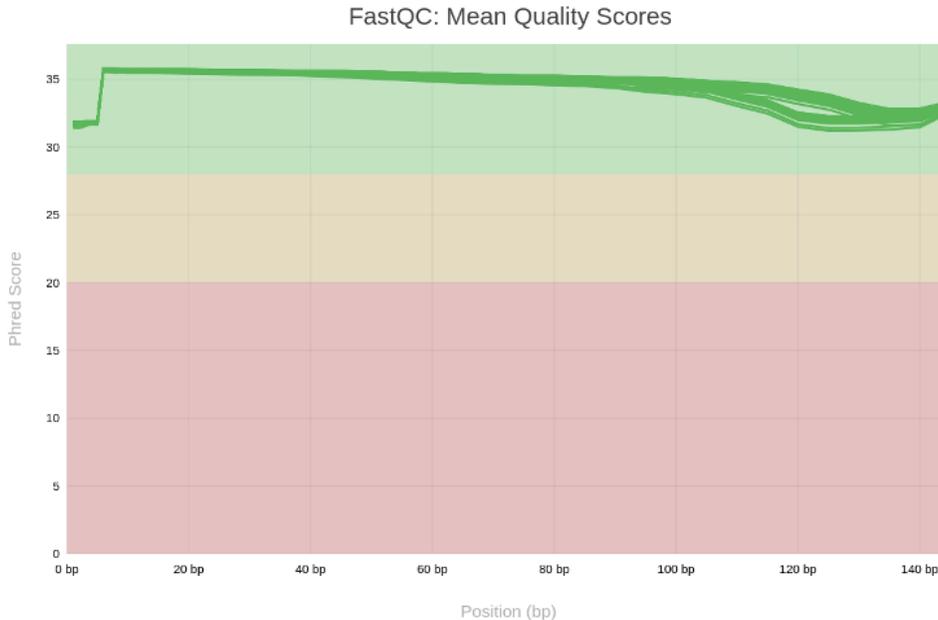


Figura 5. Resumen de los análisis de calidad de las lectura crudas. Se indica en las líneas verdes el puntaje de calidad de Phred para cada secuencia en la zona con puntaje > 30.

Los parámetros promedio de calidad de los ensamblajes genómicos obtenidos para las 136 cepas de *P. aeruginosa* se resumen en la Tabla 6. El tamaño promedio de los genomas fue de 6.77 Mb, con un contenido GC del 66 %. El número promedio de contigs fue de 91, con un valor de N50 de 285,542 pb y un L50 de 10. La cobertura genómica promedio fue del 95.83 %, con una profundidad de secuenciación de 69x. Las secuencias correspondientes se encuentran disponibles en la base de datos del NCBI con el número de acceso: PRJNA1211528 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA1211528>). Los parámetros de calidad de cada genoma ensamblado se encuentran en el Anexo 2.

Tabla 6. *Parámetros promedio de calidad de los genomas ensamblados de P. aeruginosa*

Parámetro	Promedio (n = 136)
Tamaño de genoma (pb)	6,775,960
% GC	66
No. de contigs	91
N50	285, 542
L50	10
% Cobertura	95.83
Profundidad	69x

Objetivo 3

7.3 Análisis bioinformático

7.3.1 Tipificación de secuencias multilocus (MLST)

En el análisis de tipificación multilocus (MLST), se identificaron 34 secuencias tipo (ST) en 127 cepas de estudio. En las 9 cepas restantes no se logró asignar una ST conocida, lo que sugiere que podrían corresponder a ST no reportadas previamente. Las secuencias con ST nuevo se enviaron a la base de datos PubMLST para la asignación de número de ST. Las ST de mayor frecuencia en las cepas de estudio fueron la ST 309 (n = 29), seguida de las ST 235 (n = 14), ST 111 (n = 13) y ST 2731 (n = 11). El resto de las ST se encontraron en menos de 10 cepas cada una (Figura 6). La relación completa entre las cepas analizadas y su correspondiente ST se detallan en el Anexo 3.

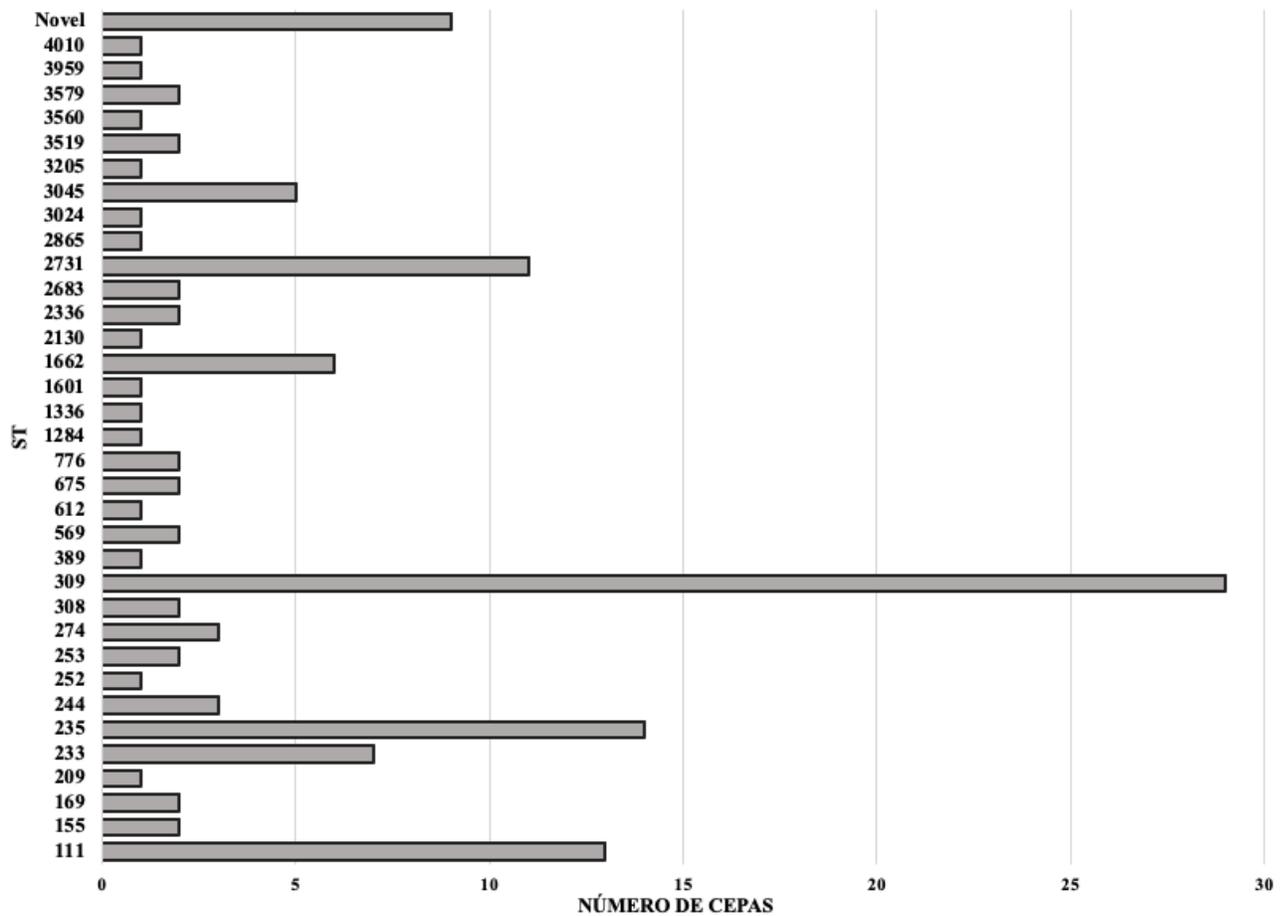


Figura 6. Frecuencias de las secuencias tipo (ST) en las cepas de estudio.

7.3.2 Identidad Nucleotídica Promedio (ANI)

El análisis de ANI reveló la presencia de tres grupos de cepas con alta similitud genética interna (ANI > 99 %). Los dos grupos más numerosos presentaron entre sí una similitud cercana al 98 %, mientras que el grupo menor mostró una similitud inferior al 94 % respecto a los otros dos, (Figura 7)

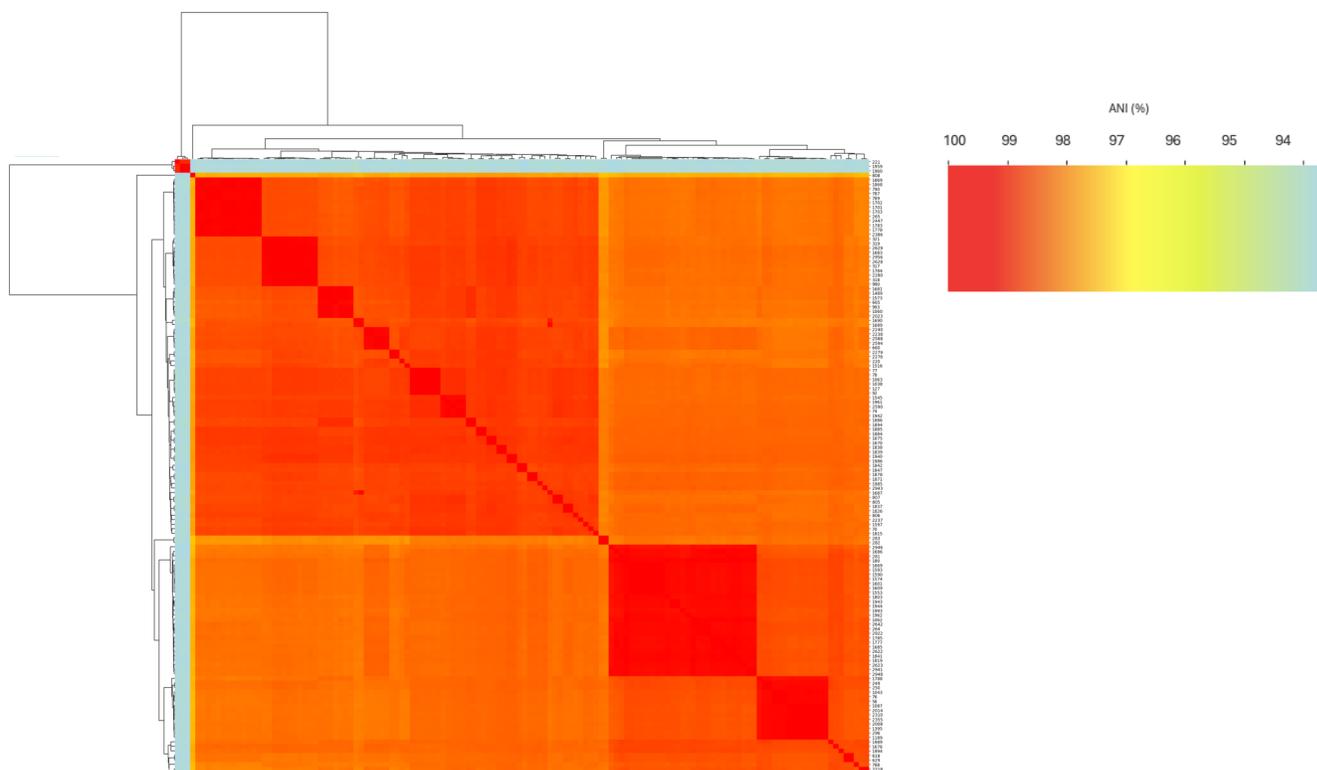


Figura 7. Mapa de calor con los valores del ANI.

7.3.3 Pangenoma

En la Tabla 7 se resumen los resultados del análisis del pangenoma de las 136 cepas de *P. aeruginosa*. Se identificaron 13,961 genes distribuidos en cuatro categorías: core, soft core, shell y cloud. Los genes core (4,283) y soft core (959) representan el 37.6% del pangenoma; en contraste, los shell genes (1,858) y cloud genes (6,861) constituyen el 62.5 %.

Tabla 7. *Composición del pangenoma de las cepas de estudio.*

Genes	No.	% del total	Presencia en cepas (%)
Core	4,283	30.7	99-100
Soft core	959	6.9	95-99
Shell	1,858	13.3	15-95
Cloud	6,861	49.2	0-15
Total	13,961	100	-

7.3.3 Filogenia del genoma central

En el árbol de máxima verosimilitud construido a partir de la filogenia del genoma central (Figura 8), se observa el alineamiento de las cepas de referencia (*P. aeruginosa* PAO1, PA14 y PA7) con las cepas analizadas, lo que confirma su identidad. La cepa PA7 forma un clado con tres de las cepas del estudio.

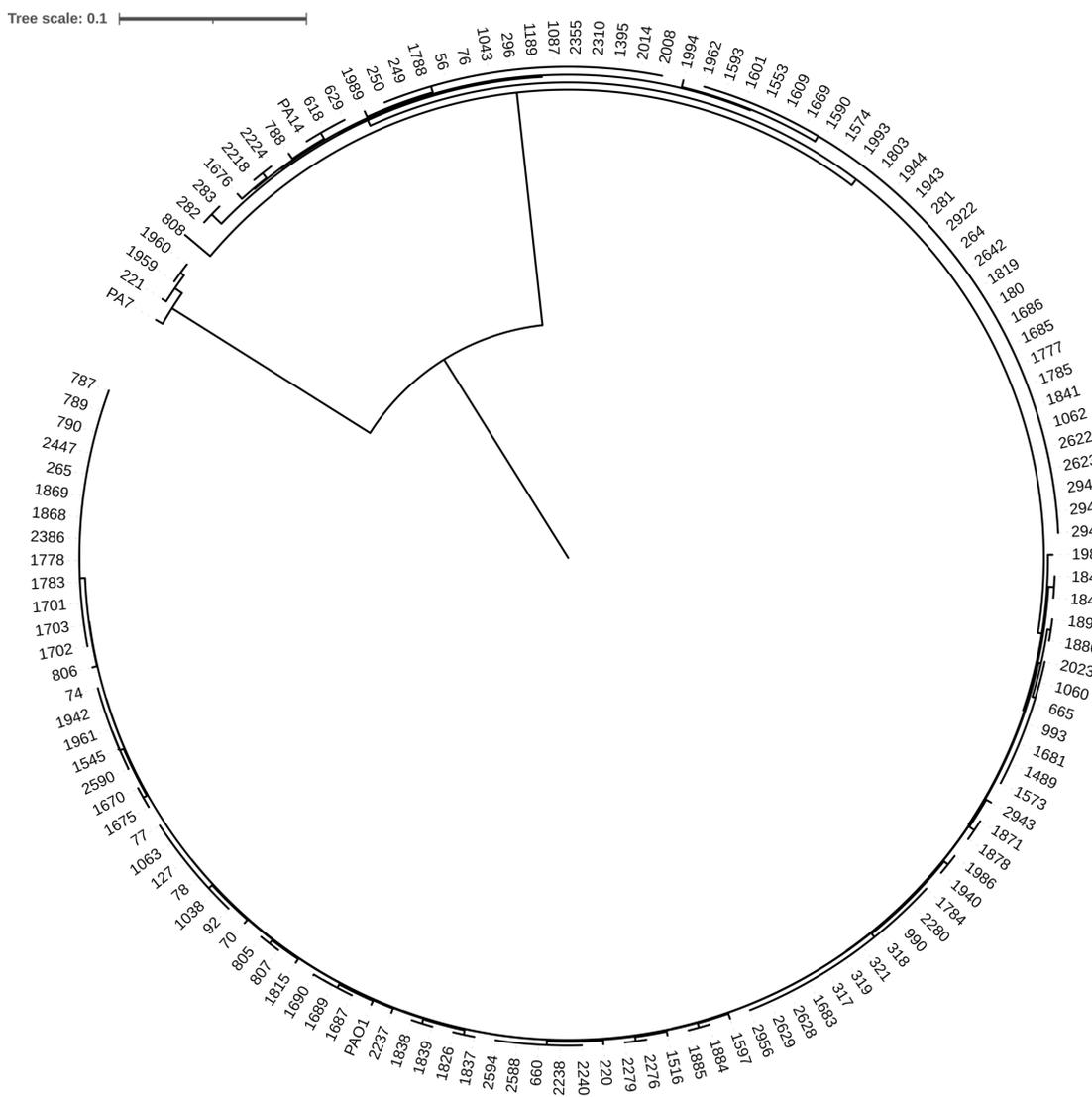


Figura 8. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en el genoma central de las cepas de estudio y las cepas de referencia (PAO1, PA14 y PA7).

El árbol no enraizado permitió visualizar la distribución filogenética de las cepas analizadas. Destaca la distancia evolutiva de la cepa PA7 con respecto a las demás (Figura 9A). Al representar el árbol sin considerar la longitud de las ramas (Figura 9B), se observa la formación de tres grupos filogenéticos, los cuales corresponden a los linajes típicos de *P. aeruginosa* representados por las cepas de referencia PAO1, PA14 y PA7. Además, se identificó una cepa atípica ubicada entre los grupos PA14 y PA7, que no se alinea con ninguno de los tres clados principales. El filogrupo PAO1 mostró el mayor número de cepas ($n = 79$), seguido por PA14 ($n = 53$), mientras que PA7 presentó el menor número de cepas ($n = 3$).

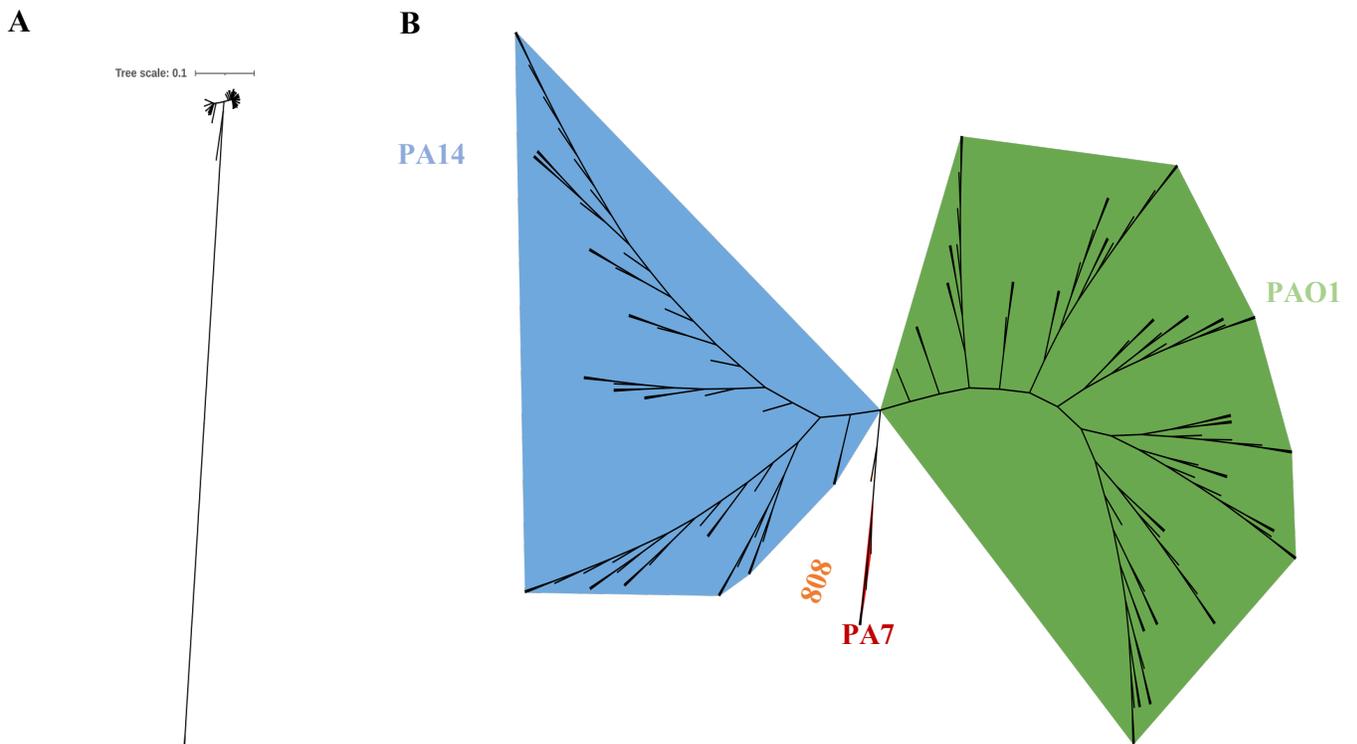


Figura 9. Árbol filogenético no enraizado construido a partir del genoma central de 136 cepas de estudio. **A.** Árbol con escala que muestra la distancia evolutiva de la cepa PA7 respecto a las demás. **B.** Representación sin escala para facilitar la visualización de los agrupamientos. Se observan tres grupos filogenéticos principales alineados con las cepas de referencia PAO1 (verde), PA14 (azul) y PA7 (rojo).

Al relacionar las ST con la ubicación de las cepas en el árbol filogenético basado en el genoma central (Figura 10), se observó que las ST más frecuentes, como la ST309 y la ST235, se agrupan dentro del filogrupo PA14. En contraste, las ST111 y ST2731 fueron las más representativas en el filogrupo PAO1. En el filogrupo PA7 se observa una mayor diversidad de ST, incluyendo dos posibles nuevas secuencias tipo, así como las ST2130 y ST73560.

En cuanto a la distribución por centro hospitalario, las ST se encuentran dispersas entre los distintos hospitales, sin que se observe una asociación entre un tipo de secuencia específico y un hospital determinado, con excepción de algunas cepas como la ST1662, que provienen del mismo centro.

De manera similar, no se evidenció una asociación clara entre los tipos de muestra y las ST, y se observándose una distribución heterogénea de los tipos de secuencia entre las distintas muestras de origen.

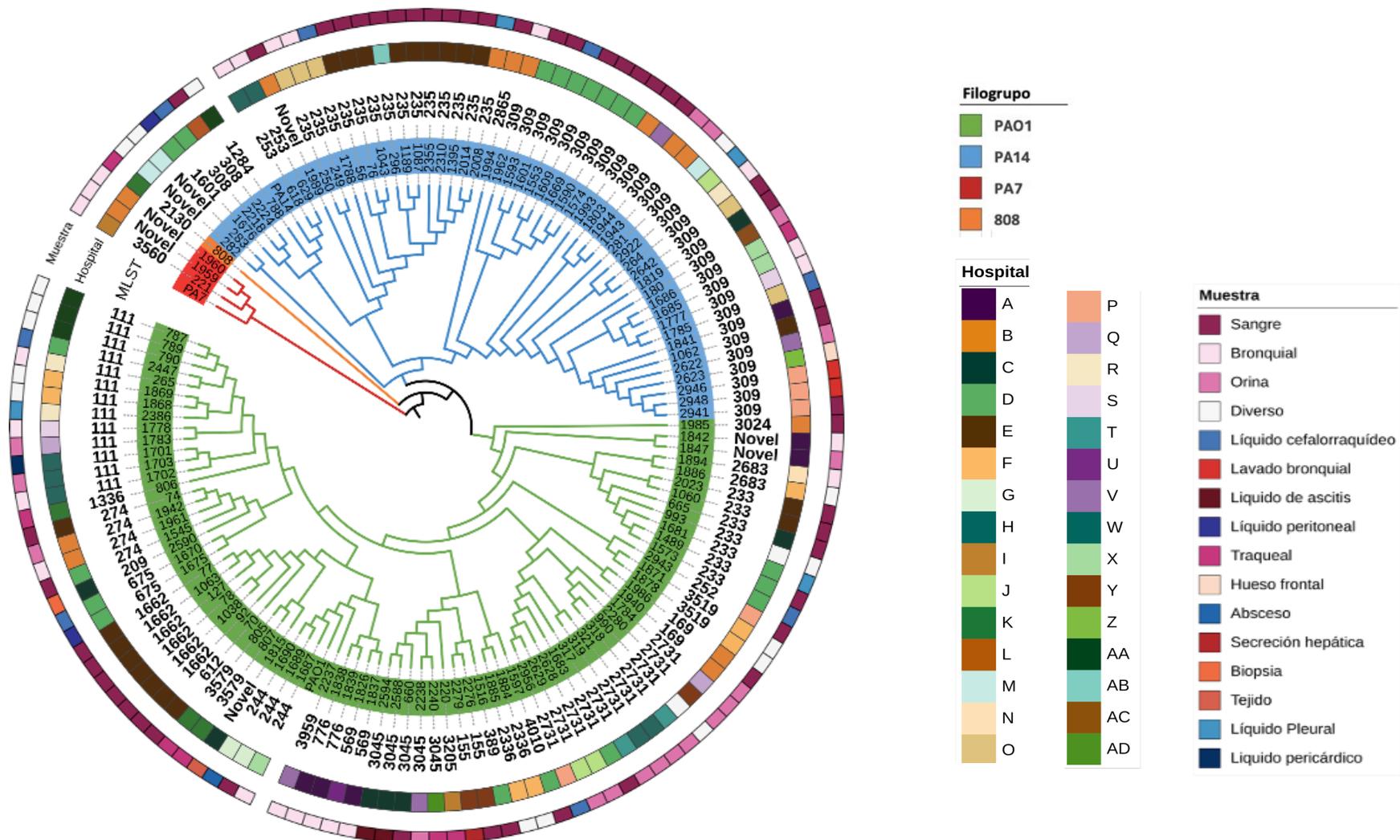


Figura 10. Cladograma de la filogenia del genoma central de las cepas de estudio anotado con el tipo de secuencia (ST), el centro hospitalario de origen y el tipo de muestra.

7.3.3 Filogenia basada en variantes

En el árbol de máxima verosimilitud basado en variantes (Figura 11A) conserva la definición de los tres filogrupos previamente identificados (PAO1, PA14 y PA7), en concordancia con el árbol obtenido a partir del genoma central. El análisis del número total de variantes muestra una acumulación comparable de mutaciones entre cepas pertenecientes a un mismo filogrupo. El filogrupo PA7 presenta la mayor carga mutacional respecto a PAO1 y PA14.

En cuanto al tipo de variantes (Figura 11B), las sustituciones de un solo nucleótido (SNV) constituyen el tipo más frecuente en los tres filogrupos. Sin embargo, las mutaciones estructurales complejas, como reordenamientos genómicos, son más frecuentes en el filogrupo PA7, lo que indica un mayor grado de diversidad genética en este linaje. El número y tipo de mutaciones identificadas por cada cepa se detallan en el Anexo 4.

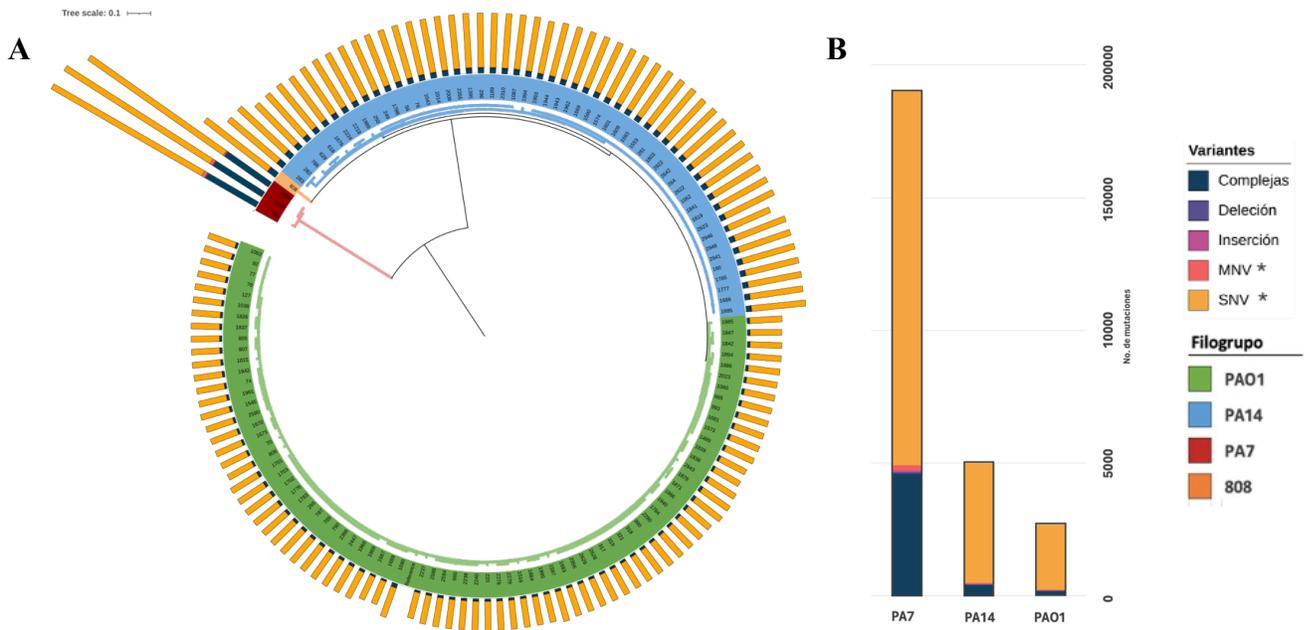


Figura 11. Filogenia basada en variantes. **A.** Árbol de máxima verosimilitud construido a partir de las variantes genómicas de las cepas de estudio. Se observan los tres clados principales correspondientes a los filogrupos PAO1 (verde), PA14 (azul) y PA7 (rojo). **B.** Distribución promedio del tipo de variantes por filogrupo.

7.3.4 Resistoma

El análisis del resistoma (Figura 12) reveló que las cepas pertenecientes a los filogrupos PAO1 y PA14 contienen al menos una copia de genes asociados a la inactivación de aminoglucósidos, entre ellos *aac*, *aad* y *aph*. Se identificó la presencia de *catB* y *fosA*, genes relacionados con la resistencia a fenicoles y fosfomicina, respectivamente. También se detectó la presencia de genes de tipo *dfr* en un conjunto de cepas, asociados con resistencia a trimetoprim. En contraste, las cepas del filogrupo PA7 no presentaron este tipo de genes, con excepción del gen *crpP*, asociado a la resistencia a fluoroquinolonas, el cual también fue identificado en algunas cepas de los filogrupos PAO1 y PA14.

También se identificaron genes que codifican enzimas con actividad β -lactamasa. Todos los genomas analizados contienen al menos una copia de genes del tipo *bla_{PDC}*, los cuales codifican una β -lactamasa de clase C asociada con resistencia a cefalosporinas. Además, en las cepas pertenecientes a los filogrupos PAO1 y PA14 presentan genes de tipo *bla_{OXA}*, aunque ninguno de ellos corresponde a variantes con actividad carbapenemasa conocida.

Se observó una distribución filogenética diferenciada de los genes de resistencia; los genes *bla_{GES}* se concentraron en las cepas del filogrupo PA14, mientras que los genes *bla_{VIM}* fueron más frecuentes en cepas del filogrupo PAO1. Por su parte, los genes *bla_{IMP}* se encontraron dispersos en ambos filogrupos. En contraste, las cepas del filogrupo PA7 no presentan genes que codifiquen β -lactamasas adquiridas, lo que sugiere un perfil genético distinto respecto a los otros dos filogrupos.

El análisis de coordenadas principales (PCoA), basado en la presencia/ausencia de genes de resistencia adquirida, permitió evaluar la correlación entre el resistoma y la estructura filogenética de las cepas de *P. aeruginosa*. En la Figura 13, se observa que los dos primeros componentes principales explican el 16.88 % (PC1) y el 11.01 % (PC2) de la variabilidad total.

Las cepas pertenecientes al filogrupo PA14 muestran una mayor dispersión y en su mayoría se agrupan hacia la parte derecha del gráfico. Por el contrario, las cepas del filogrupo PAO1 se agrupan de forma más compacta, y ocupan la parte izquierda. El filogrupo PA7 se sitúa en una región intermedia del gráfico, con baja dispersión, lo que indica menor variabilidad interna.

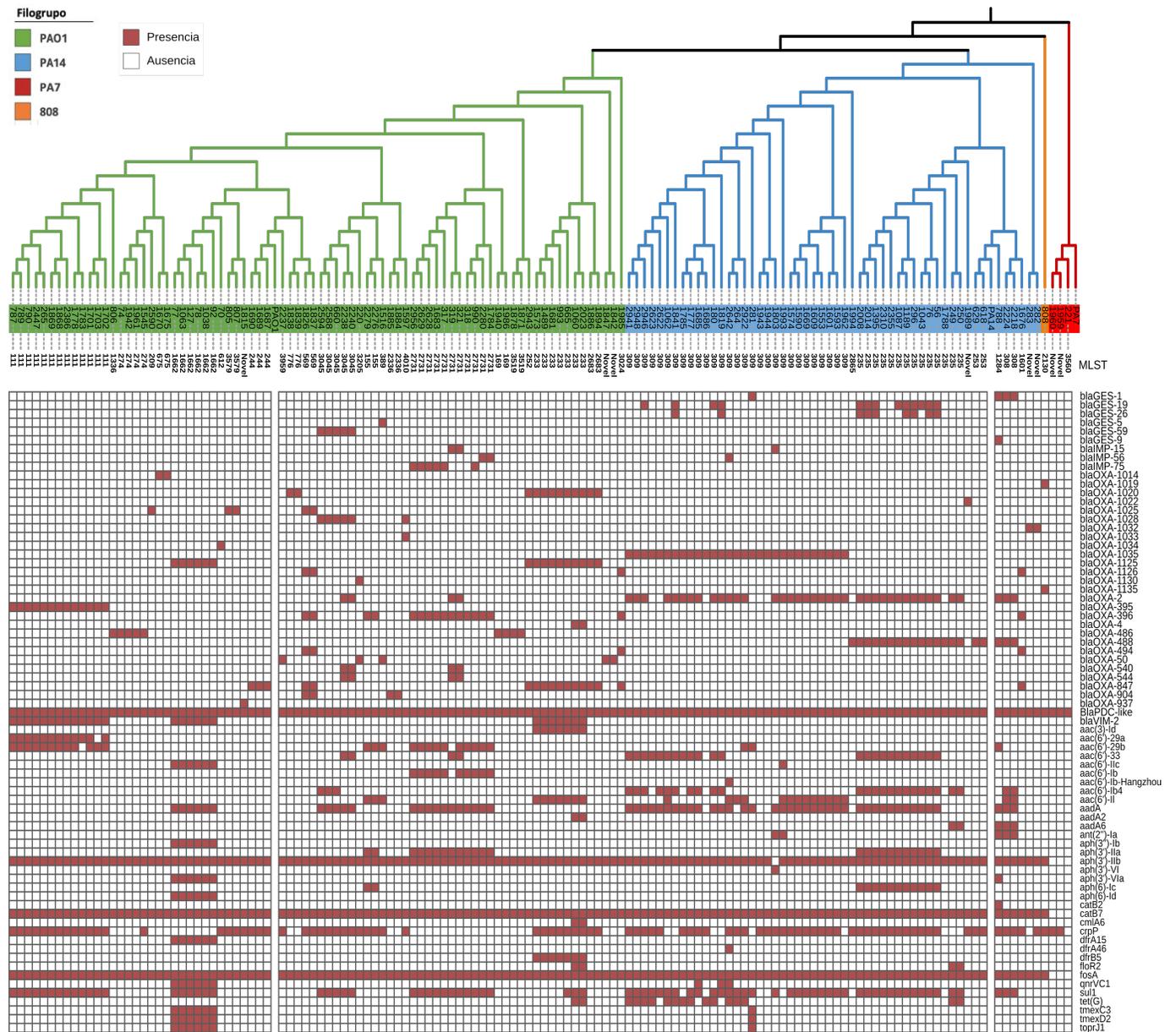


Figura 12. Matriz de presencia/ausencia de genes de resistencia adquirida identificados en las cepas de estudio, agrupadas según su filogrupo. Se muestran únicamente genes con al menos una copia presente en alguna de las cepas analizadas

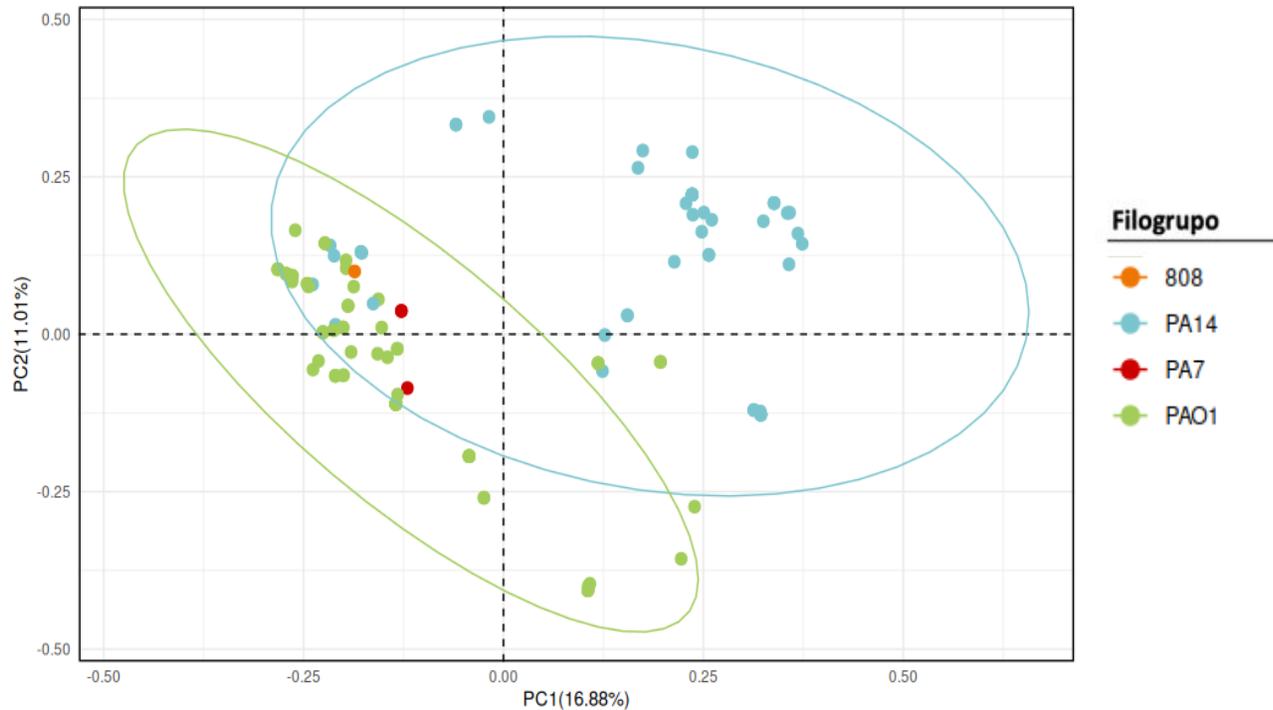


Figura 13. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de genes de resistencia adquirida de las cepas de *P. aeruginosa*. El análisis se basa en una matriz binaria de presencia/ausencia de genes y los puntos se colorean según el filogrupo filogenético (PAO1, PA14 y PA7). Los componentes PC1 y PC2 explican el 16.88 % y el 11.01 % de la variabilidad, respectivamente.

7.3.5 Análisis de mutaciones en *oprD*

El 62 % de las cepas analizadas no presentaron genes que codifican para carbapenemasas. Con el fin de elucidar el posible mecanismo de resistencia en este grupo de cepas con fenotipo resistente, se llevó a cabo un análisis de mutaciones en el gen *oprD*.

El cladograma generado a partir de las secuencias de *oprD* reveló que el agrupamiento de las cepas reproduce la estructura filogenética previamente definida en los análisis previos (Figura 14).

El análisis de mutaciones en el gen *oprD* reveló que ninguna de las cepas posee la secuencia silvestre, dado que todas presentan al menos una mutación de cambio de sentido. Además, el 75 % de las cepas exhiben mutaciones que potencialmente inactivan la función de OprD, incluyendo inserciones, mutaciones sin sentido y desplazamientos del marco de lectura. Es importante destacar que las inserciones de transposones y secuencias de fago en *oprD* fueron exclusivas del filogrupo PAO1.

Al comparar estos hallazgos con el perfil fenotípico de susceptibilidad, se observó que las cepas susceptibles a ambos carbapenémicos no presentan ni genes de carbapenemasas ni mutaciones potencialmente disruptivas en *oprD*. En contraste, mientras que las cepas resistentes a ambos carbapenémicos exhiben al menos uno de estos dos mecanismos, o ambos en conjunto.

El análisis de correlación entre los mecanismos de resistencia y los valores de CMI reveló un patrón consistente entre genotipo y fenotipo (Figura 15). En el umbral de susceptibilidad para imipenem y meropenem, se observa la ausencia de genes de carbapenemasas y la presencia de mutaciones de cambio de sentido en *oprD*.

A medida que aumentan los valores de CMI, se empiezan a identificar mutaciones en *oprD* que potencialmente inactivan la función de OprD, como mutaciones sin sentido y desplazamientos del marco de lectura, las cuales se asociaron con fenotipos de susceptibilidad intermedia o resistencia baja.

Los valores más altos de CMI ($\geq 16 \mu\text{g/mL}$ para ambos antibióticos) se correlacionaron con la presencia simultánea de mutaciones en *oprD* potencialmente inactivantes y genes codificantes para carbapenemasas.

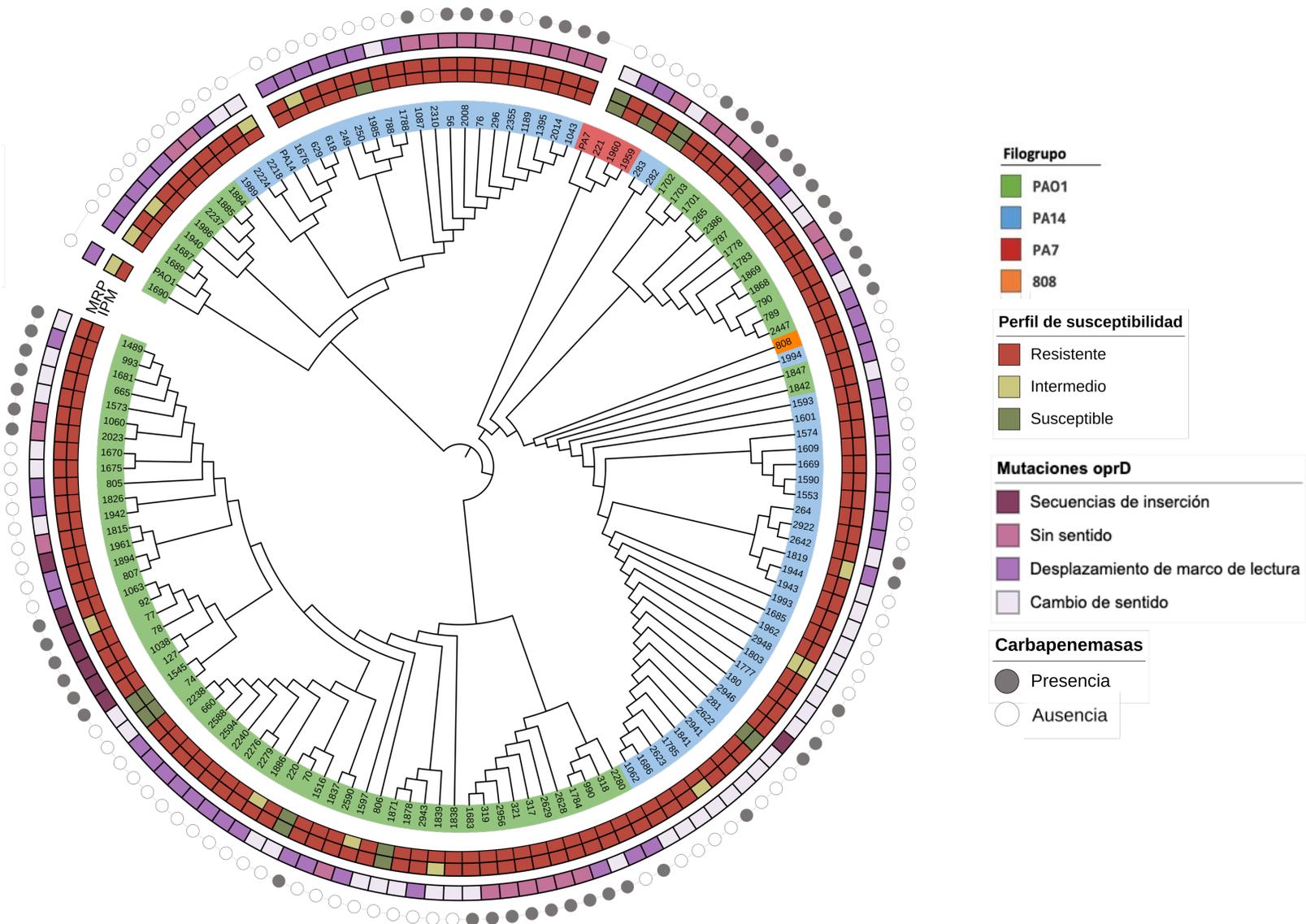


Figura 14. Cladograma de las secuencias de *oprD* de las cepas de estudio y las cepas de referencia (PAO1, PA14 y PA7).

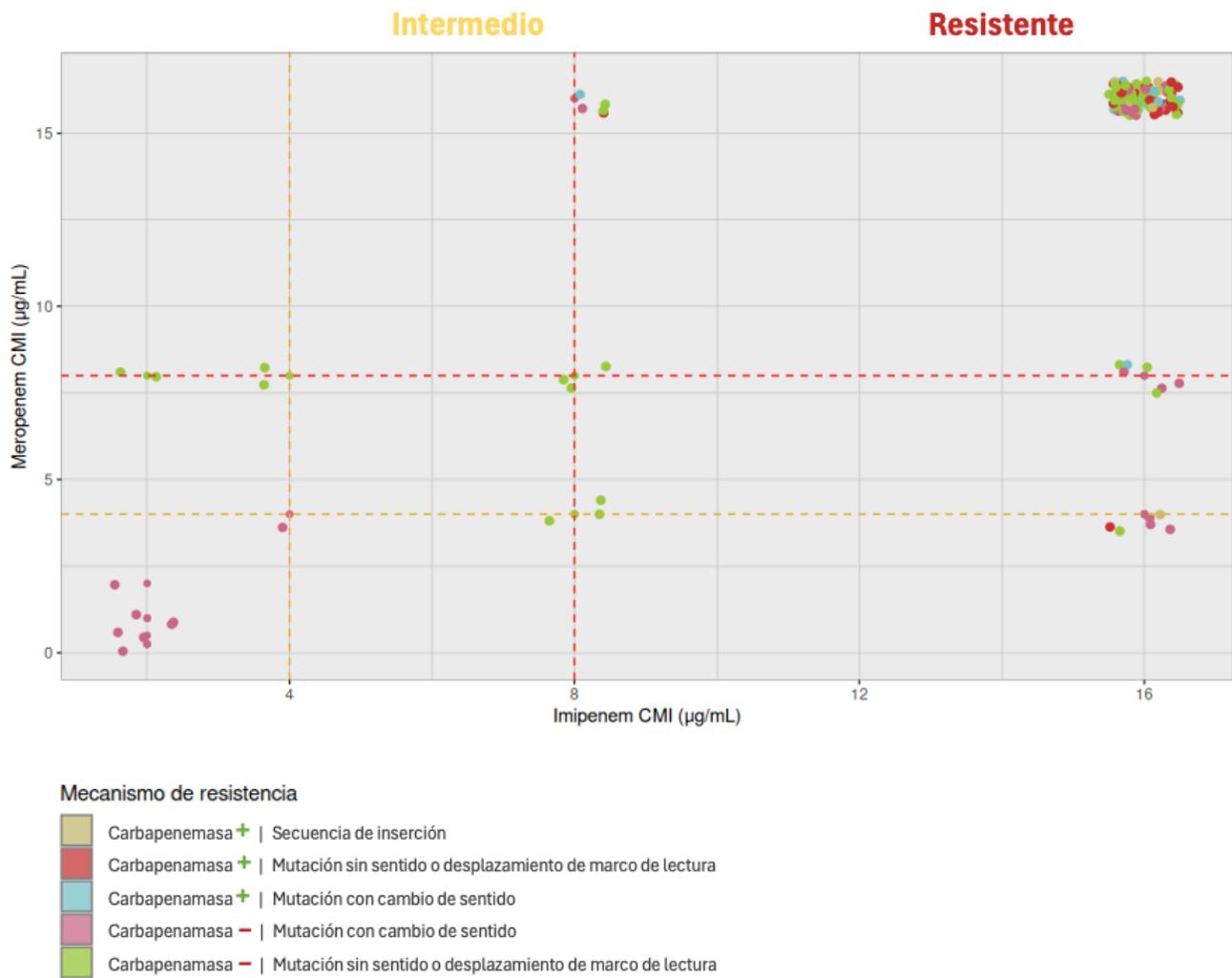


Figura 15. Correlación entre los mecanismos genéticos de resistencia y los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) para imipenem y meropenem en las cepas de estudio.

7.3.6 Docking molecular

Para profundizar en los posibles mecanismos de resistencia en cepas de *P. aeruginosa* que no portaban genes codificantes de carbapenemasas ni presentaban pérdida de OprD, pero que aun así mostraban un fenotipo resistente a carbapenémicos, se realizaron análisis de docking molecular y así evaluar si las variaciones en la proteína OprD podrían alterar la afinidad del canal por carbapenémicos, sugiriendo un posible efecto funcional no detectado únicamente por la presencia o ausencia de transcripción.

Se seleccionaron cepas representativas que presentan un perfil resistente a carbapenémicos, ausencia de genes que codifican carbapenemasas y una secuencia completa de la proteína OprD. Las distribución de las cepas seleccionada se muestra en la Tabla 8.

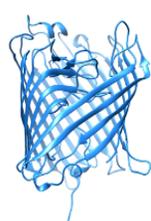
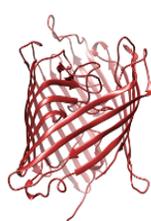
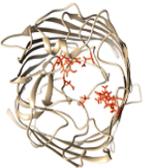
El modelado de las proteínas OprD mostró valores de pTMscore superiores a 0.88 en todas las estructuras generadas, lo que indica una alta confianza en la precisión de los modelos en relación con las estructuras nativas. En la Tabla 9 se presentan las estructuras tridimensionales predichas de las proteínas OprD correspondientes a las cepas seleccionadas del estudio, así como la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1, utilizada como control.

Tabla 8. *Cepas seleccionadas para el análisis de docking molecular*

Cepa	Filogrupo	Imipenem	Meropenem	Carbapenemasa	OprD
221	PA7	S	S	Ausencia	Completa
318	PAO1	R	R	Ausencia	Completa
788	PA14	R	R	Ausencia	Completa
808	-	R	R	Ausencia	Completa

S: susceptible; R: resistente.

Tabla 9. Estructuras tridimensionales modeladas de la proteína OprD en cepas seleccionadas de *P. aeruginosa*

Cepa	PAO1	788	808	318	221
Filogrupo	PAO1	PA14	-	PAO1	PA7
pTMScore	0.91	0.88	0.91	0.91	0.88
Mutaciones	Sin mutaciones (wild-type)	Cambio de sentido	Desplazamiento de marco de lectura	Desplazamiento de marco de lectura	Cambio de sentido
Estructuras					
					

Los resultados del análisis de docking molecular (Figura 16) indican una alta afinidad de imipenem y meropenem por la proteína OprD de la cepa de referencia PAO1, con energías de unión de -7.5 y -9.0 kcal/mol, respectivamente. En el caso de la cepa 318, se observaron energías de unión de -7.0 kcal/mol (imipenem) y -8.5 kcal/mol (meropenem), a pesar de presentar mutaciones potencialmente inactivantes en la secuencia de oprD. Energías de afinidad similares se registraron para el resto de las cepas analizadas. Por otro lado, las simulaciones de docking molecular entre la arginina y las proteínas OprD modeladas mostró energías de unión cercanas a -6.0 kcal/mol en todas las cepas seleccionadas, incluida la cepa de referencia PAO1.

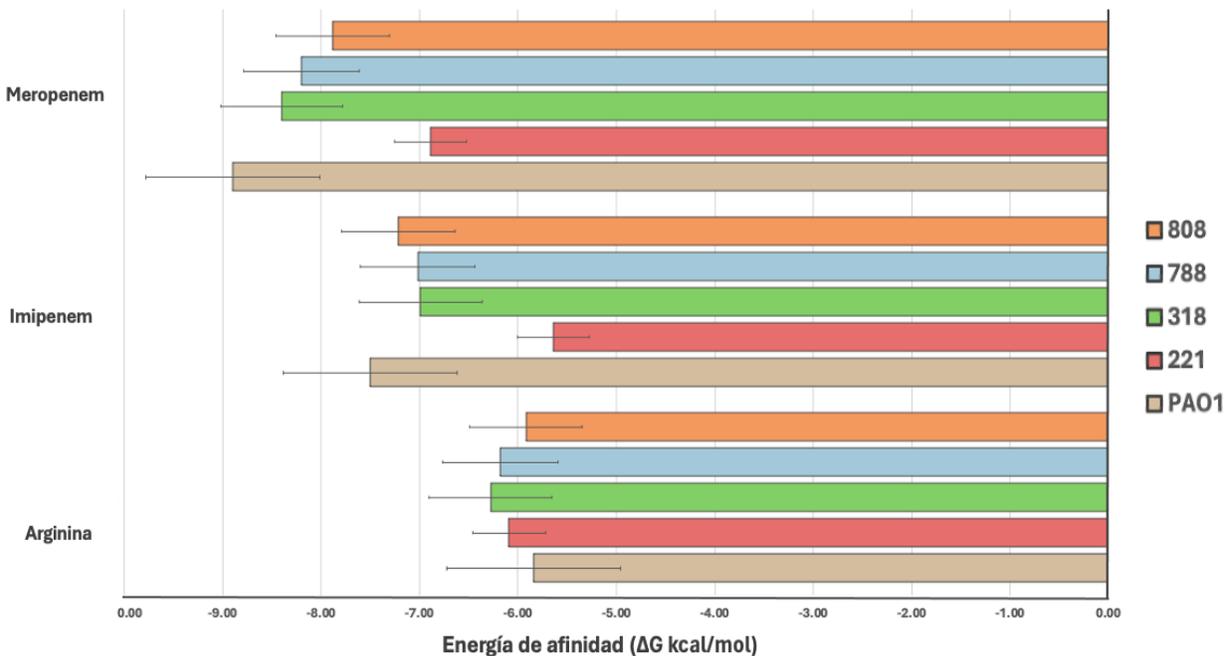


Figura 16. Energías de acoplamiento molecular (kcal/mol) entre las proteínas OprD modeladas y los antibióticos imipenem y meropenem en cepas seleccionadas de *P. aeruginosa*. Una afinidad similar fue observada para arginina en todas las cepas seleccionadas lo que valida el enfoque de docking utilizado, dado que la arginina es un sustrato fisiológico conocido de OprD.

Dado que OprD presenta una afinidad específica por imipenem, se realizó un análisis detallado de las interacciones entre los residuos de la proteína con este antibiótico. En la cepa de referencia PAO1, el imipenem interactúa a nivel estructural con los residuos del “bolsillo de unión” y la “escalera básica” de argininas (Figura 17A), mientras que en la cepa 318 con mutaciones potencialmente inactivantes se conserva esta interacción con esta zona de reconocimiento (Figura 17B). El imipenem interactúa a través de puentes de hidrógeno con los residuos del bolsillo de unión y la escalera básica de OprD de PAO1, lo que sugiere que estas interacciones estabilizan la unión (Figura 17C). En la cepa 318 con OprD mutante la interacción se da por interacciones hidrofóbicas con el bolsillo de unión, sin embargo, hay interacciones hidrofóbicas con la escalera básica debido a la diferencia de posiciones de algunos residuos (Figura 17D).

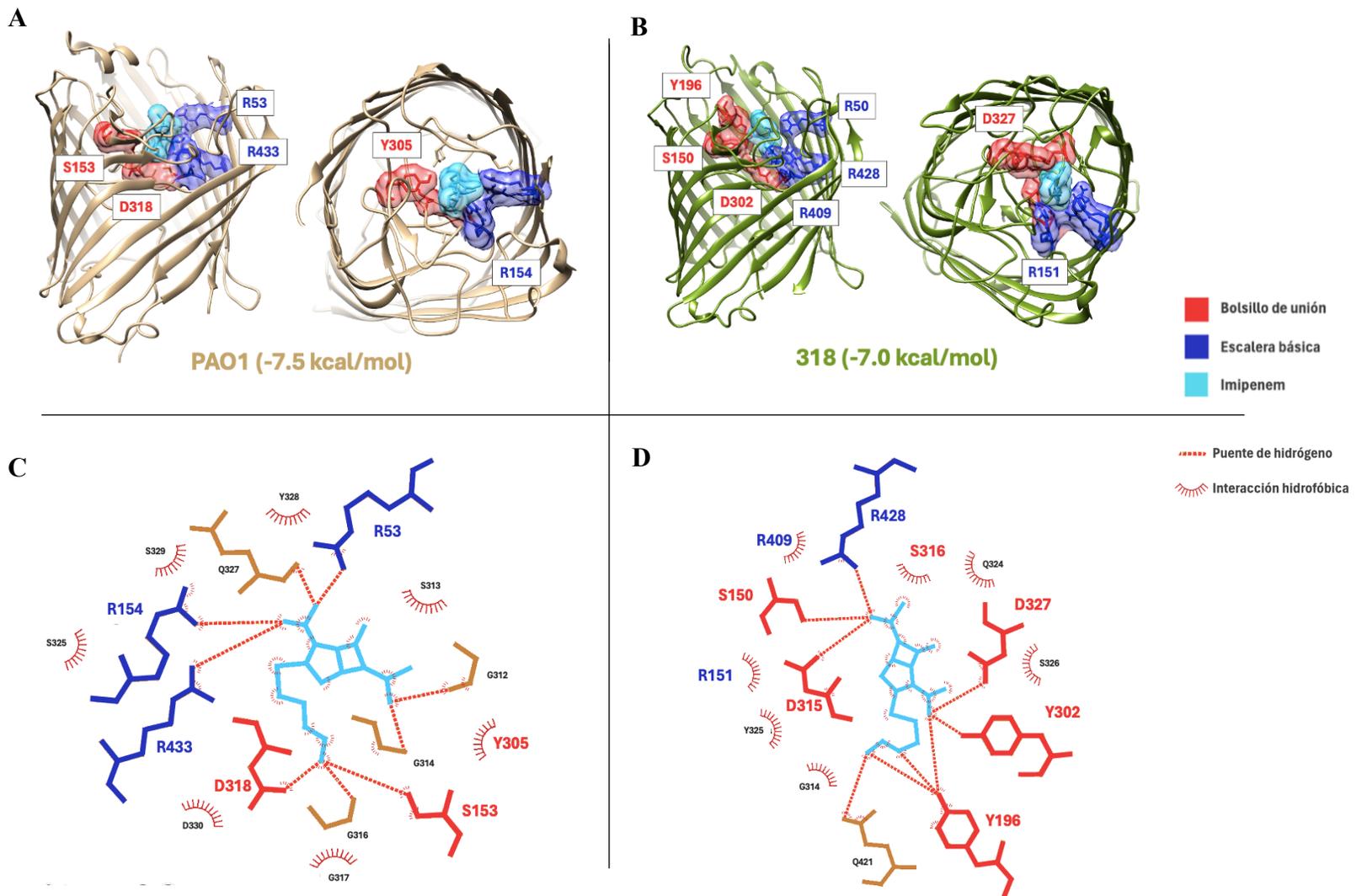


Figura 17. Interacciones de imipenem con OprD. **A.** Interacción de imipenem con la zona de reconocimiento de OprD PAO1. **B.** Interacción de imipenem con la zona de reconocimiento de OprD 318. **C.** Tipos de interacciones de imipenem con los residuos de la zona de reconocimiento de OprD PAO1. **D.** Tipos de interacciones de imipenem con los residuos de la zona de reconocimiento de OprD 318.

7.3.7 Presencia de genes de bombas de eflujo

La presencia de bombas de eflujo pertenecientes al grupo RND se conservó en todas las cepas de estudio, excepto en tres cepas del filogrupo PAO1, donde no se detectaron genes para MexEF-OprJ y MexXY (Figura 18).

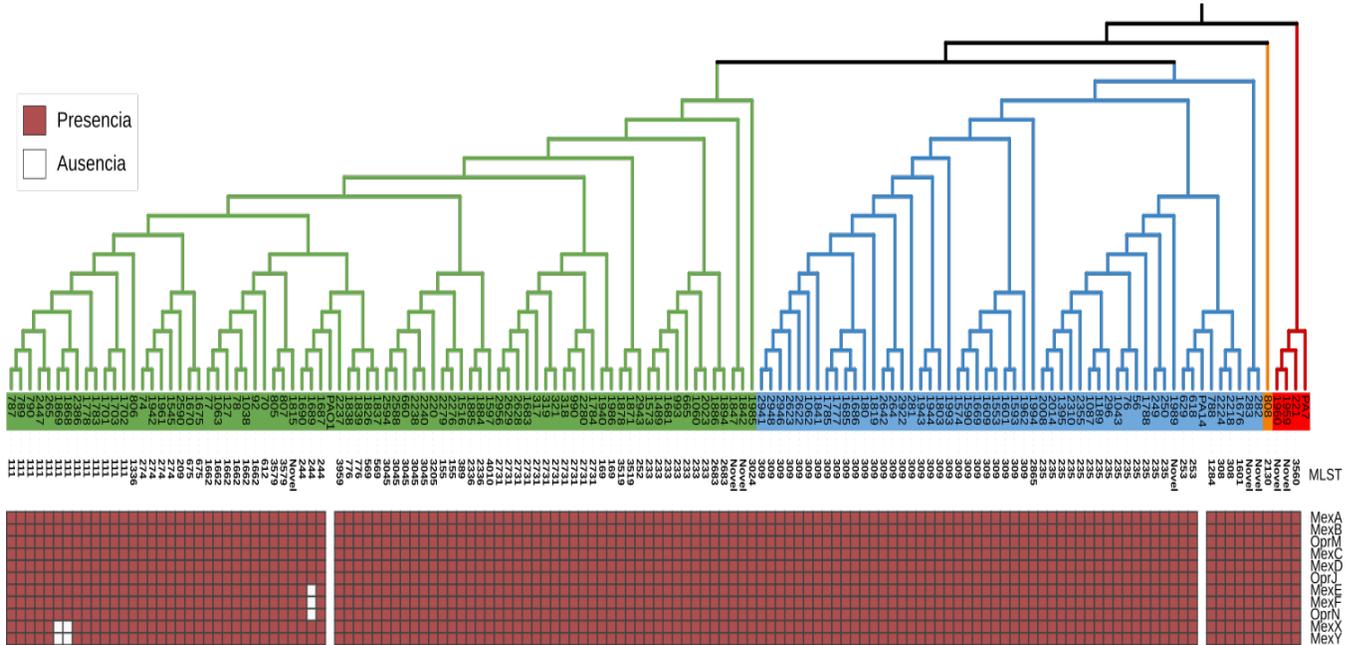


Figura 18. Presencia de bombas de eflujo del grupo RND en las cepas de estudio.

7.4 Selección de cepas

La Tabla 10 presenta la distribución de cepas seleccionadas conforme a los criterios previamente definidos para el cumplimiento de los objetivos 4 y 5 del presente estudio.

Tabla 11. *Cepas seleccionadas para los análisis de cinética de crecimiento y expresión génica.*

Cepa	Filogrupo	ST	IPM	MRP	Carbapenemasa	OprD	Bombas de eflujo
70	PAO1	612	S	S	×	Completa	✓
74	PAO1	274	S	S	×	Completa	✓
92	PAO1	1662	R	I	✓	Completa	✓
221	PA7	3560	S	S	×	Completa	✓
281	PA14	309	S	S	×	Completa	✓
318	PAO1	2731	R	R	✓	Completa	✓
787	PA14	111	R	R	✓	Parcial	✓
990	PAO1	2731	R	R	✓	Completa	✓
1778	PAO1	111	R	R	×	Completa	✓
1841	PA14	309	R	R	✓	Parcial	✓
1871	PAO1	3519	S	S	×	Completa	✓
1878	PAO1	3519	R	R	×	Completa	✓
1940	PAO1	169	R	I	×	Parcial	✓
1942	PAO1	274	R	R	×	Completa	✓
1959	PA7	Novel	S	R	×	Parcial	✓
1962	PA14	309	R	R	×	Completa	✓
2218	PA14	308	R	I	×	Parcial	✓
2948	PA14	309	I	I	×	Parcial	✓

ST: secuencia tipo; IPM: imipenem; MRP: meropenem; S: susceptible; R: resistente; I: intermedio; ✓: presencia; ×: ausencia.

Objetivo 4

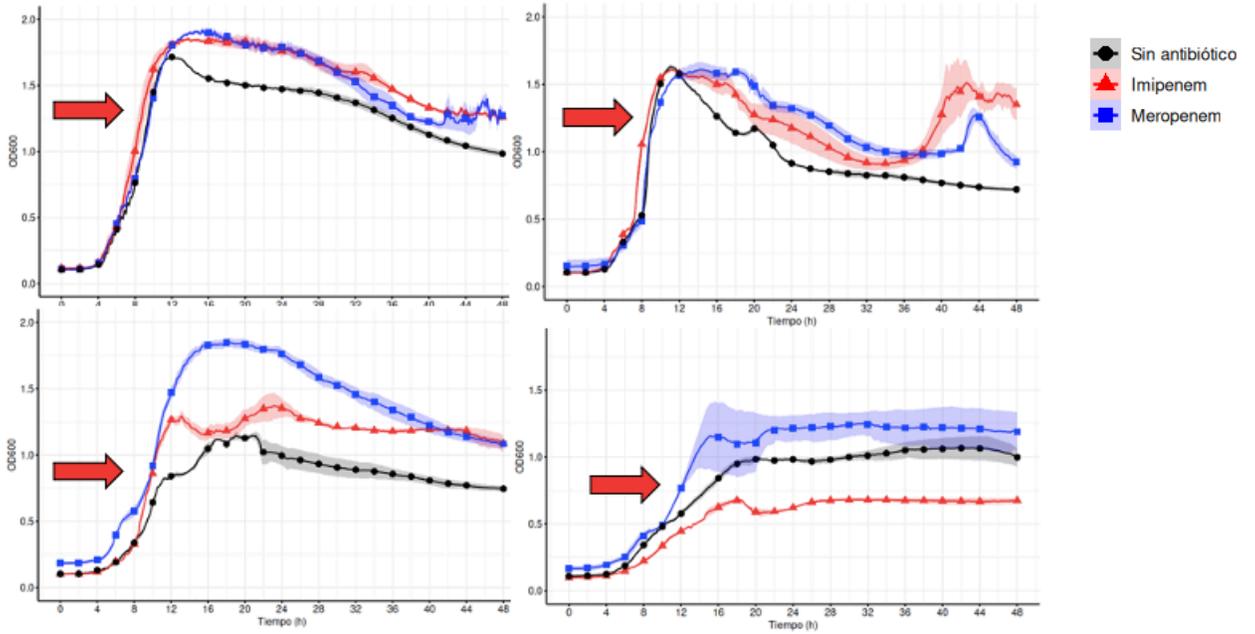
7.5 Cinética de crecimiento

El análisis de las curvas de crecimiento bacteriano bajo tres condiciones experimentales —sin antibiótico, en presencia de imipenem y en presencia de meropenem— evidenció diferencias fenotípicas asociadas a la presencia de genes que codifican para carbapenemasas (Figura 19A). Las cepas portadoras de estos genes presentaron una fase lag más corta que las cepas que no poseen genes que codifican carbapenemasas (Figura 19B). Con base en estos perfiles de crecimiento, y tal como se indica mediante flechas en las curvas, se definió el punto de muestreo para la extracción de ARN durante la fase exponencial de crecimiento, el cual fue ajustado individualmente para cada cepa y condición de tratamiento. Las curvas de crecimiento correspondientes a cada cepa bajo las tres condiciones (sin antibiótico, con imipenem y con meropenem), así como los tiempos específicos de extracción de ARN se encuentran en el Anexo 5.

La mayoría de las cepas mostraron tasas de crecimiento más altas en ausencia de carbapenémicos, especialmente aquellas que no portan genes que codifican carbapenemasas, lo cual es consistente con su sensibilidad al antibiótico. No obstante, en cepas que sí poseen genes que codifican carbapenemasas, se observó que la tasa de duplicación celular en presencia de imipenem o meropenem fue comparable, e incluso superior a la observada en medios sin antibióticos (Figura 20). Los valores de tasa de crecimiento de cada cepa en las tres condiciones (sin antibiótico, con imipenem y con meropenem) se detallan en el Anexo 6.

Además de la tasa de crecimiento, se evaluó el crecimiento acumulado mediante el cálculo del área bajo la curva (AUC). En general, las cepas mostraron valores de AUC más elevados en condiciones sin antibiótico, lo que refleja un crecimiento óptimo en ausencia de estrés antimicrobiano. No obstante, se observó que las cepas portadoras de genes que codifican carbapenemasas mantvieron, e incluso superaron, sus valores de AUCs en presencia de imipenem o meropenem, en comparación con cepas que no tienen genes que codifican estas enzimas (Figura 21). Los valores individuales del AUC para cada cepa bajo las tres condiciones (sin antibiótico, con imipenem y con meropenem) se detallan en el Anexo 7.

A



B

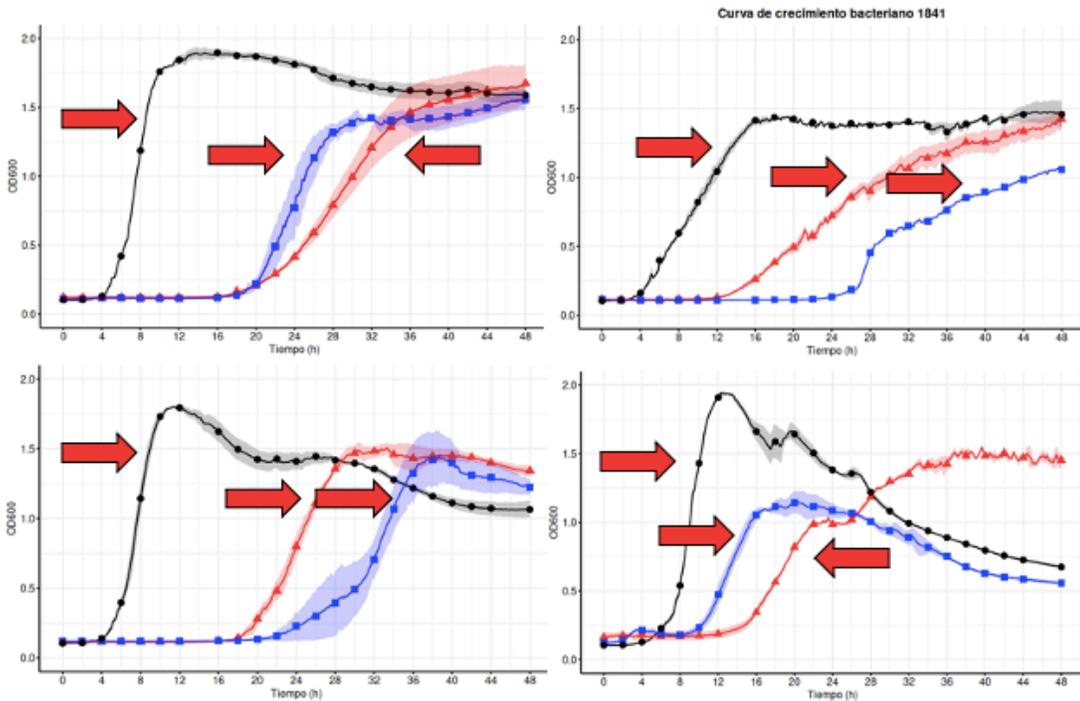


Figura 19. Curvas de crecimiento de cepas seleccionadas en presencia y ausencia de carbapenémicos. Las flechas indican el momento de recolección de ARN durante la fase exponencial. A. Cepas con genes que codifican carbapenemasas. B. Cepas sin genes que codifican carbapenemasas

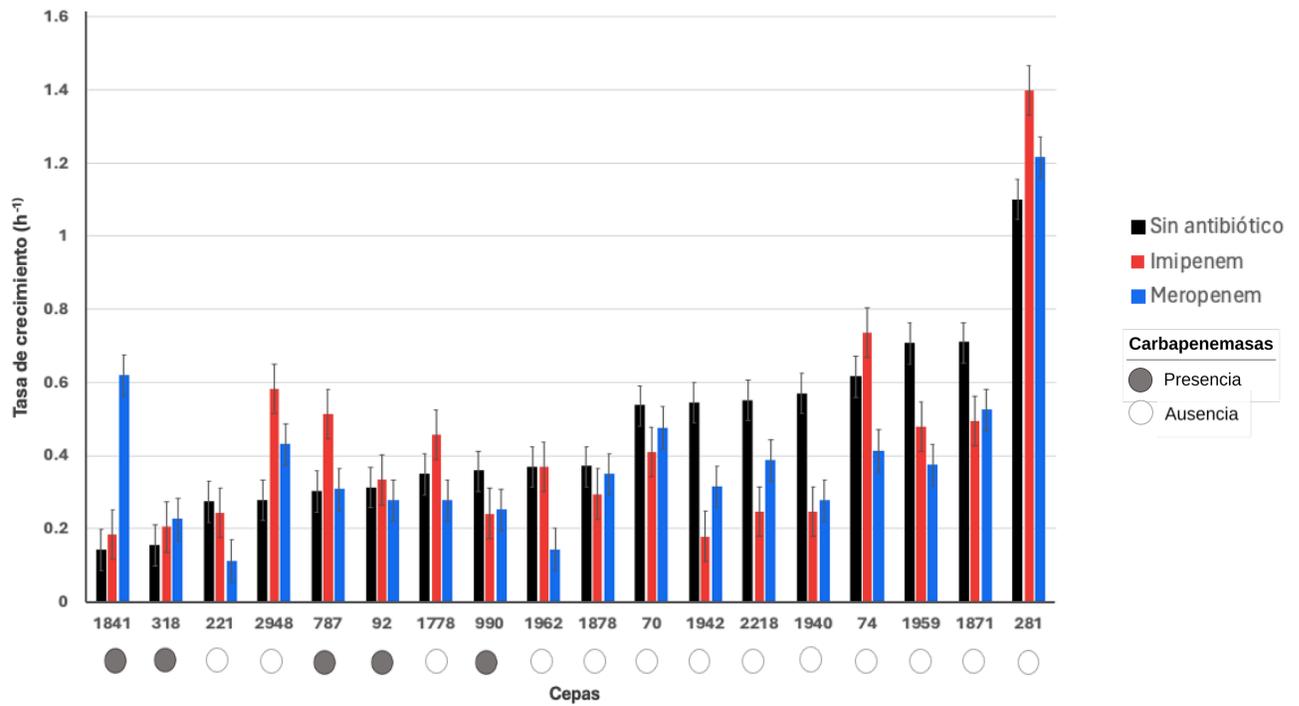


Figura 20. Tasa de crecimiento (h^{-1}) para las cepas seleccionadas en ausencia y presencia de carbapenémico.

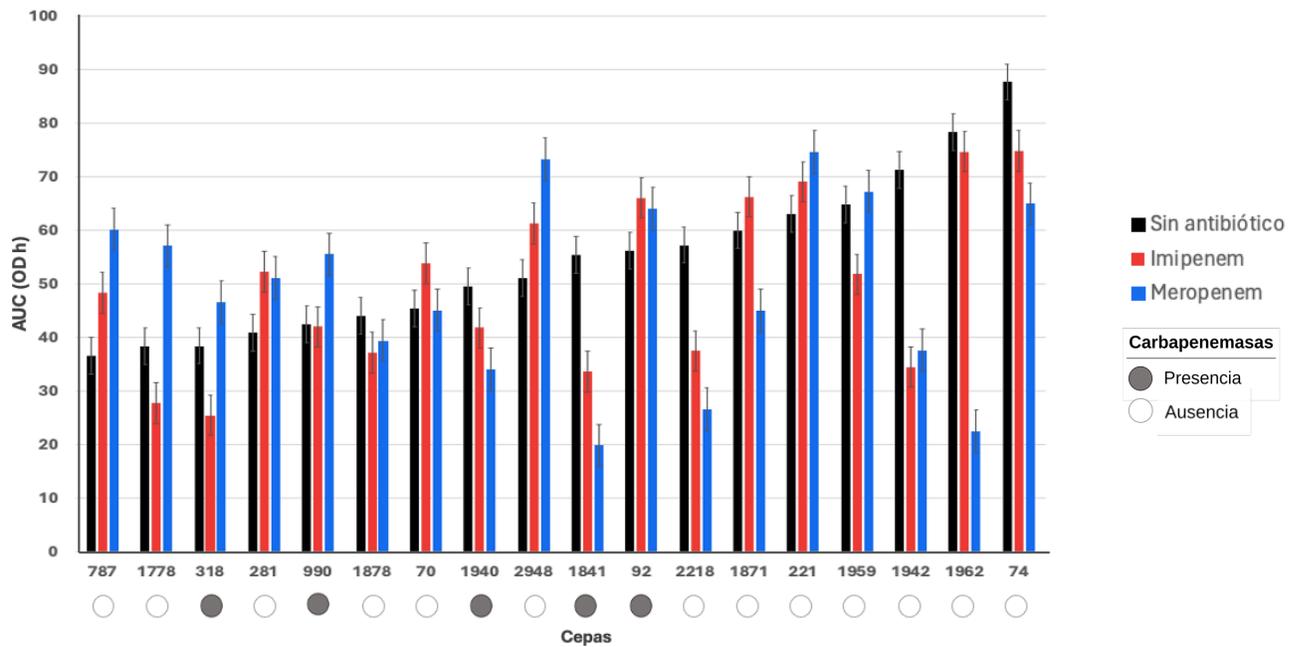


Figura 21. Valores de AUC ($OD \cdot h^{-1}$) que refleja el crecimiento total acumulado para cada cepa seleccionada en ausencia y presencia de carbapenémico.

Objetivo 5

7.6 Análisis de expresión génica

7.6.1 Expresión génica en ausencia de antibiótico

Se construyó un mapa de calor que representa el logaritmo base 2 del fold change ($\log_2\text{FoldChange}$) de la expresión génica de las cepas seleccionadas en comparación con la cepa de referencia PAO1 de *P. aeruginosa*, bajo condiciones sin exposición a antibiótico (Figura 22).

El análisis mostró que el gen *oprD* se encontró subexpresado en el 100 % de las cepas analizadas (18/18). Los genes *mexA* y *mexY* presentaron sobreexpresión en el 38.89 % de las cepas (7/18), mientras que *mexC* mostró sobreexpresión en el 16.67 % (3/18). El gen *mexE* no exhibió sobreexpresión en ninguna de las cepas analizadas. Los valores de $\log_2\text{FoldChange}$ de cada cepa y su interpretación se encuentran en el Anexo 8.

Al asociar el valor de expresión génica con el perfil de susceptibilidad, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos fenotipos (susceptible, intermedio, resistente) ($p > 0.05$) (Figura 23).

La expresión de *mexA* fue mayor en el filogrupo PAO1 (mediana $\log_2\text{FoldChange} = 1.5017$) que en el filogrupo PA14 (mediana $\log_2\text{FoldChange} = -5.8659$) $p = 0.0136$). No se detectaron diferencias significativas en la expresión de *oprD*, *mexC*, *mexE* y *mexY* entre los filogrupos PAO1, PA14 y PA7 ($p > 0.05$) (Figura 24).

Al analizar el tipo de mutaciones en el gen represor *mexR*, del sistema de eflujo MexAB-OprM,, reveló que dichas mutaciones no se distribuyen de manera aleatoria entre los filogrupos de *P. aeruginosa* (PAO1, PA14, PA7) ($p = 0.008551$) ya que tienden a conservarse entre cepas pertenecientes a un mismo linaje. Las cepas del filogrupo PAO1 presentaron una mayor diversidad en el tipo de mutaciones que potencialmente inactivan la función MexR, mientras que todas las cepas del filogrupo PA14 presentaron mutaciones sinónimas (Figura 25).

En el mapa de calor construido a partir de los datos de expresión génica, se observó una tendencia a la agrupación de cepas con tasas de crecimiento elevadas en la parte superior del mapa de calor, mientras que las cepas con crecimiento más lento se agruparon en la parte inferior. Se identificó una correlación estadísticamente significativa entre la expresión del gen *oprD* y la tasa de crecimiento celular ($\rho = +0.48$, $p = 0.045$). En contraste, no se observó una asociación significativa entre los valores del área bajo la curva y los niveles de expresión de *oprD* o genes de bombas de eflujo (*mexA*, *mexC*, *mexE* y *mexY*) ($p > 0.05$).

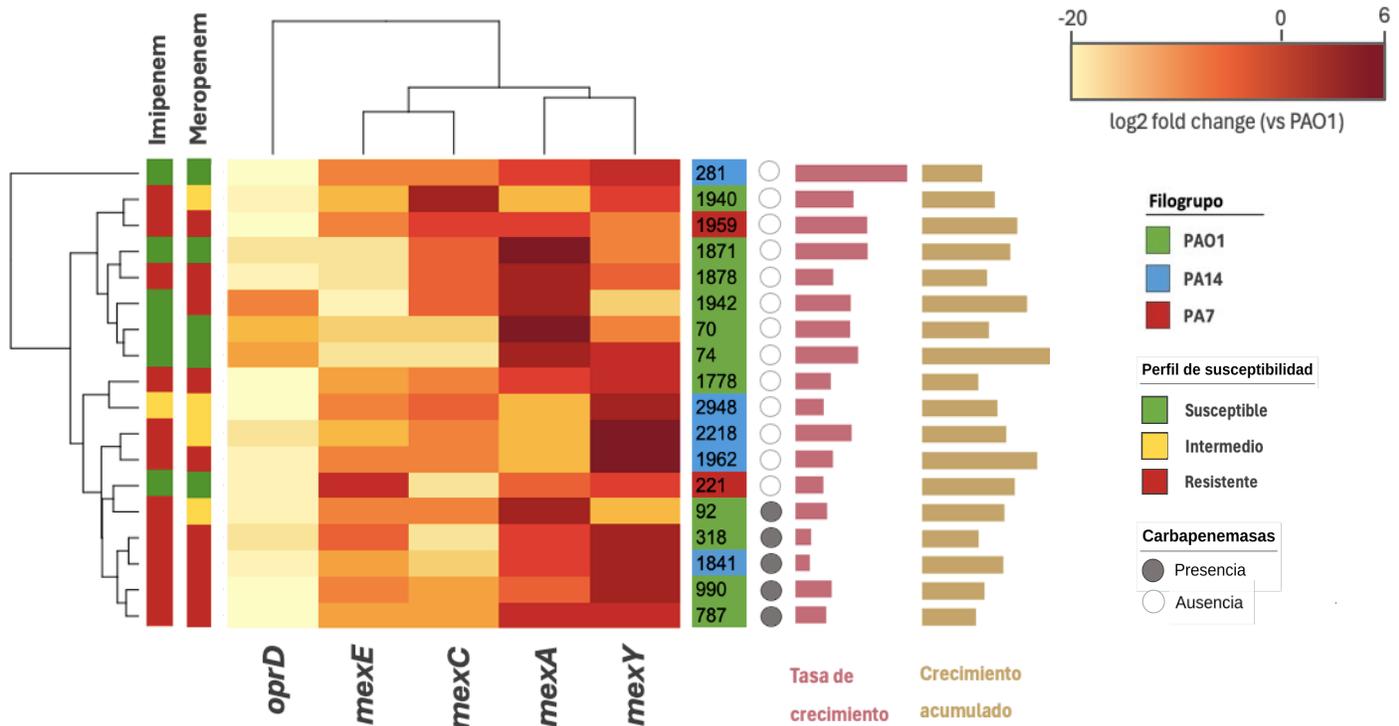


Figura 22. Mapa de calor que muestra el \log_2 FoldChange de la expresión génica relativa a la cepa de referencia PAO1 en condiciones sin antibiótico.

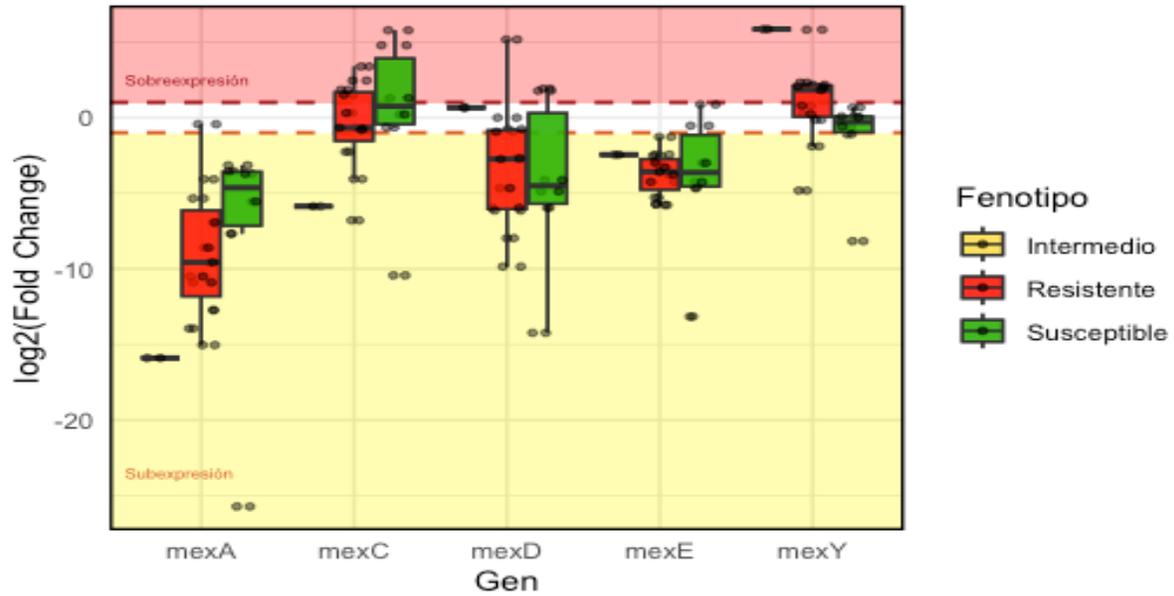


Figura 23. Boxplot del log₂Fold Change por perfil de susceptibilidad para cada gen de estudio. ($p > 0.05$).

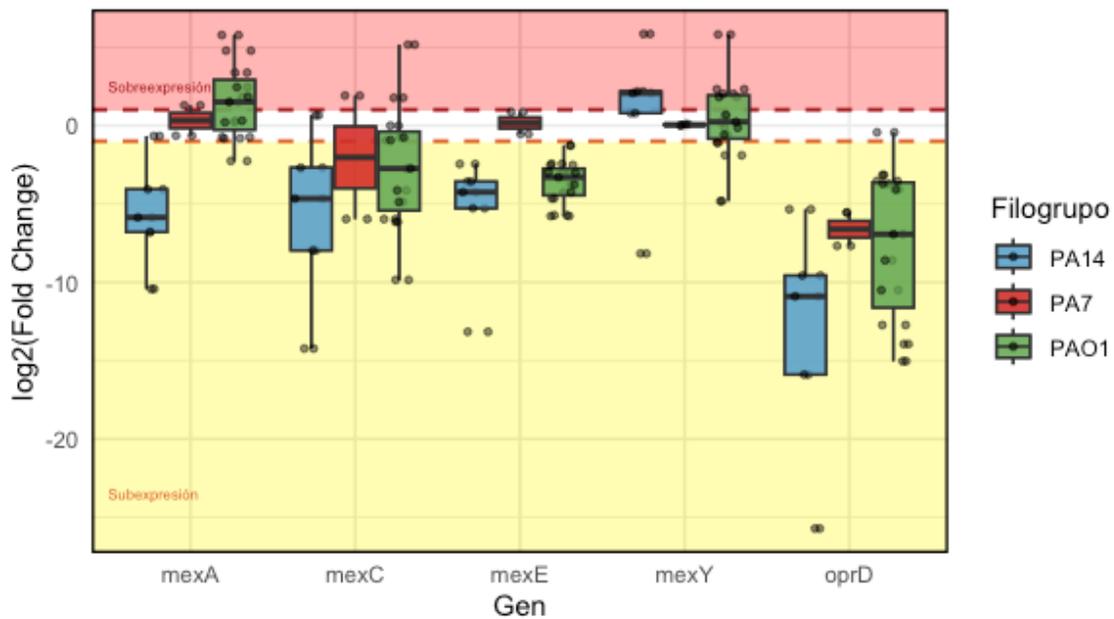


Figura 24. Boxplot del log₂Fold Change por filogruppo para cada gen de estudio. Hay diferencia significativa entre la expresión de *mexA* en el filogruppo PAO1 y PA14 ($p = 0.008551$).

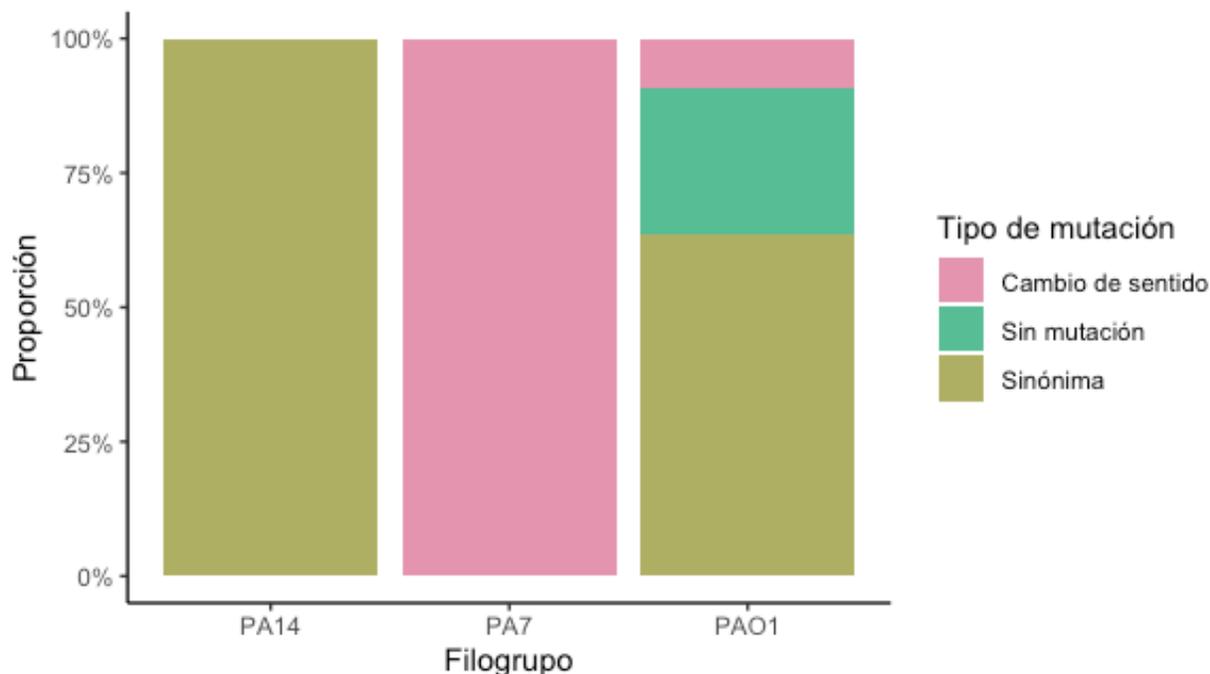


Figura 25. Distribución del tipo de mutación del gen represor *mexR* por filogrupo. El tipo de mutación varía por filogrupo ($p = 0.008551$).

7.6.2 Expresión génica en presencia de imipenem

Se evaluó la expresión génica las cepa seleccionadas frente a imipenem mediante un análisis intracepa, al comparar la expresión génica en presencia y ausencia del antibiótico.

El mapa de calor generado (Figura 26) a partir de los datos de expresión génica revela que no existe un patrón uniforme para los genes evaluados (*oprD*, *mexA*, *mexY*, *mexC*, *mexE*), ya que se observan tanto eventos de sobreexpresión como de subexpresión en todos los casos. En presencia de imipenem, el gen *oprD* se encontró subexpresado en el 22 % de las cepas analizadas (4/18), mientras que presentó sobreexpresión en el 50 % (9/18). El gen *mexA* mostró sobreexpresión en el 39 % de las cepas (7/18), *mexY* en el 67 % (12/18), *mexC* en el 61 % (11/18), y *mexE* en el 56 % (10/18). Los valores de $\log_2\text{FoldChange}$ de cada cepa en presencia de imipenem y su interpretación se encuentran en el Anexo 10.

Al asociar los niveles de expresión de estos genes en presencia de imipenem, con el perfil de susceptibilidad de las cepas seleccionadas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos fenotipos ($p > 0.05$). En la Figura 27 se observa un umbral de sobreexpresión más elevado en comparación con la expresión basal, que tendía a estar mayormente subexpresada.

En presencia de imipenem, se observó una diferencia significativa en la expresión de *mexA* entre filogrupos expresión de *mexA* fue mayor en el filogrupo PA14 (mediana $\log_2\text{FoldChange} = 3.8166$) que en el filogrupo PAO1 (mediana $\log_2\text{FoldChange} = -1.0967$) ($p = 0.0136$). No se observaron diferencias significativas en la expresión de *oprD*, *mexC*, *mexE* y *mexY* entre los filogrupos PAO1, PA14 y PA7 en presencia de imipenem ($p > 0.05$) (Figura 28).

La tasa de crecimiento y el AUC en presencia de imipenem no mostró una correlación estadísticamente significativa con la expresión de *oprD*, *mexA*, *mexC*, *mexE* y *mexY* ($p > 0.05$).

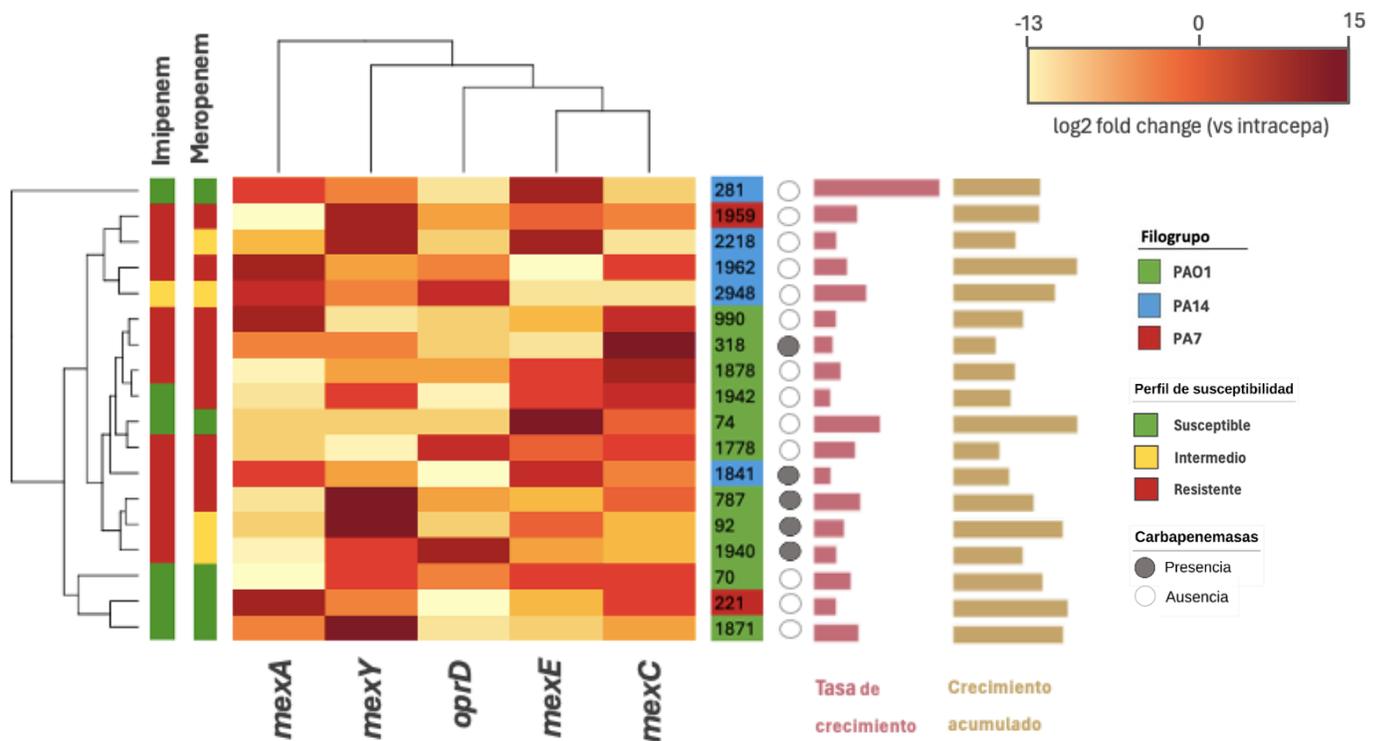


Figura 26. Mapa de calor que muestra el $\log_2\text{FoldChange}$ de la expresión génica relativa de cada cepa en exposición a imipenem comparado con la misma cepa en ausencia de este.

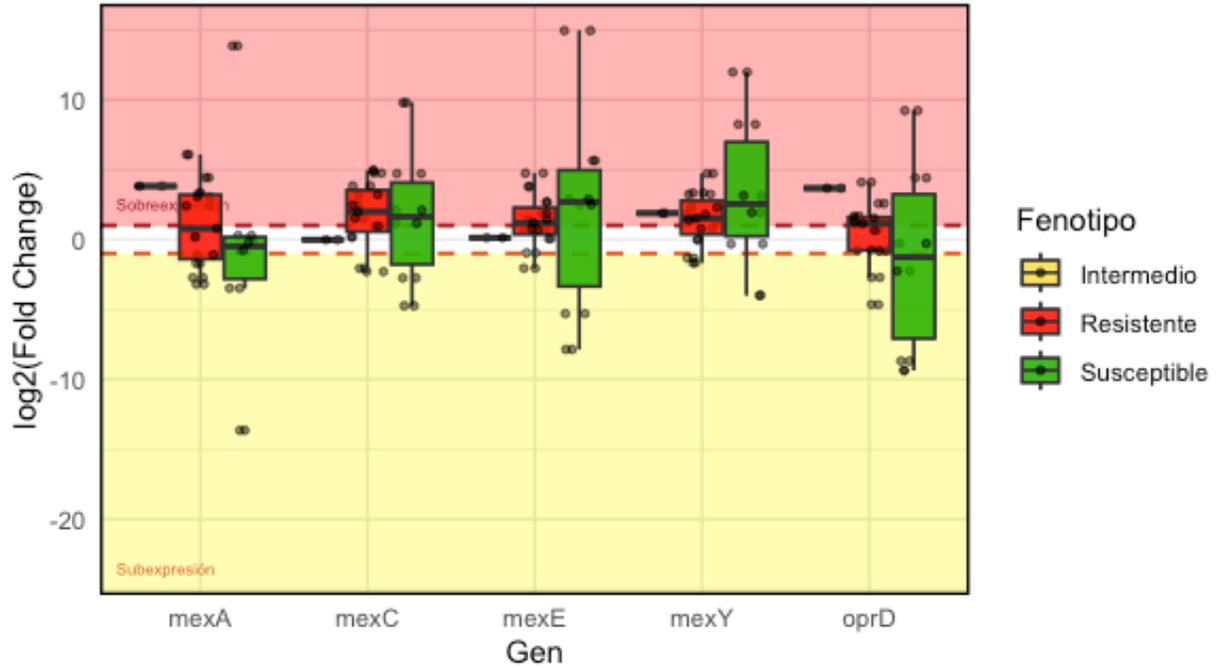


Figura 27. Boxplot del $\log_2\text{Fold Change}$ por perfil de susceptibilidad para cada gen de estudio. No hay diferencias significativas entre el fenotipo y la expresión de los genes de estudio ($p > 0.05$).

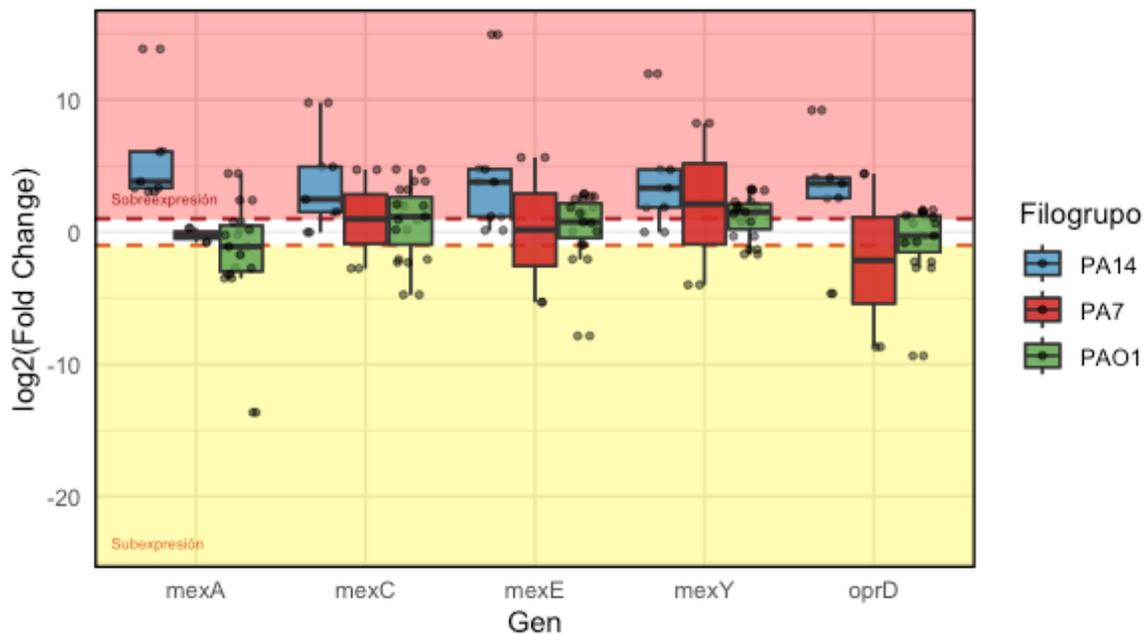


Figura 28. Boxplot del $\log_2\text{Fold Change}$ por filogruppo en presencia de imipenem para cada gen de estudio. Hay diferencia significativa entre la expresión de *mexA* en el filogruppo PAO1 y PA14 ($p = 0.01364$).

7.6.2 Expresión génica en presencia de meropenem

Se evaluó la expresión génica de cada una de las cepas seleccionadas frente a meropenem mediante un análisis intracepa, y se comparó la expresión génica en presencia y ausencia del antibiótico (Figura 29).

El análisis reveló heterogeneidad en el patrón de expresión de los genes evaluados (*oprD*, *mexA*, *mexY*, *mexC*, *mexE*), y se observó tanto sobreexpresión como subexpresión entre las distintas cepas. En presencia de meropenem, el gen *oprD* se encontró subexpresado en el 28 % de las cepas analizadas (5/18), mientras que presentó sobreexpresión en el 44 % (8/18). El gen *mexA* mostró sobreexpresión en el 39 % de las cepas (7/18), *mexY* en el 28 % (5/18), *mexC* en el 56 % (10/18), y *mexE* en el 39 % (7/18). Los valores de \log_2 FoldChange de cada cepa en presencia de imipenem y su interpretación se encuentran en el Anexo 9.

No hubo una asociación del perfil de susceptibilidad con la expresión de los genes de estudio (*oprD*, *mexA*, *mexY*, *mexC*, *mexE*) ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos fenotipos (susceptibilidad, intermedio y resistencia) ($p > 0.05$). (Figura 30).

Al comparar la expresión génica entre los diferentes filogrupos (PAO1, PA14 y PA7), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en presencia de meropenem. Esto contrasta con las condiciones basales y con imipenem, donde *mexA* mostró diferencias significativas entre filogrupos (Figura 31).

La tasa de crecimiento y el AUC en presencia de meropenem no mostró una correlación estadísticamente significativa con los perfiles de expresión génica ($p > 0.05$).

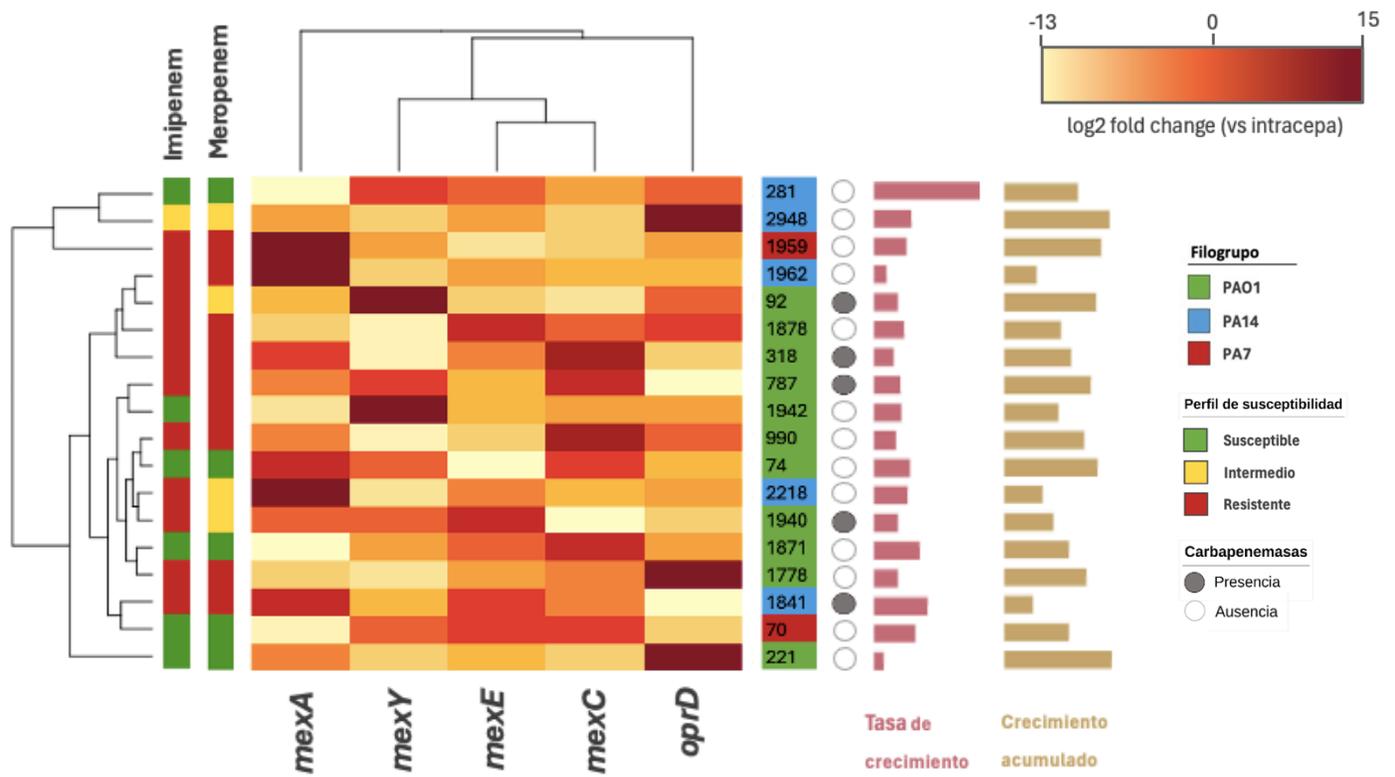


Figura 29. Mapa de calor que muestra el \log_2 FoldChange de la expresión génica relativa de cada cepa en exposición a meropenem comparado con la misma cepa en ausencia de éste.

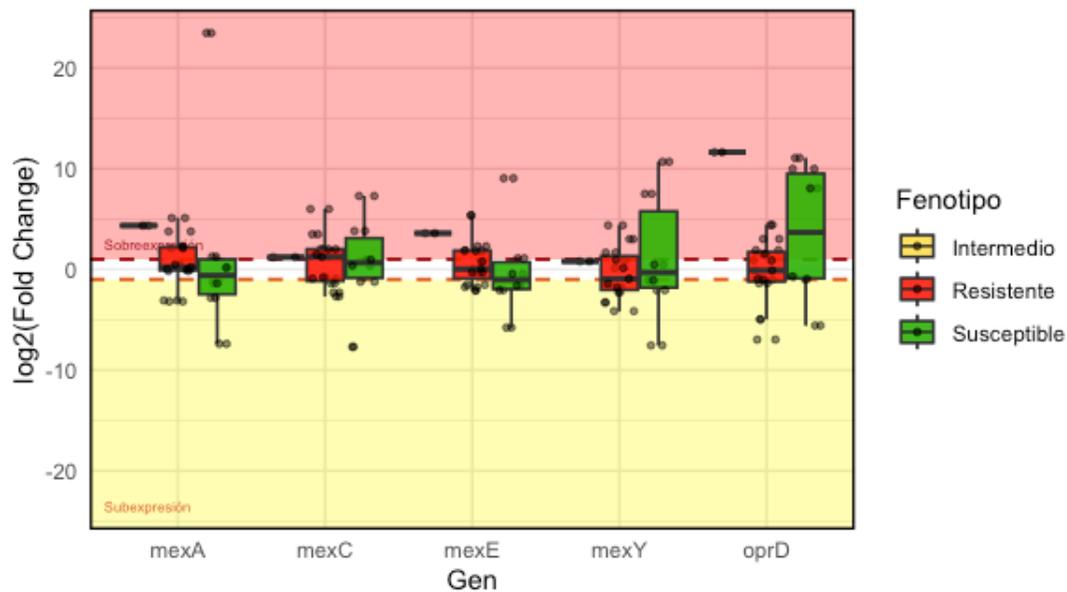


Figura 30. Boxplot del \log_2 Fold Change por perfil de susceptibilidad para cada gen de estudio bajo presencia de meropenem. No hay diferencias estadísticamente significativas entre el fenotipo y la expresión de los genes de estudio ($p > 0.05$).

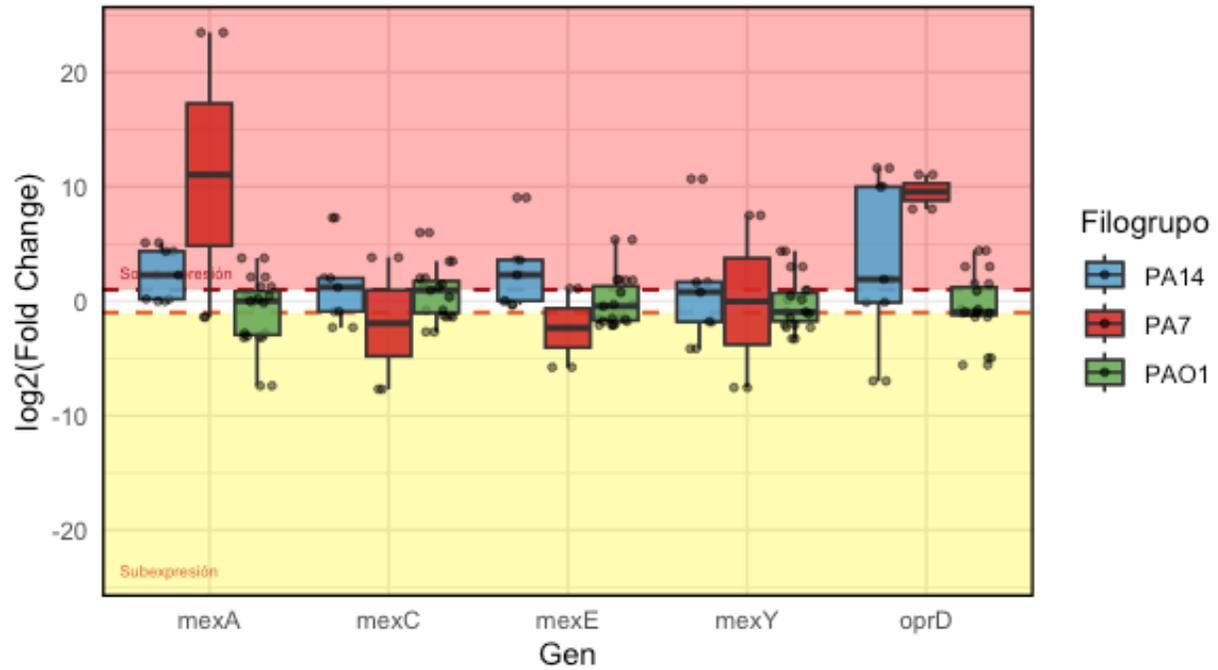


Figura 31. Boxplot del log₂Fold Change por filogrupo en presencia de meropenem para cada gen de estudio. No hay diferencias significativas entre el fenotipo y la expresión de los genes de estudio ($p > 0.05$).

7.6.3 Expresión génica diferencial en ausencia de antibiótico, en presencia de imipenem y en presencia de meropenem

Se evaluó si existían diferencias en la expresión génica bajo distintas condiciones: sin antibiótico, con imipenem y con meropenem. En *mexA* no se detectaron diferencias significativas en la expresión génica entre las condiciones analizadas ($p > 0.05$). En *mexC* se detectaron diferencias significativas entre condiciones sin antibiótico y en presencia de imipenem ($p = 0.026$), así como entre condiciones sin antibiótico y en presencia de meropenem ($p = 0.036$). En *mexE* también detectaron diferencias significativas entre condición sin antibiótico y en presencia de meropenem ($p = 0.0067$) y entre sin antibiótico y en presencia de imipenem ($p = 0.0039$). En *mexY* no se detectaron diferencias significativas en la expresión génica entre condiciones ($p > 0.05$). En *oprD* se detectaron diferencias significativas en condiciones sin antibiótico y con presencia de imipenem ($p = 0.00120$) y entre condiciones sin antibiótico y presencia de meropenem ($p = 0.00061$) (Figura 32).

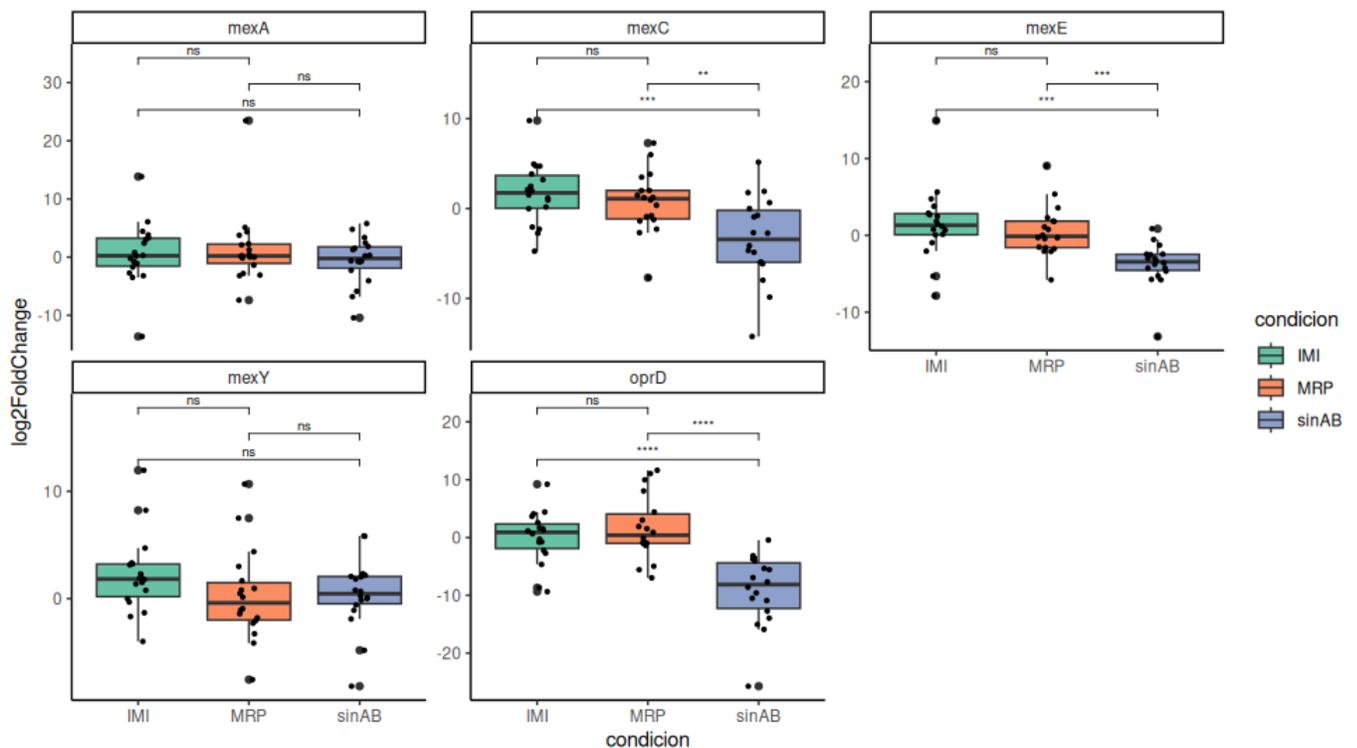


Figura 32. Boxplot del log₂Fold Change en ausencia de antibiótico, en presencia de imipenem y meropenem para cada gen de estudio.

IMI: imipenem, MRP: meropenem, sin AB: sin antibiótico.

8. DISCUSIÓN

P. aeruginosa resistente a carbapenémicos representa una de las especies bacterianas prioritarias de estudio debido a su capacidad intrínseca y adquirida para resistir múltiples clases de antibióticos. En este estudio, se analizó el impacto de las porinas y de las bombas de eflujo en los mecanismos de farmacorresistencia en cepas de *P. aeruginosa* aisladas de hospitales en México.

La secuenciación de genoma completo se ha consolidado como herramienta fundamental para el análisis de la diversidad filogenética y la caracterización de mecanismos de resistencia en bacterias de interés clínico (51-53). Estudios previos que emplearon la tecnología de Illumina reportaron genomas de *P. aeruginosa* con un tamaño promedio de 6.3 Mbp, un contenido GC del 66 % y un valor de N50 cercano a 115 kbp (54,55). En el presente estudio, se obtuvieron valores similares con tamaño promedio de 6.7 Mbp, un contenido GC del 66 % y un valor de N50 de 285 kbp.

En este estudio se identificó a la ST309 como la más frecuente entre las cepas analizadas. La ST309 ha sido previamente reportada como una de las de mayor prevalencia en México y se asocia con un fenotipo de multirresistencia a fármacos (56). Además, su presencia ha sido documentada en Asia, Europa, Oceanía y en diversos países de América. Esta clona se ha caracterizado por portar enzimas β -lactamasas del tipo GES, las cuales ha sido asociadas con resistencia al meropenem (57).

En un estudio realizado en Ecuador, que incluyó cepas clínicas de *P. aeruginosa* aisladas en Ecuador, se reportaron identificaron 24 ST distintosdiferentes, y entre las cuales las ST3750 y ST253 fueron las más frecuentemente reportadas, seguidas de por la ST235. Esta última es representa la clona de alto riesgo de mayor prevalencia a nivel mundial (58) (59). En el presente trabajoestudio, no se detectó la ST3750; sin embargo, ésta pertenece al complejo clonal ST111, que es consideradoclasificado como de alto riesgo, de con alta prevalencia a nivel mundialglobal, y que ya ha sidopreviamente identificadoa en México (60). En el presente estudio, se detectaron 13 cepas de pertenecientes a la ST111.

La diversidad de ST observada entre los distintos centros hospitalarios sugiere un comportamiento no clonal de las cepas analizadas, dada la variabilidad genética detectada entre los distintos hospitales. Cabe destacar la detección de la ST309 en múltiples hospitales, lo cual podría indicar un posible fenómeno de diseminación interhospitalaria (56, 61).

Los 136 genomas de *P. aeruginosa* analizados en este estudio, todos recuperados en México, se agruparon en tres filogrupos principales: PAO1, PA14 y PA7. Esta distribución ha sido reportada previamente en estudios realizados en diversas regiones geográficas. Por ejemplo, un estudio incluyó 82 genomas provenientes de varios países, entre ellos Australia e India, y otro analizó 389 genomas depositados en la base de datos del *International Pseudomonas Consortium Database*, provenientes de 35 países. Estos hallazgos respaldan la estructura filogenética observada en el presente estudio y sugieren que la distribución en los filogrupos PAO1, PA14 y PA7 se mantienen de forma consistente en cepas de diferentes regiones geográficas (62,63).

Entre los filogrupos identificados, el filogrupo PA7 destacó por presentar una mayor diversidad genética, evidenciada por una mayor abundancia de variantes, incluidas las sustituciones de un solo nucleótido (SNVs), sustituciones de múltiples nucleótidos (MNVs) y reordenamientos genéticos, en comparación con las cepas del pertenecientes a los filogrupos PAO1 y PA14.

Estudios previos han señalado que las cepas del filogrupo PA7 carecen del grupo de genes que codifica el sistema de secreción tipo III, lo que refleja su marcada divergencia genética con respecto a otros linajes de *P. aeruginosa* (63).

La divergencia de PA7 también se ve reflejada en los valores del ANI, ya que las cepas de este filogrupo mostraron un porcentaje de identidad promedio menor al 94 % respecto a las cepas de los otros filogrupos. Estos resultados coinciden con estudios anteriores que reportan una similitud genética de 93.5 % entre la cepa PA7 y las cepas PAO1 y PA14 (64).

La presencia de genes tipo *bla_{OXA}* fue frecuente en los filogrupos PAO1 y PA14. La mayoría de estos genes pertenecen a la familia *bla_{OXA-50}*, conformada por variantes alélicas de este gen que son conservados en *P. aeruginosa* y no codifican enzimas con actividad carbapenemasa (65).

En este estudio se detectó el gen *bla_{GES}* en cepas pertenecientes al filogrupo PA14, *bla_{VIM}* en cepas del filogrupo PAO1 y *bla_{IMP}* se detectó en ambos filogrupos. Un estudio previo realizado en Pakistán, que analizó 142 cepas clínicas de *P. aeruginosa*, identificó una asociación entre la presencia de genes codificantes de enzimas β-lactamasas (*bla_{GES}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA}*) y los filogrupos PAO1 y PA14, con base en un análisis de coordenadas principales (PCoA) (66). Estos resultados coinciden con los hallazgos del presente estudio, en el que también se observó una agrupación de los genes de resistencia (*bla_{GES}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA}*) según el filogrupo (PAO1, PA14 y PA7) en el análisis de PCoA.

Estudios previos han caracterizado los mecanismos de resistencia en cepas clínicas de *P. aeruginosa* y han reportado que entre el 60 % y el 70 % de las cepas resistentes a carbapenémicos carecen de genes codificantes para carbapenemasas (67). Estos resultados son consistentes con los resultados del presente estudio, en el cuál se observó que el 62 % de las cepas resistentes a carbapenémicos no portaban genes asociados a la producción de carbapenemasas. Este resultado sugiere la existencia de mecanismos de resistencia alternativos o compensatorios en ausencia de estas enzimas.

La inactivación de porinas, principalmente de OprD, es otro mecanismo de resistencia en *P. aeruginosa*. Estudios previos han reportado que aproximadamente el 68 % de las cepas presentan mutaciones en *oprD* que potencialmente afectan su función, incluyendo inserciones, mutaciones sin sentido y desplazamientos del marco de lectura. En el presente estudio se observó un porcentaje similar, ya que el 75 % de las cepas analizadas presentaron mutaciones que potencialmente inactivan la funcionalidad de OprD (66, 67). Además, se identificaron inserciones de elementos móviles en *oprD* en cepas del filogrupo PAO1, descrito previamente como un mecanismo común de inactivación de esta porina, lo que refuerza la existencia de patrones genéticos asociados a la estructura filogenética (68).

En el análisis de correlación entre mecanismos de resistencia y la CMI, se observó que las mutaciones sin sentido y los desplazamientos de marco de lectura en *oprD* se asocian con valores intermedios de CMI. No obstante, la combinación de estas mutaciones con la presencia de genes que codifican carbapenemasas se relacionó con valores elevados de CMI. Estudios previos han sugerido un efecto sinérgico entre pérdida de OprD y producción de carbapenemasas en cepas con altos niveles de resistencia, con CMI >16 µg/ml (67, 69).

Por otro lado, los estudios de docking mostraron que las cepas que conservan el OprD completo mantienen la afinidad por imipenem y meropenem, lo cual subraya el papel esencial de esta porina en la permeabilidad de la membrana externa frente a carbapenémicos (70). Las interacciones moleculares mostraron afinidades similares entre cepas con mutaciones y la cepa de referencia PAO1, lo cual sugiere que no todas las mutaciones predichas como inactivantes afectan directamente el sitio de unión del antibiótico. De hecho, se ha descrito previamente que ciertas mutaciones en OprD puede no comprometer la funcionalidad de la proteína (71).

En este estudio se observó expresión de *oprD* en el 100% de las cepas analizadas, sobreexpresión de los genes *mexA* (38.89%), *mexC* (16.67%) y *mexY* (38,89%), mientras que no se detectó sobreexpresión de *mexE* bajo condiciones sin antibiótico. En un estudio realizado en Egipto, se analizó la expresión de *oprD* y los genes de bombas de eflujo (*mexA*, *mexC*, *mexE* y *mexY*) en 634 cepas clínicas de *P. aeruginosa* y no se encontró subexpresión en *oprD*, mientras que sí se encontró sobreexpresión de *mexA* (21.8%), *mexC* (75%), *mexE* (18.7%) y *mexY* (62%) (46). En comparación con los resultados del presente estudio, no se observa similitud en los porcentajes de cepas que presentan sobreexpresión. Otro estudio analizó la expresión de *oprD* y *mexY* de 80 cepas clínicas de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, bajo condiciones sin estímulo (sin antibiótico) y se observó subexpresión de *oprD* (55%) y sobreexpresión de *mexY* (2.5%) (73). La frecuencia de subexpresión de *oprD* y sobreexpresión de *mexY* fue menor a la observada en el presente estudio, lo que podría deberse a diferencias genéticas en las cepas de este estudio al haber una regulación intrínseca ya generalizada sin la necesidad de exposición al antibiótico. Otra posible explicación para las discrepancias observadas en la frecuencia de cepas subexpresando *oprD* y sobreexpresión de los genes de bombas de flujo (*mexA*, *mexC*, *mexE* y *mexY*) entre distintos estudios es la falta de estandarización en los puntos de corte utilizados para definir sobreexpresión.

En las investigaciones revisadas se emplearon umbrales diferentes de sobreexpresión, lo que dificulta una comparación directa de los resultados (46). Además, varios estudios previos no especifican los criterios empleados para clasificar los niveles de expresión génica en las cepas, lo que representa una limitación en la comparación entre resultados (73).

La expresión de *oprD* y de los genes de bombas de eflujo (*mexA*, *mexC*, *mexE* y *mexY*) analizados no mostró una asociación estadísticamente significativa con los fenotipos de resistencia de las cepas ($p > 0.05$). Este hallazgo concuerda con lo reportado en un estudio previo, en el que tampoco se encontró correlación entre la expresión de *mexY* y *mexA* con la resistencia a meropenem e imipenem (46). En un trabajo realizado en un hospital de México, se demostró la sobreexpresión de *mexA* 25 % se asoció a un aumento de la CMI en cepas resistentes a carbapenémicos (74).

Algunos autores han señalado que la concordancia entre metodologías fenotípicas y genotípicas solo se ha observado en cepas de referencia o de laboratorio caracterizadas, pero no en aislados clínicos, donde la diversidad genética da lugar a una mayor variabilidad fenotípica (75-77).

Adicionalmente, se analizó si la expresión de los genes de estudio varía conforme entre los filogrupos PAO1, PA14 y PA7, y se encontró que las cepas pertenecientes al filogrupo PAO1 tienen mayor expresión del gen *mexA* que las cepas del filogrupo PA14 ($p = 0.0103$).

No se encontraron estudios que comparen de manera sistemática la expresión de genes de bombas de eflujo entre diferentes filogrupos de *P. aeruginosa*; Sin embargo, en un estudio realizado en un hospital de México, se reportó que sustituciones nucleotídicas en *mexR*, el gen regulador de MexAB-OprM, se mantenían en los linajes genéticos. En el presente estudio, también se observó que se mantuvieron linajes genéticos, ya que mutaciones de cambio de sentido en el gen *mexR* solo se encontraron en las cepas de filogrupo PAO1 (74).

La sobreexpresión de *oprD* se correlacionó con la tasa de crecimiento. Esta asociación es coherente con el rol fisiológico de OprD, ya que además de ser la principal porina implicada en la entrada de carbapenémicos, también facilita el transporte de nutrientes como aminoácidos básicos. Por tanto, cepas con mayor expresión de *oprD* podrían beneficiarse de una mayor captación de nutrientes, lo

cual podría impactar positivamente en su tasa de crecimiento. Este resultado también indica que la pérdida o disminución de la expresión de *oprD* si bien contribuye a la resistencia, podría representar un costo biológico en términos de eficiencia metabólica o velocidad de crecimiento, como se ha reportado en otros estudios sobre la fisiología de *P. aeruginosa* (78 - 80).

Se observó un aumento en el número de cepas que sobre expresaron genes de bombas de eflujo en presencia de cualquiera de los dos carbapenémicos evaluados. Este hallazgo concuerda con estudios previos que han señalado que la expresión de estos genes puede estar modulada por factores ambientales de estrés, como la limitación nutricional o la exposición a antimicrobianos (81). No obstante, hasta el momento no se han reportado estudios que evalúen la expresión de bombas de eflujo en presencia de carbapenémicos en cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

Si bien OprD es reconocida como la principal porina de entrada para imipenem en *P. aeruginosa*, y su pérdida o subexpresión se ha asociado con resistencia a carbapenémicos, en este estudio se observó que algunas cepas mostraron sobreexpresión de *oprD* al ser expuestas a imipenem y meropenem (22% y 28% respectivamente), incluso cuando mostraban un fenotipo resistente a ambos antibióticos. La sobreexpresión observada podría deberse a una respuesta inducida al estrés antibiótico. La exposición a imipenem podría activar reguladores que aumenten la transcripción de *oprD*, como parte de una respuesta adaptativa a condiciones de estrés. Esto ha sido descrito en otros contextos, donde ciertos genes relacionados con permeabilidad incrementan su expresión en presencia de antibióticos, posiblemente como un intento de compensar alteraciones fisiológicas más amplias. Otra posibilidad es que la sobreexpresión detectada no se traduzca en una proteína funcional, ya que algunas de estas cepas presentan mutaciones en *oprD* que alteran su estructura o función lo cual explicaría la resistencia fenotípica observada a pesar de la sobreexpresión a nivel transcripcional. Además, la sobreexpresión observada podría representar un evento específico del ciclo de respuesta bacteriana y no reflejar una adaptación estable en el tiempo. Este hallazgo subraya la necesidad de estudios longitudinales que incluyan múltiples puntos temporales de muestreo, a fin de caracterizar con mayor precisión los patrones de regulación de oprD en respuesta a la presión de los antibióticos (78, 79, 82).

Este estudio presenta algunas limitaciones que deben considerarse al interpretar los resultados. En primer lugar, se utilizaron diferentes concentraciones de antibiótico basadas en la CMI individual de cada cepa, lo que dificulta la comparación del efecto inductor o estimulante del antibiótico sobre la expresión de bombas de eflujo y *oprD* entre cepas. Además, el tamaño de muestra para el análisis de expresión génica fue reducido ($n = 18$), lo que limita el poder estadístico del análisis, ya que las pruebas de correlación requieren un mayor número de observaciones para lograr una mayor robustez.

9. CONCLUSIONES

- Las cepas de *P. aeruginosa* analizadas presentan una alta tasa de resistencia antimicrobiana, particularmente a fluoroquinolonas (100% para LVX y 71% para CIP) y aminoglucósidos (100% a TOB y 64% a AMK), además de resistencia a carbapenémico
- Las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas se agrupan filogenéticamente en los filogrupos PAO1, PA14 y PA7, siendo este último identificado como un linaje divergente con menor similitud genética respecto a los otros dos.
- Las mutaciones en el gen *oprD* que potencialmente inactivan su función (mutaciones sin sentido o de desplazamiento de marco de lectura) se asociaron a perfiles de resistencia a carbapenémicos, mientras que mutaciones de cambio de sentido se relacionaron con perfiles de susceptibilidad a carbapenémicos.
- La presencia de genes codificantes para carbapenemasas se asociaron con una fase lag bacteriana similar en condiciones de presencia y ausencia de carbapenémicos, sugiriendo un impacto reducido de estos antibióticos en el crecimiento de las cepas productoras de estas enzimas.
- En contraste, la ausencia de genes codificantes para carbapenemasas se relacionó con una fase lag más prolongada en presencia de carbapenémicos, lo que sugiere una mayor afectación del crecimiento bacteriano en estas condiciones.
- La expresión del gen *mexA*, tanto en ausencia de antibiótico como en presencia de imipenem, mostró una asociación significativa con el linaje filogenético de las cepas.
- La exposición a carbapenémicos indujo la sobreexpresión de genes codificantes de bombas de eflujo, lo que indica un posible efecto adaptativo de las mismas en respuesta al estrés inducido por el antibiótico.

10. REFERENCIAS

1. Shen C, Zeng J, Zheng D, Xiao Y, Pu J, et al. Molecular epidemiology and genomic dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing relapse infections. *Microbiol Spectr*. 2023;11(5):e05312-22.
2. Ramírez-Estrada S, Borgatta B, Rello J. *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia management. *InfectDrug Resist*. 2016:7-18.
3. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022;399(10325):629-55.
4. Pelegri AC, Palmieri M, Mirande C, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: a clinical and genomics update. *FEMS Microbiol Rev*. 2021;45(6):fuab026.
5. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(3):318-27.
6. Bassetti M, Vena A, Croxatto A, et al. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs Context*. 2018;7.
7. Langendonk RF, Neill DR, Fothergill JL. The Building Blocks of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for Current Resistance-Breaking Therapies. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:665759.
8. Darby EM, Trampari E, Siasat P, et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nat Rev Microbiol*. 2023;21(5):280-95.
9. Garza-Ramos U, Rodríguez-Medina N, Córdova-Fletes C, et al. Whole genome analysis of Gram-negative bacteria using the EPISEQ CS application and other bioinformatic platforms. *J Glob Antimicrob Resist*. 2023;33:61-71.
10. Astocondor-Salazar L. Betalactamasas: La Evolución del Problema. *Revista Peruana de Investigación en salud*. 2018;2(2):42-9.
11. Gaete ME, Valenzuela MP, Bachero AW et al. Carbapenemasas en *Pseudomonas aeruginosa* con susceptibilidad disminuida a los carbapenémicos después de una década, desde VIM a KPC. *Rev Chil Infectol*. 2020;37(4):389-94.
12. Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(5):698-722.

13. Ude J, Tripathi V, Buyck JM, Söderholm S, Cunrath O, Fanous J, et al. Outer membrane permeability: Antimicrobials and diverse nutrients bypass porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2021;118(31):e2107644118.
14. Elfadadny A, Ragab RF, AlHarbi M, et al. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: navigating clinical impacts, current resistance trends, and innovations in breaking therapies. *FrontMicrobiol*. 2024;15:1374466.
15. Hancock RE, Brinkman FS. Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu Revi Microbiol*. 2002;56(1):17-38.
16. Aruna S, Krishna PBM. Comparative evaluation of phenotypic methods for detection of MBL producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn wound infections. *IP Int J Med Microbiol Trop Dis*. 2018;4:53-9.
17. Yin S, Chen P, You B, et al. Molecular typing and carbapenem resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a Chinese burn center from 2011 to 2016. *FrontMicrobiol*. 2018;9:1135.
18. Xiong J, Déraspe M, Iqbal N, et al. Complete genome of a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* strain, isolated from a patient with respiratory failure in a Canadian community hospital. *Genome Announc* 5: e00458-17. 2017.
19. Yonehara R, Yamashita E, Nakagawa A. Crystal structures of OprN and OprJ, outer membrane factors of multidrug tripartite efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteins*. 2016;84(6):759-69.
20. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. 2019;37(1):177-92.
21. Daury L, Orange F, Taveau J-C, et al. Tripartite assembly of RND multidrug efflux pumps. *Nat Commun*. 2016;7(1):10731.
22. Rahbar M, Hamidi-Farahani R, Asgari A, et al. Expression of RND efflux pumps mediated antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Microb Pathog*. 2021;153:104789.
23. Tsutsumi K, Yonehara R, Ishizaka-Ikeda E, et al. Structures of the wild-type MexAB–OprM tripartite pump reveal its complex formation and drug efflux mechanism. *Nat Commun*. 2019;10(1):1520.

24. Beig M, Taheri M, Arabestani MR. Expression of MexAB-OprM efflux pump and OprD porin in carbapenemase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Gene Rep.* 2020;20:100744.
25. Shigemura K, Osawa K, Kato A, et al. Association of overexpression of efflux pump genes with antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains clinically isolated from urinary tract infection patients. *J Antibiot.* 2015;68(9):568-72.
26. Sherrard LJ, Wee BA, Duplancic C, et al. Emergence and impact of oprD mutations in *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2022;21(1):e35-e43.
27. Horna G, López M, Guerra H, et al. Interplay between MexAB-OprM and MexEF-OprN in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep.* 2018;8(1):16463.
28. Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DJ et al. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Revi.* 2018;42(1):fux053.
29. Karampatakis T, Antachopoulos C, Tsakris A, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an endemic area: comparison with global data. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37:1211-20.
30. Cabrera R, Fernández-Barat L, Vázquez N, et al. Resistance mechanisms and molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with bronchiectasis. *J Antimicrob Chemother.* 2022;77(6):1600-10.
31. Saha K, Kabir ND, Islam MR, et al. Isolation and characterisation of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital environments in tertiary care hospitals in Dhaka, Bangladesh. *J Glob Antimicrob Resist.* 2022;30:31-7.
32. Rojas-Larios F, Martínez-Guerra BA, López-Jácome LE, et al. Active Surveillance of Antimicrobial Resistance and Carbapenemase-Encoding Genes According to Sites of Care and Age Groups in Mexico: Results from the INVIFAR Network. *Pathogens.* 2023;12(9):1144.
33. Garza-González E, Franco-Cendejas R, Morfin-Otero R, et al. The evolution of antimicrobial resistance in Mexico during the last decade: results from the INVIFAR Group. *Microb Drug Resist.* 2020;26(11):1372-82.
34. Quainoo S, Coolen JP, van Hijum SA, et al. Whole-genome sequencing of bacterial pathogens: the future of nosocomial outbreak analysis. *Clin Microby Rev.* 2017;30(4):1015-63.
35. Gorgani N, Ahlbrand S, Patterson et al. Detection of point mutations associated with antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *IntJ Antimicrob Agents.* 2009;34(5):414-8.

36. Lauritsen JG, Hansen ML, Bech PK, et al. Identification and differentiation of *Pseudomonas* species in field samples using an rpoD amplicon sequencing methodology. *Msystems*. 2021;6(4):10.1128/msystems.00704-21.
37. Crossley BM, Bai J, Glaser A, et al. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *J Vet Diagn Invest*. 2020;32(6):767-75.
38. Hu T, Chitnis N, Monos D, et al. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol*. 2021;82(11):801-11.
39. Magalhães B, Valot B, Abdelbary MM, et al. Combining standard molecular typing and whole genome sequencing to investigate *Pseudomonas aeruginosa* epidemiology in intensive care units. *Frontiers Public Health*. 2020;8:3.
40. Hoque MN, Jahan MI, Hossain MA, et al. Genomic diversity and molecular epidemiology of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* DMC30b isolated from a hospitalized burn patient in Bangladesh. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022;31:110-8.
41. Ahmed OB. Detection of antibiotic resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* by whole genome sequencing. *Infect Drug Resist*. 2022:6703-9.
42. Ramanathan B, Jindal HM, Le CF, et al. Next generation sequencing reveals the antibiotic resistant variants in the genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS One*. 2017;12(8):e0182524.
43. Lutz Í, Miranda J, Santana P, et al. Quality analysis of genomic DNA and authentication of fisheries products based on distinct methods of DNA extraction. *Plos One*. 2023;18(2):e0282369.
44. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(12):3491-500.
45. Rio DC, Ares M, Hannon GJ, et al. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6):pdb.prot5439.
46. Hassuna NA, Darwish MK, Sayed M, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of high-level resistance to meropenem and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Drug Resist*. 2020:285-93.
47. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:1-9.

48. Coraisaca, Diana Verónica Barbecho. Susceptibilidad antimicrobiana en *Pseudomonas* spp., en el Hospital General Docente Cuenca-Ecuador. *Revista de Investigación en Salud*. 2021; 4: 484 – 499
49. Duong, N. T., Huynh, T. M., & Le, A. T. Prevalence of overexpressed resistance nodulation division (RND) efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa* causing nosocomial infections in several hospitals in Ho Chi Minh City. *MedPharmRes*, 2025;9(1), 17-28.
50. Delgadillo-Valles, Ricardo, et al. Investigación del perfil de resistencia a betalactámicos en cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* en Mexicali, 2019-2021. *Rev argentina Microbiol* 56.4 2024;;: 368-372
51. Thorpe, Joseph, et al. Multi-platform whole genome sequencing for tuberculosis clinical and surveillance applications. *Sci Rep* 14.1 2024: 5201
52. Din, N. S., Mohd. Rani, F., Alattraqchi, A. et al, C. C. Whole-genome sequencing of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from a tertiary hospital in Terengganu, Malaysia (2011–2020), revealed the predominance of the Global Clone 2 lineage. *Microb Genom*, 2025;11(2), 001345
53. Mejía-Limones, I., Andrade-Molina, D., Morey-León, et al. Whole-genome sequencing of *Klebsiella pneumoniae* MDR circulating in a pediatric hospital setting: a comprehensive genome analysis of isolates from Guayaquil, Ecuador. *BMC Genomics*, 2024; 25(1), 928.
54. Adenikinju, A., Jensen, R. V., Kerkering, T. M., et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* CMC-115, a clinical strain from an acute ventilator-associated pneumonia patient. *Microbiol Resour Announc*, 2020; vol. 9, no 30, p. 10.1128/mra. 00595-20
55. Verhoeve, V. I., Brammer, J.A., Driscoll, T. P., et al. Genome sequencing of *Pseudomonas aeruginosa* strain M2 illuminates traits of an opportunistic pathogen of burn wounds. *G3 (Bethesda)* 12: jkac073. 2022.
56. Papa-Ezdra, R., Outeda, M., Cordeiro, et al. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* High-Risk Clone ST309 Serotype O11 Featuring bla PER-1 and qnrVC6. *Antibiotics*, 2024; 13(2), 159.
57. Morales-Espinosa, R., Delgado, G., Espinosa, L. F., et al. Fingerprint analysis and identification of strains ST309 as a potential high risk clone in a *Pseudomonas aeruginosa* population isolated from children with bacteremia in Mexico City. *Front Microbiol*, 2017; 8, 313.

58. Zurita J., Sevillano G., Solis M. B., et al. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with multidrug-resistant. *J Glob Antimicrob Resist*, 2024, vol. 38, p. 332-338.
59. Trepong, P., Kos, V.N., Guyeux C., et al. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. *Clin Microbiol Infect*, 2018, vol. 24, no 3, p. 258-266
60. Flores-Vega, Verónica Roxana, et al. High-risk *Pseudomonas aeruginosa* clones harboring β -lactamases: 2024 update. *Heliyon*, 2025, vol. 11, no 1.
61. Xavier, Keyla Vitória Marques, et al. Molecular epidemiological study of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitals in Brazil by MLST and CRISPR/Cas system analysis. *Molr Genet Genomics*, 2025, vol. 300, no 1, p. 1-13.
62. Subedi, D., Vijay, A. K., Kohli, G. S., et al. Comparative genomics of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different geographic sites. *Sci Rep*, 2018; 8(1), 15668
63. Freschi, L., Jeukens, J., Kukavica-Ibrulj, I., Boyle, B., et al. Clinical utilization of genomics data produced by the international *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *Front Microbiol*, 2015; 6, 1036.
64. Roy, P. H., Tetu, S. G., Larouche A., et al. Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PloS One*, 2010, vol. 5, no 1, p. e8842.
65. Girlich, Delphine; Naas, Thierry; Nordmann, Patrice. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004; vol. 48, no 6, p. 2043-2048.
66. Diorio-Toth, L., Irum, S., Potter, R. F., Wallace, M. A., Arslan, M., Munir, T.,... & Dantas, G. Genomic surveillance of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates reveals an additive effect of carbapenemase production on carbapenem resistance. *Microbiology Spectr*, 2022; 10(3), e00766-22
67. de Almeida, K. D. C. F., Teixeira, F. L., Paiva, D. L. F., et al. Carbapenem resistance in non-carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains: the role importance of OprD and AmpC. *Research, Society and Development*, 2022; 11(13), e287111335164-e287111335164.
68. Al-Bayssari, C., Valentini, C., Gomez, C., et al. First detection of insertion sequence element ISPa1328 in the oprD porin gene of an imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

isolate from an idiopathic pulmonary fibrosis patient in Marseille, France. *New microbes and new infections*, 2015. 7, 26.

69. Wang, M., Zhang, Y., Pei, F., et al. Loss of OprD function is sufficient for carbapenem-resistance-only but insufficient for multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC microbiology*, 2025; 25(1), 218.
70. Isabella, V. M., Campbell, A. J., Manchester, J., et al. A. Toward the rational design of carbapenem uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & biology*, 2015; 22(4), 535-547.
71. Suresh, M., Skariyachan, S., Narayanan, N., et al. Mutational variation analysis of oprD porin gene in multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Drug Resistance*, 2020; 26(8), 869-879.
72. Olivares, J., Álvarez-Ortega, C., & Martínez, J. L. Metabolic compensation of fitness costs associated with overexpression of the multidrug efflux pump MexEF-OprN in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014; 58(7), 3904-3913.
73. Muderris, T., Durmaz, R., Ozdem B., et al. Role of efflux pump and OprD porin expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *J Infect Dev Ctries* 12.01 2018; 001-008.
74. Aguilar-Rodea, P., Zúñiga, G., Cerritos, R., et al. Nucleotide substitutions in the *mexR*, *nalC* and *nalD* regulator genes of the MexAB-OprM efflux pump are maintained in *Pseudomonas aeruginosa* genetic lineages. *PLoS One*, 2022; 17(5), e0266742.
75. Vedel G. Simple method to determine beta-lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. *J Antimicrob Chemother*. 2005; Oct;56(4):657–64. Epub 2005 Sep 6. pmid:16144872.
76. Yoneda K., Chikumi H., Murata T., et al. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett*. 2005; Feb 1;243(1):125–31. pmid:15668010.
77. Poonsuk K, Tribuddharat C, Chuanchuen R. Simultaneous overexpression of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* non-cystic fibrosis clinical isolates. *Can J Microbiol*. 2014;60(7):437–43. Epub 2014 May 12. pmid:24909060
78. Amisano, F., Mercuri, P., Fanara, S., et al. Outer membrane permeability of *Pseudomonas aeruginosa* through β -lactams: new evidence on the role of OprD and OpdP porins in antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.*, 2025; 13(4), e00495-24.

79. Kok, M., Hankemeier T., Coen van Hasselt J.G., Nutrient conditions affect antimicrobial pharmacodynamics in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Spectr.* 2025; 13.1; e01409-24.
80. Suresh, M., Skariyachan, S., Narayanan, N., et al. Mutational variation analysis of oprD porin gene in multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Drug Resist.*, 2020; 26(8), 869-879.
81. Li, W. R., Zhang, Z. Q., Liao, K., et al 2025. Efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa* and their regulatory mechanisms underlying multidrug resistance. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2025, 106096.
82. Ferrer-Espada, R., Shahrour, H., Pitts, B., et al. A permeability-increasing drug synergizes with bacterial efflux pump inhibitors and restores susceptibility to antibiotics in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Sci Rep*, 2019;9(1), 3452.

ANEXOS

Anexo 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en el estudio.

Gen	Secuencia 5' → 3'
<i>oprD</i>	F:CTACGGCTACGGCGAGGAT R:GACCGGACTGGACCACGTACT
<i>mexA</i>	F:AACCCGAACAACGAGCTG R:ATGGCCTTCTGCTTGACG
<i>mexC</i>	F:GGAAGAGCGACAGGAGGC R:CTGCACCGTCAGGCCCTC
<i>mexE</i>	F:TACTGGTCCTGAGCGCCT R:CAGCGGTTGTTCGATGA
<i>mexY</i>	F:CCGCTACAACGGCTATCCCT R:AGCGGGATCGACCAGCTTTC
<i>rpsL</i>	F:CCGCTACAACGGCTATCCCT R:AGCGGGATCGACCAGCTTTC

Anexo 3. Parámetros de calidad de los genomas secuenciados.

Cepa	No. contigs	Tamaño (bp)	GC (%)	N50	N90	L50	L90	Cobertura (%)	Profundidad (x)
56	118	6837302	66.14	170165	56194	15	40	96.11	91.25
70	46	6294002	66.42	362902	83198	7	21	95.3	76.88
74	64	6084458	66.51	202402	49308	11	35	96.17	65.56
76	122	6829495	66.15	163436	56736	13	40	96.27	64.26
77	78	6701535	65.91	237761	71135	9	27	96.12	92.33
78	71	6704066	65.91	270742	81812	9	24	95.31	79.06
92	83	6697594	65.92	231958	58161	10	30	95.29	56.62
127	81	6698945	65.92	263195	63711	9	28	96.11	82.89
180	81	6710801	66.09	295112	71271	8	27	95.31	69.18
220	98	6943609	65.86	316897	57403	8	33	96.06	64.1
221	36	6187628	66.8	449091	173632	5	14	96.07	57.61
249	80	6719363	66.17	274195	67355	8	27	96.41	100.57
250	68	6729362	66.16	287357	85110	9	23	96.35	78.4
264	97	6949978	65.97	370215	71082	6	24	96.08	77.18
265	72	7078871	65.77	271547	90310	9	28	96.35	81.54
281	63	6837179	66.14	357342	82967	7	22	96.35	72.65
282	91	7240344	65.91	237255	69059	11	33	96.35	80.53
283	96	6964038	65.99	219563	65468	11	33	96.35	85.54
296	109	6926784	66.01	164590	51254	13	37	96.35	84.11

317	140	6978451	66.08	237107	62105	9	29	96.34	66.32
318	93	6980239	66.08	322171	75698	7	23	96.36	96.28
319	141	7357612	65.61	162276	41217	15	48	96.16	100.42
321	154	7346277	65.61	182251	41762	13	47	96.34	95.72
618	79	6817692	65.97	239168	91584	9	25	95.17	79.7
629	74	6827300	65.97	204180	91584	11	28	96.78	61.3
660	119	7278498	65.41	211916	60382	12	35	96.28	67.31
665	65	6880470	65.98	298062	90923	9	24	96.29	66.41
787	90	7030881	65.81	265706	75283	10	29	94.87	79.66
788	167	6955076	65.83	153749	42642	16	50	98.57	71.92
789	99	7057777	65.81	218292	68364	12	34	98.6	60.68
790	127	7084594	65.81	191032	45343	13	38	97.98	81.19
805	49	6305283	66.49	366527	88209	8	21	96.37	78.7
806	74	6392244	66.35	292064	80935	7	22	96.36	72.06
807	54	6351251	66.47	340754	84697	7	22	96.35	73.06
808	67	6967079	66	368801	90804	7	23	96.28	64.55
990	99	7044609	66.07	322173	77363	8	26	96.42	65.14
993	57	6820682	66.01	288083	90923	9	24	96.41	57.85
1038	80	6703216	65.91	241269	63711	10	29	96.28	74.04
1043	107	6846693	66.14	191610	52174	12	38	96.3	76.33
1060	56	6582268	66.12	277126	106234	8	23	95.3	71.91
1062	84	6922844	65.96	245040	71271	9	31	94.85	84.65

1063	70	6706691	65.91	333480	71144	6	21	96.1	73.88
1087	166	6994279	65.97	181250	41269	13	41	96.09	97.98
1189	112	6961230	66	181625	56411	12	37	96.27	60.28
1395	112	6950078	66.02	170732	51254	11	38	96.35	62.03
1489	65	6769444	66.02	224048	106229	9	25	96.35	77.48
1516	84	6811371	66.07	204962	69975	10	32	96.57	93.29
1545	44	6403263	66.41	538830	140179	5	14	96.57	86.6
1553	51	6729934	66.13	508101	133757	6	15	96.28	56.32
1573	64	6777913	66.02	294407	119939	7	22	96.54	60.45
1574	51	6721699	66.13	535888	100554	5	16	96.5	96.13
1590	55	6720232	66.12	370210	100554	7	20	92.81	73.52
1593	54	6722839	66.13	406873	94924	6	20	92.8	51.98
1597	43	6442612	66.39	428622	207960	5	13	96.37	59.95
1601	61	6731894	66.12	294224	106720	8	20	96.39	71.19
1609	61	6721397	66.12	365703	78784	6	20	96.7	74.24
1669	79	6756747	66.11	334723	92787	7	20	96.69	49.43
1670	60	6256769	66.51	389571	79761	7	18	95.97	72.39
1675	57	6272117	66.52	394926	89924	7	19	95.95	82.76
1676	92	6569828	66.23	321135	100013	8	20	96.3	86.03
1681	60	6779727	66.02	232250	88944	9	24	96.41	82.07
1683	143	6881464	66.15	234988	67747	10	32	96.35	79.78
1685	109	7324962	65.43	267518	67959	10	30	96.36	87.45

1686	63	6880071	65.96	336987	70811	8	21	82.75	23.68
1687	62	6690457	66.08	302782	98192	6	20	83.39	57.11
1689	442	6769875	65.66	61930	9058	28	134	96.4	95.48
1690	108	6806905	66	292774	71610	8	24	96.25	60.27
1701	85	7155402	65.72	294991	75957	10	26	96.87	60.17
1702	78	7118173	65.76	291439	82817	10	27	96.3	81.62
1703	79	7152653	65.72	271645	87807	9	26	96.08	55.81
1777	100	7020712	65.89	293039	70439	10	29	94.56	84.26
1778	116	7082953	65.79	242813	55367	10	31	95.89	71.68
1783	120	7073720	65.79	223518	51136	11	33	95.31	61.43
1784	109	6842343	66.21	377596	71891	5	24	95.28	38.19
1785	70	7008101	65.91	346644	74324	7	24	96.18	65.23
1788	70	6741356	66.14	226819	83326	10	27	96.57	52.04
1803	63	6738496	66.04	430332	81065	6	19	96.19	58.24
1815	61	6455165	66.34	400676	111604	6	18	83.6	75.15
1819	103	6897446	65.94	226648	68498	10	33	96.21	54.62
1826	54	6369688	66.44	332478	95287	6	18	97.44	70.95
1837	52	6375056	66.45	411319	103680	6	16	96.26	41.55
1838	52	6280094	66.54	472151	89746	4	13	96.27	75.13
1839	54	6281518	66.54	369636	219075	6	14	96.41	54.11
1841	88	6992874	65.87	304990	68376	7	27	96.4	59.58
1842	60	6410646	66.3	356562	91802	5	19	96.29	78.39

1847	103	6126898	66.26	122608	33154	14	51	95.32	70.58
1868	107	6844909	65.7	199041	47679	11	33	95.26	40.34
1869	103	6840331	65.7	211387	62478	11	32	96.4	74.36
1871	64	6319503	66.5	416438	71893	6	19	96.39	43.25
1878	58	6322260	66.5	359441	80439	7	20	95.29	77.87
1884	63	6425031	66.28	319735	86727	8	22	95.29	66.96
1885	73	6412781	66.29	267877	70655	9	26	96.3	48.88
1886	42	6383056	66.47	431218	108026	6	18	96.41	86.38
1894	42	6390380	66.46	339786	95423	7	21	96.33	81.32
1940	61	6287344	66.53	280045	94174	7	19	96.32	85.2
1942	47	6282113	66.51	620168	87673	5	14	96.29	54.04
1943	93	7013256	65.81	331263	71271	7	27	96.29	45
1944	85	7003822	65.81	299370	91696	8	25	96.27	46.18
1959	50	6354284	66.57	292967	75438	7	25	96.27	52.01
1960	64	6384608	66.51	542998	88454	5	15	96.31	67.17
1961	43	6317969	66.51	425438	141313	6	15	96.44	88.12
1962	78	6885755	66	294174	68498	8	26	96.31	87.78
1985	61	6347808	66.39	350024	106175	6	18	95.8	52.77
1986	52	6283827	66.53	359824	136626	7	17	95.84	67.39
1989	54	6567531	66.25	316245	76475	6	21	96.28	66.35
1993	103	6720911	66.05	307265	71271	8	25	96.21	84.57
1994	53	6393198	66.41	342500	94020	6	21	96.46	66.38

2008	123	6902555	66.07	163095	48111	13	41	96	15.99
2014	127	6943896	66.02	150052	48263	14	44	96.23	83.12
2023	52	6768297	66.11	349434	130707	7	20	96.29	57.93
2218	118	7065644	65.86	225921	70507	11	31	95.3	96.02
2224	116	7065490	65.86	242752	80574	11	30	96.28	53.17
2237	81	6586002	66.06	299222	74834	8	24	96.29	58.7
2238	204	7375293	65.38	154870	36878	17	59	96.31	30.4
2240	170	7389722	65.37	190627	38013	13	47	96.31	37.87
2276	110	7208788	65.74	160234	40108	13	43	95.27	47.37
2279	103	7209838	65.73	162210	52083	12	40	96.35	71.16
2280	111	6989813	66.11	258604	79777	8	26	96.39	85.7
2310	108	6957260	66.01	203335	52190	12	36	96.34	71.32
2355	126	6971170	65.99	155110	47546	14	44	96.1	73.68
2386	66	7048584	65.81	284563	87816	9	23	96.25	63.23
2447	101	7101313	65.76	186908	45343	13	38	96.37	31.58
2588	141	7094955	65.38	146534	39998	14	48	95.29	61.69
2590	53	6287957	66.48	367646	106179	6	16	96.11	73.37
2594	122	7271702	65.41	205158	55302	11	35	95.94	67.47
2622	120	6990169	65.88	346644	61644	8	27	95.6	68.53
2623	104	7034019	65.83	212229	74293	11	33	96.43	80.99
2628	146	6885165	66.14	201890	61931	11	35	96.09	56.18
2629	143	6875899	66.16	201890	61931	10	33	96.41	50.36

2642	113	6995704	65.91	231357	66525	10	35	96.09	76.3
2922	113	6944046	65.95	231461	68376	10	34	96.19	65.15
2941	69	7035376	65.83	331206	74284	8	23	96.07	88.25
2943	73	6341237	66.41	239050	68429	9	26	92.93	52.99
2946	393	6826507	65.81	27860	9112	73	241	96.09	88.79
2956	128	6863978	66.15	341525	67766	7	25	96.29	66.31

Anexo 3. Secuencias tipo de las cepas de estudio.

Cepa	ST	Cepa	ST	Cepa	ST	Cepa	ST
56	235	808	2130	1702	111	1985	3024
70	612	990	2731	1703	111	1986	169
74	274	993	233	1777	309	1989	Novel
76	235	1038	1662	1778	111	1993	309
77	1662	1043	235	1783	111	1994	2865
78	1662	1060	233	1784	2731	2008	235
92	1662	1062	309	1785	309	2014	235
127	1662	1063	1662	1788	235	2023	233
180	309	1087	235	1803	309	2218	308
220	3205	1189	235	1815	Novel	2224	308
221	3560	1395	235	1819	309	2237	3959
249	235	1489	233	1826	569	2238	3045
250	235	1516	389	1837	569	2240	3045
264	309	1545	274	1838	776	2276	155
265	111	1553	309	1839	776	2279	155
281	309	1573	233	1841	309	2280	2731
282	Novel	1574	309	1842	Novel	2310	235
283	Novel	1590	309	1847	Novel	2355	235
296	235	1593	309	1868	111	2386	111
317	2731	1597	4010	1869	111	2447	111
318	2731	1601	309	1871	3519	2588	3045
319	2731	1609	309	1878	3519	2590	209
321	2731	1669	309	1884	2336	2594	3045
618	253	1670	675	1885	2336	2622	309
629	253	1675	675	1886	2683	2623	309
660	3045	1676	1601	1894	2683	2628	2731
665	233	1681	233	1940	169	2629	2731
787	111	1683	2731	1942	274	2642	309
788	1284	1685	309	1943	309	2922	309
789	111	1686	309	1944	309	2941	309
790	111	1687	244	1959	Novel	2943	252
805	3579	1689	244	1960	Novel	2946	309
806	1336	1690	244	1961	274	2948	309
807	3579	1701	111	1962	309	2956	2731

ST: Secuencia Tipo

Anexo 4. Número del tipo de mutaciones de las cepas.

Cepa	Tipo de mutaciones				
	COMPLEJAS	DEL	INS	MNV	SNV
56	4006	252	299	211	44859
70	1476	166	166	104	23425
74	1474	158	169	52	23255
76	4015	254	301	246	44975
77	1482	166	170	127	23626
78	1474	163	166	93	23565
92	1460	164	171	100	23559
127	1495	165	174	121	23630
180	3816	266	308	288	44713
220	1629	160	181	90	24326
221	47271	761	600	2836	143873
249	3976	251	306	357	45061
250	3991	252	310	312	45001
264	3862	263	309	257	44811
265	1954	165	206	158	25512
281	3830	271	322	334	45020
282	5212	304	366	286	53320
283	5185	311	368	361	53440
296	3995	251	304	256	44940
317	1597	186	186	104	24331
318	1641	189	189	89	24358
319	1557	175	176	77	24244
321	1604	176	181	74	24352
618	3992	263	302	296	46340
629	3957	264	310	350	46395
660	1639	186	189	132	24111
665	1750	166	173	138	25783

787	1951	163	205	122	25310
788	4155	277	307	272	46290
789	1961	166	205	159	25519
790	1938	161	201	108	25392
805	1580	170	172	142	23393
806	1469	154	168	104	22790
807	1613	174	171	139	23434
808	6999	386	359	426	66356
990	1633	188	187	114	24404
993	1778	168	175	133	25803
1038	1492	167	177	133	23640
1043	3988	255	304	334	45047
1060	1749	170	174	108	25774
1062	3845	260	304	262	44800
1063	1512	167	170	129	23671
1087	3971	251	305	330	45025
1189	4005	251	302	249	44908
1395	3995	250	303	283	44975
1489	1783	164	174	93	25703
1516	1533	173	175	98	23889
1545	1645	169	181	143	24572
1553	3832	263	309	302	44908
1573	1741	166	174	139	25788
1574	3795	263	307	319	44876
1590	3832	364	309	289	44888
1593	3829	265	306	311	44892
1597	1722	168	186	139	25614
1601	3804	266	308	321	44905
1609	3849	265	301	250	44823
1669	3815	268	309	329	44918
1670	1450	162	176	148	23237

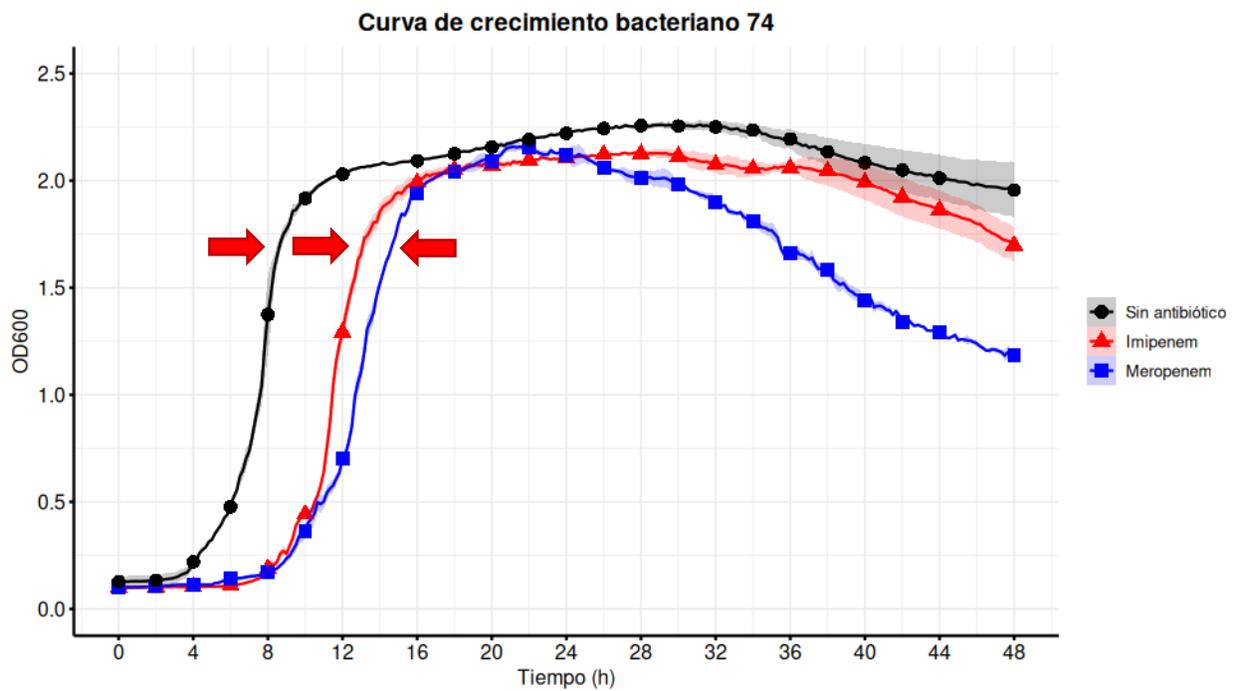
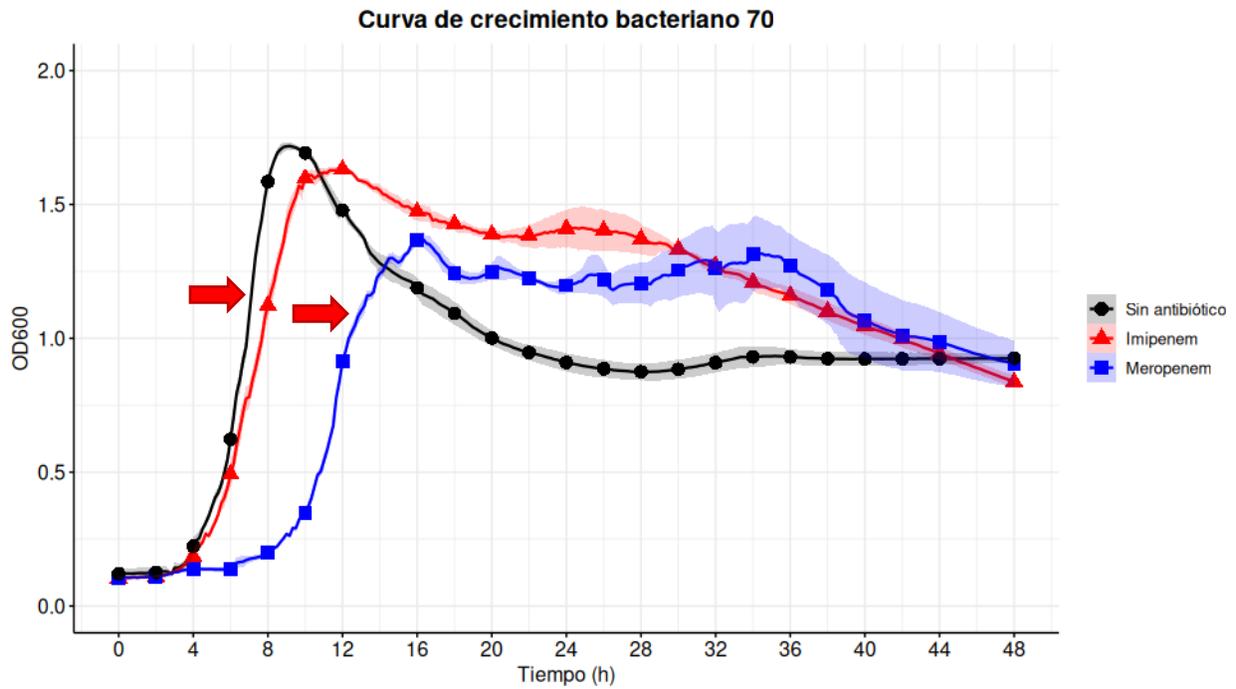
1675	1455	160	176	140	23274
1676	3971	270	293	317	44998
1681	1707	161	169	113	25574
1683	1605	185	185	108	24373
1685	3819	261	309	288	44826
1686	3736	264	305	311	44046
1687	1256	156	175	98	21088
1689	1213	147	167	75	20548
1690	2946	173	182	162	25897
1701	1968	163	204	140	25519
1702	1965	162	207	135	25489
1703	1954	162	208	133	25453
1777	3846	265	312	254	44823
1778	1963	162	204	129	25467
1783	1932	162	201	111	25411
1784	1616	187	189	133	24387
1785	3797	268	310	353	44911
1788	3994	261	298	297	45039
1803	3752	259	309	326	44204
1815	1531	165	178	119	23690
1819	3838	267	307	270	44792
1826	1527	172	195	89	23597
1837	1508	173	191	118	23611
1838	1597	169	159	163	24055
1839	1610	168	159	134	24036
1841	3838	265	306	245	44752
1842	1759	197	193	142	26329
1847	1742	189	191	163	26204
1868	1923	159	194	130	24608
1869	1870	155	193	105	24496
1871	1934	188	192	136	27412

1878	1934	194	193	148	27420
1884	1544	160	190	127	23796
1885	1540	160	187	86	23750
1886	1829	182	180	137	26363
1894	1831	184	181	140	26394
1940	1786	165	186	126	24919
1942	1523	168	176	110	23497
1943	3811	257	308	319	44915
1944	3852	260	310	300	44921
1959	43242	625	495	1070	137069
1960	47110	733	584	2257	143286
1961	1536	170	174	134	23538
1962	3808	261	304	271	44731
1985	1851	186	198	112	26640
1986	1776	165	184	132	24915
1989	3937	272	290	228	45004
1993	3687	258	302	307	43819
1994	3913	241	282	346	45140
2008	3978	250	305	276	44944
2014	3972	248	299	173	44730
2023	1741	167	173	118	25762
2218	4048	262	311	249	45729
2224	4031	264	314	270	45716
2237	1341	164	180	105	22163
2238	1608	182	180	98	24019
2240	1646	184	186	136	24157
2276	1614	179	184	96	24057
2279	1623	187	181	113	24095
2280	1623	184	191	116	24369
2310	3991	252	302	285	44976
2355	3972	250	293	178	44725

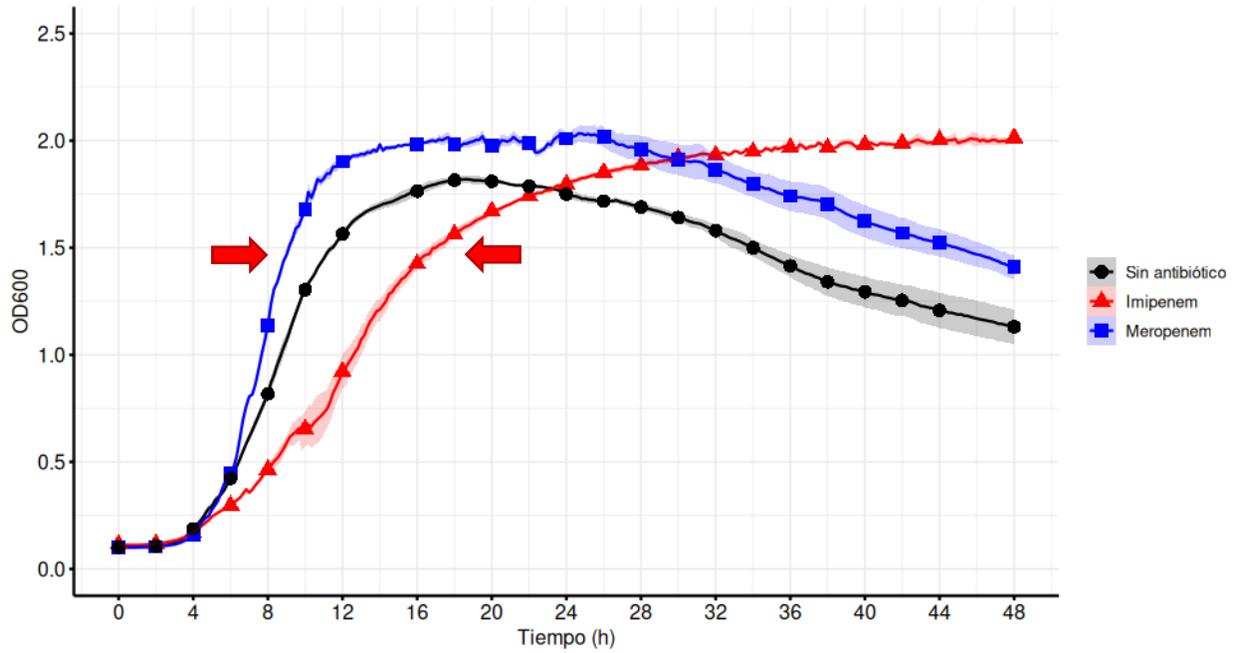
2386	1977	164	208	117	25480
2447	1913	161	200	81	25318
2588	1598	186	183	98	23979
2590	1538	177	176	122	23490
2594	1637	187	193	141	24125
2622	3812	267	308	330	44873
2623	3830	265	304	236	44731
2628	1586	183	180	76	24285
2629	1578	183	178	88	24291
2642	3826	265	307	230	44720
2922	3815	261	312	276	44793
2941	3833	262	305	318	44868
2943	1839	178	195	135	26249
2946	2836	143	165	58	37261
2948	3817	263	310	319	44865
2956	1633	183	180	84	24381

DEL: Deleciones; INS: Inserciones; MNV: Variantes de múltiples nucleótidos; SNV: Variantes de un solo nucleótido

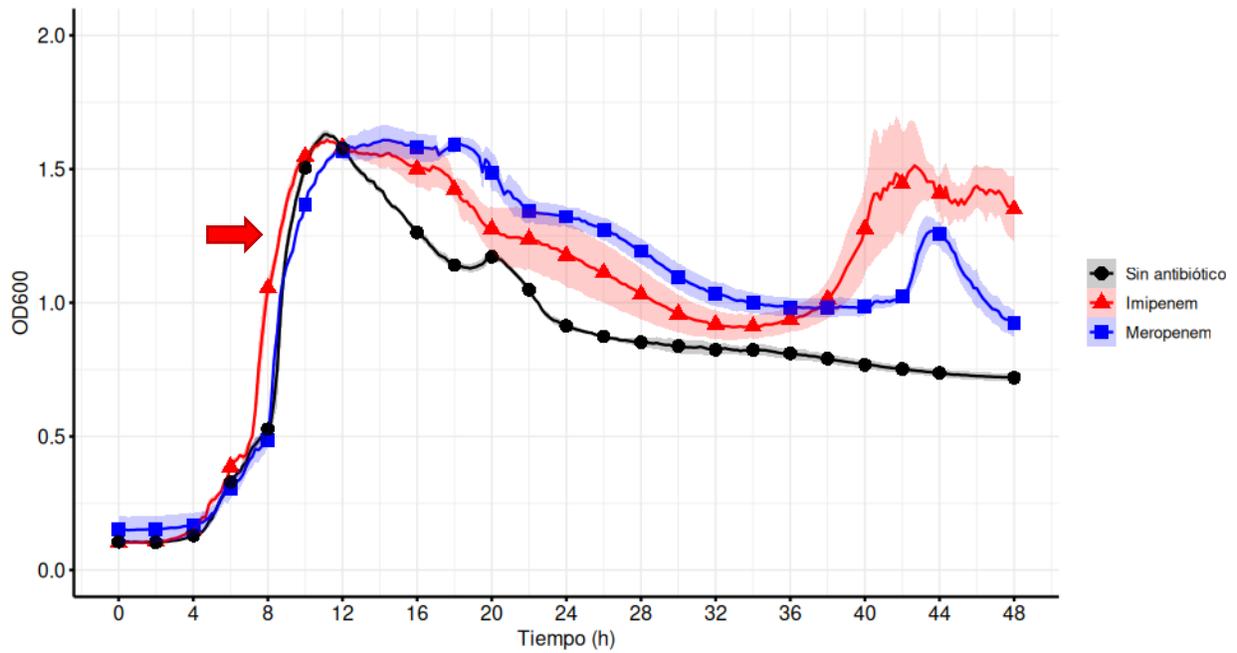
Anexo 5. Curvas de crecimiento de las cepas seleccionadas para el objetivo 4 y 5. La flecha roja indica el tiempo en el que se realizó la extracción de ARN.



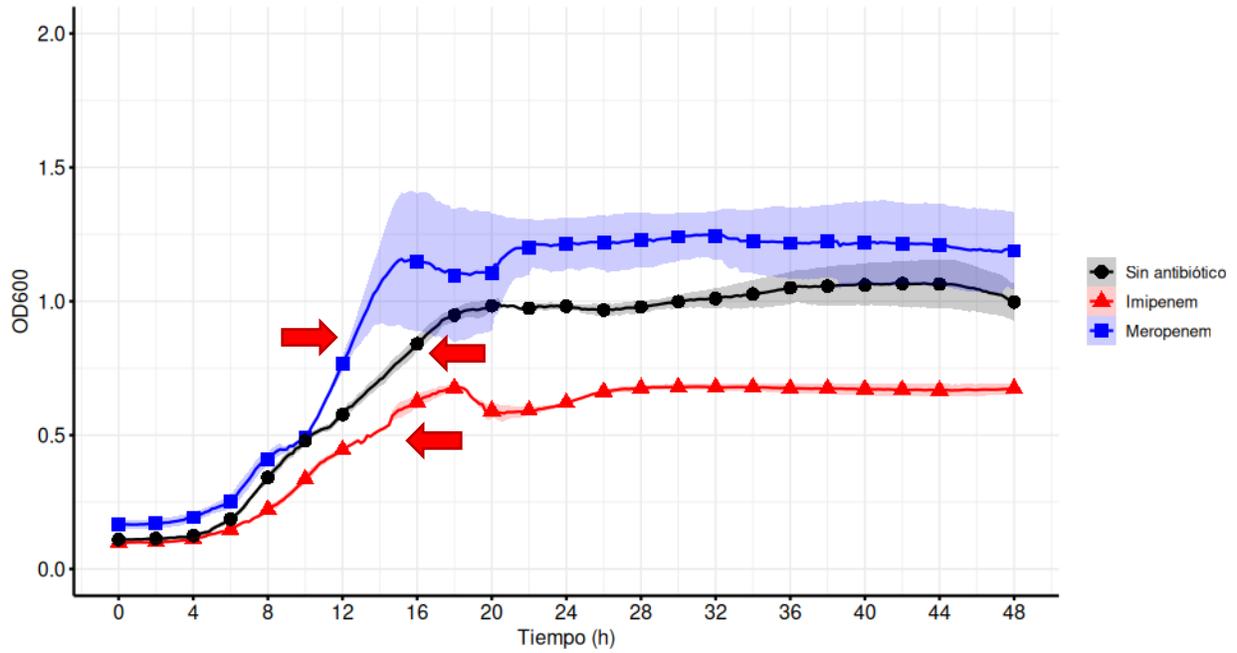
Curva de crecimiento bacteriano 221



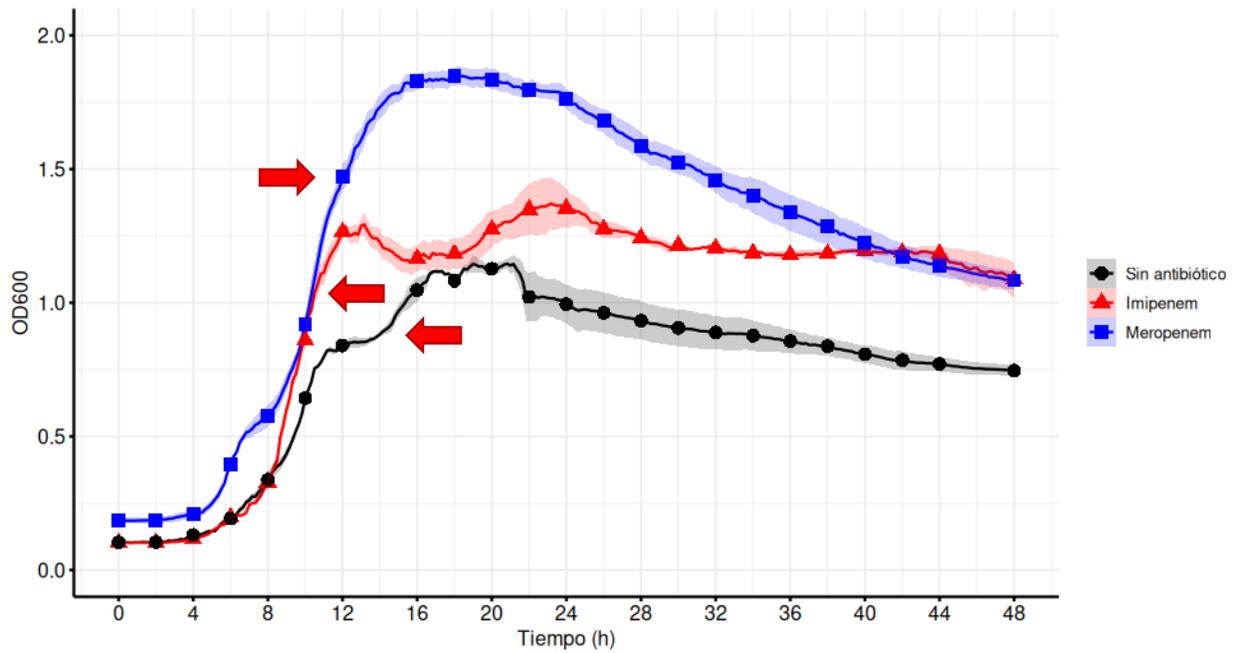
Curva de crecimiento bacteriano 281



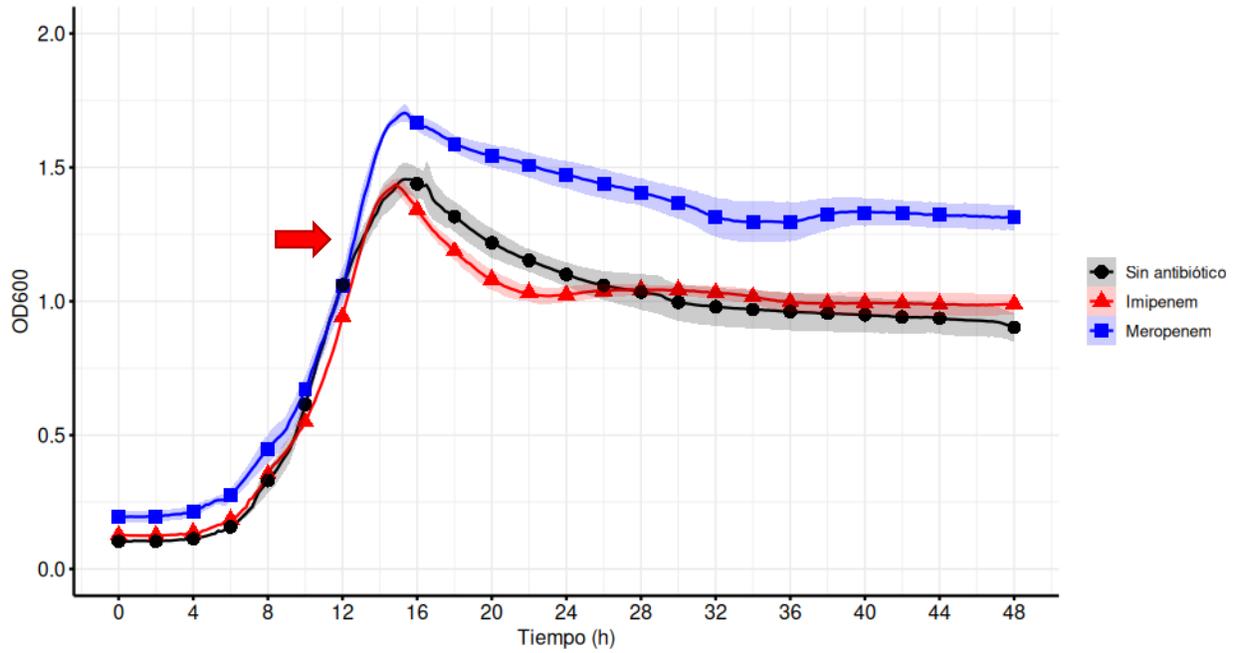
Curva de crecimiento bacteriano 318



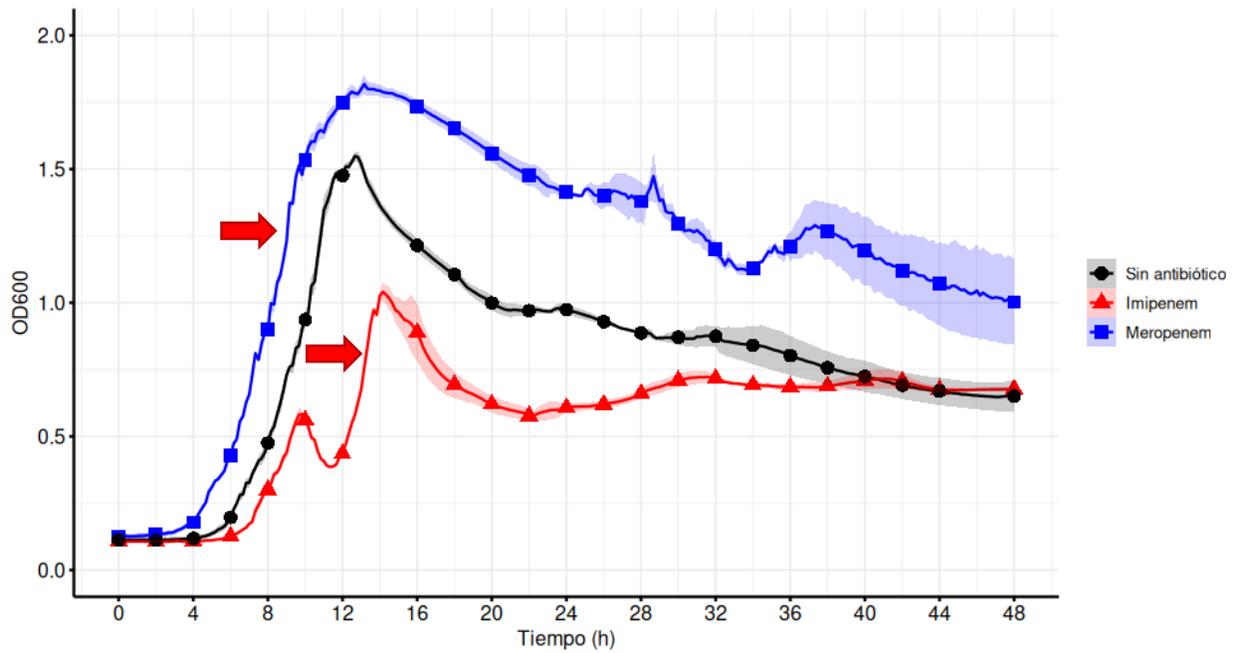
Curva de crecimiento bacteriano 787



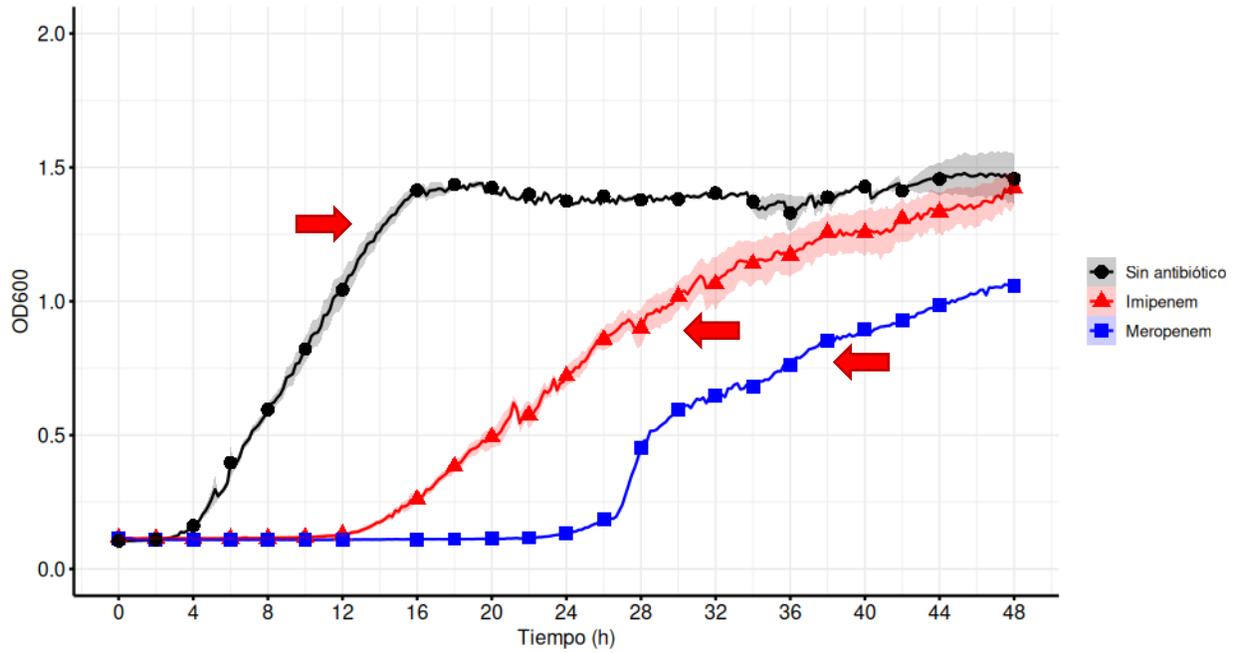
Curva de crecimiento bacteriano 990



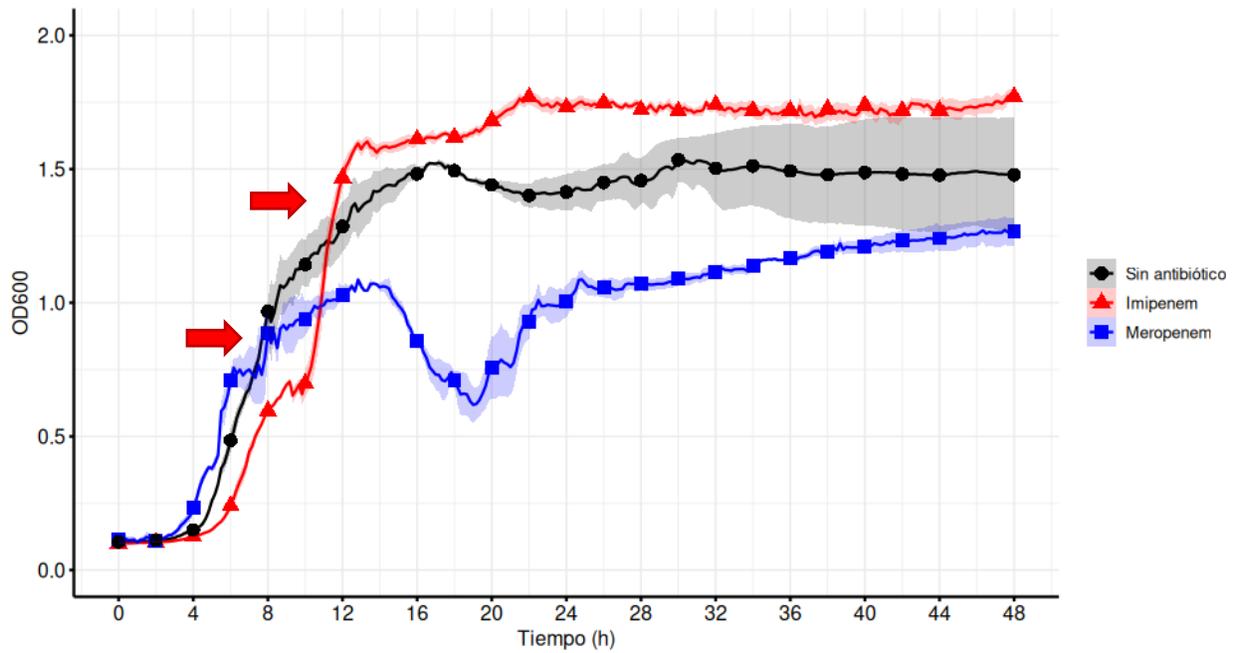
Curva de crecimiento bacteriano 1778



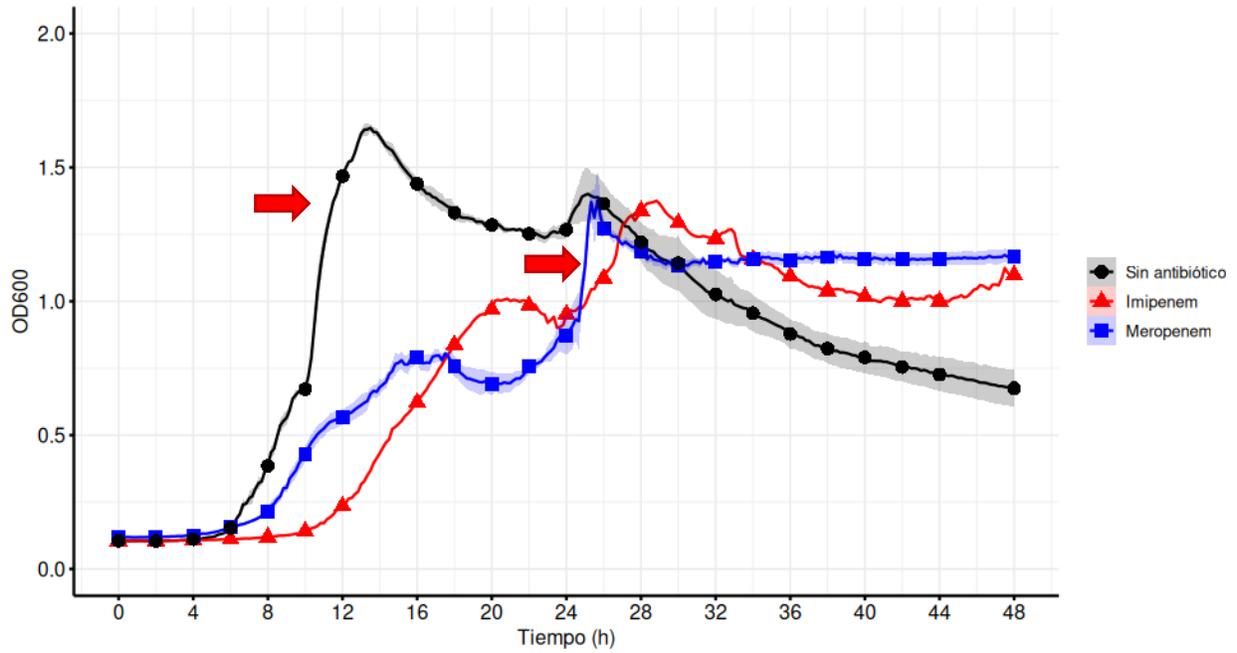
Curva de crecimiento bacteriano 1841



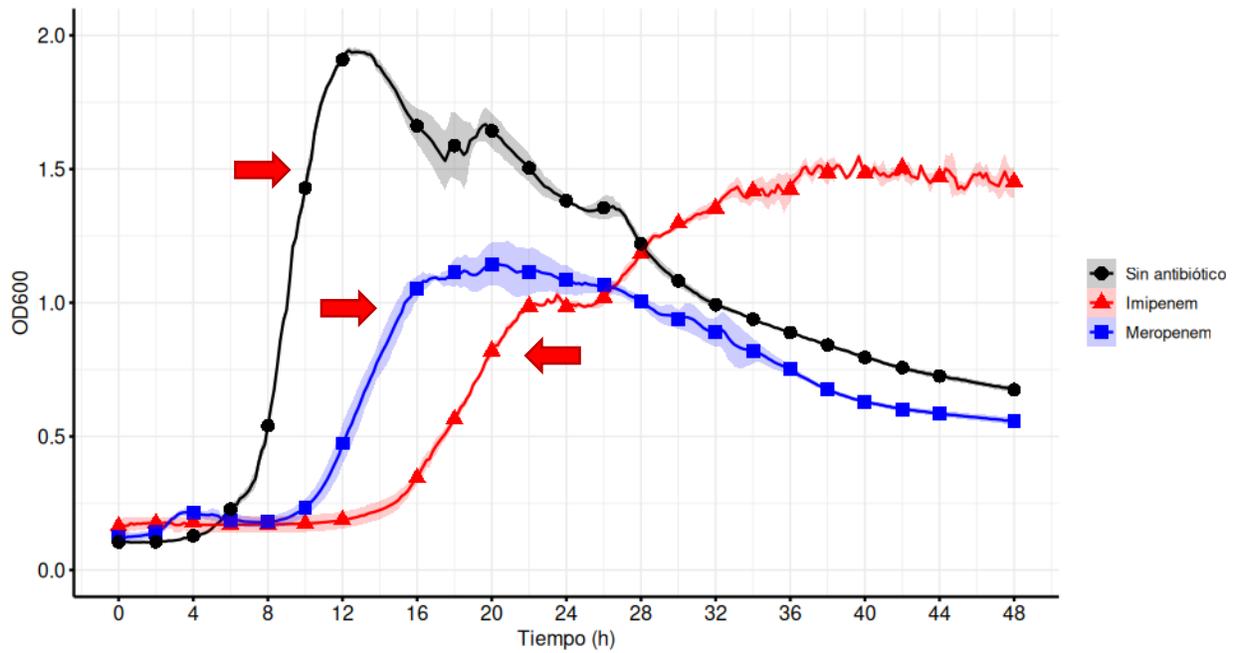
Curva de crecimiento bacteriano 1871

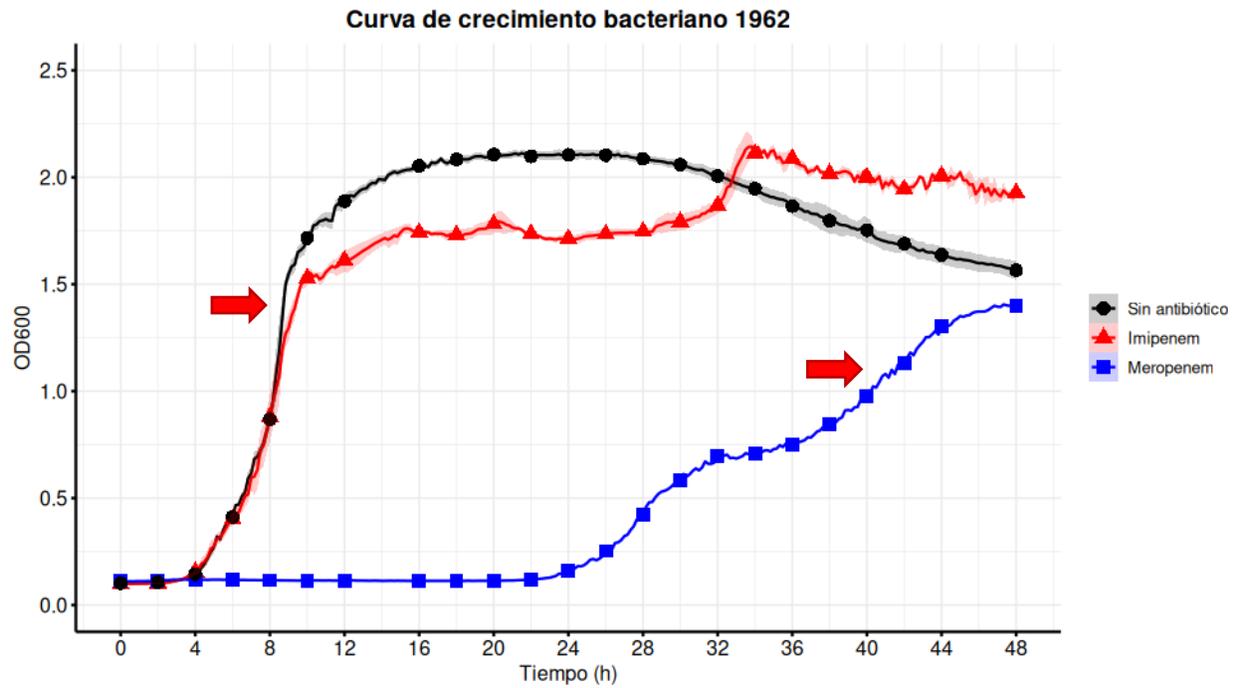
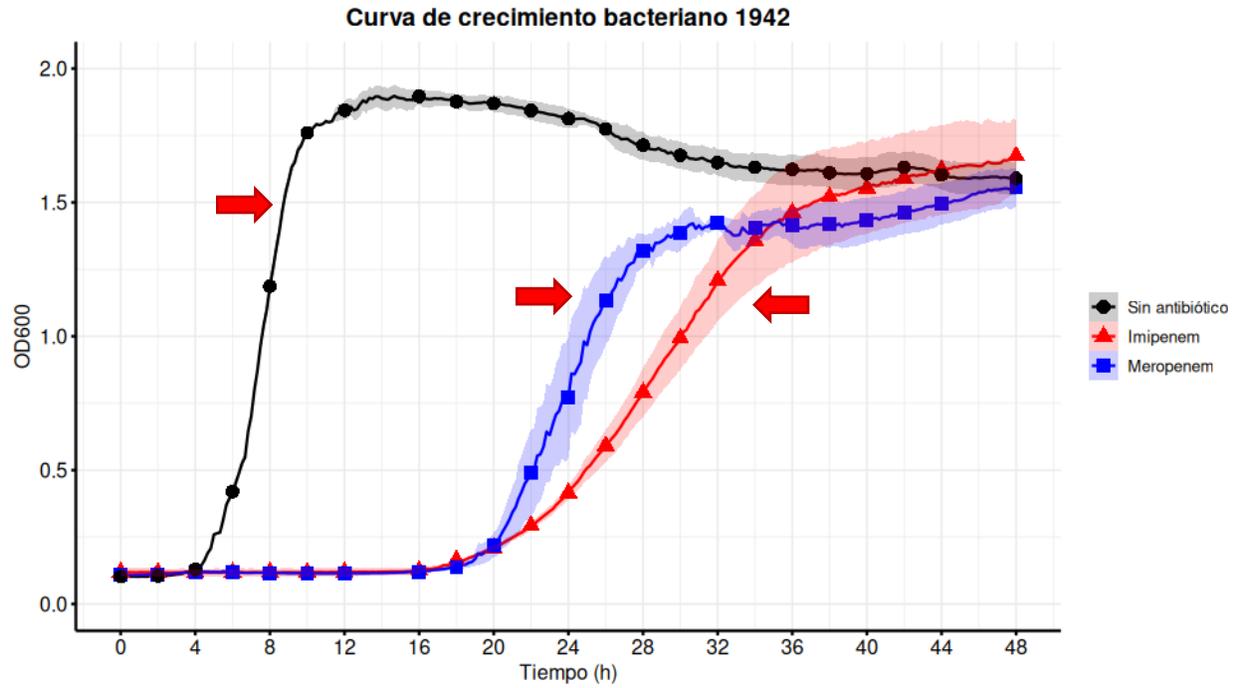


Curva de crecimiento bacteriano 1878

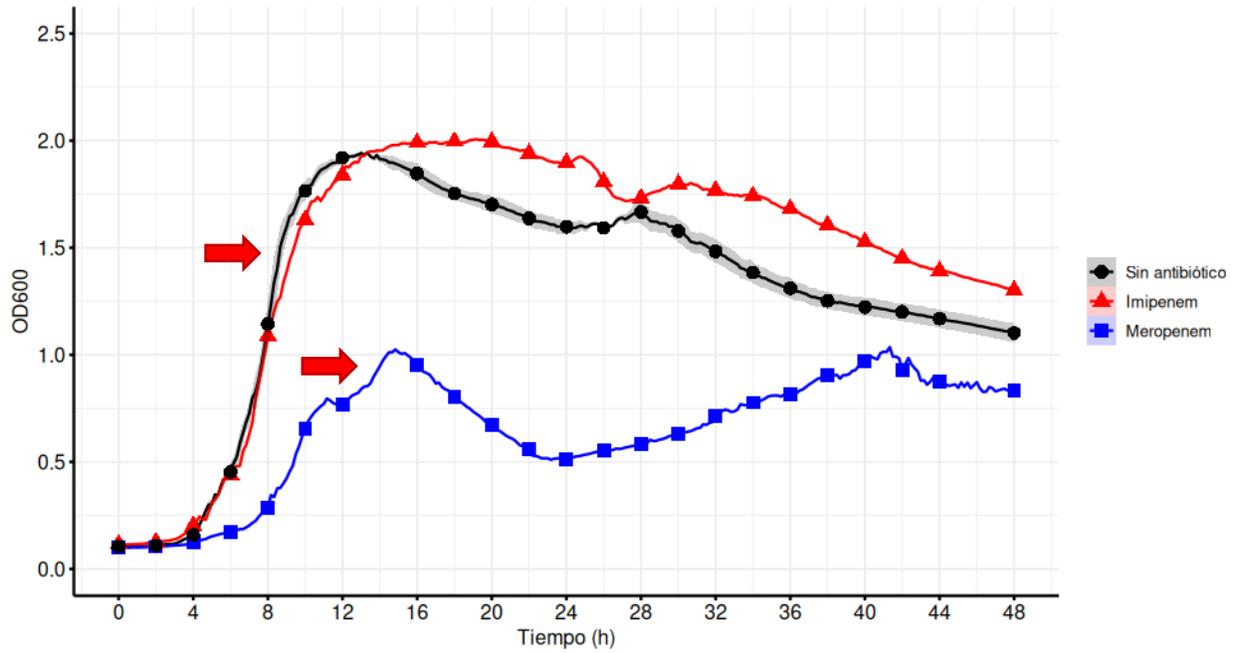


Curva de crecimiento bacteriano 1940

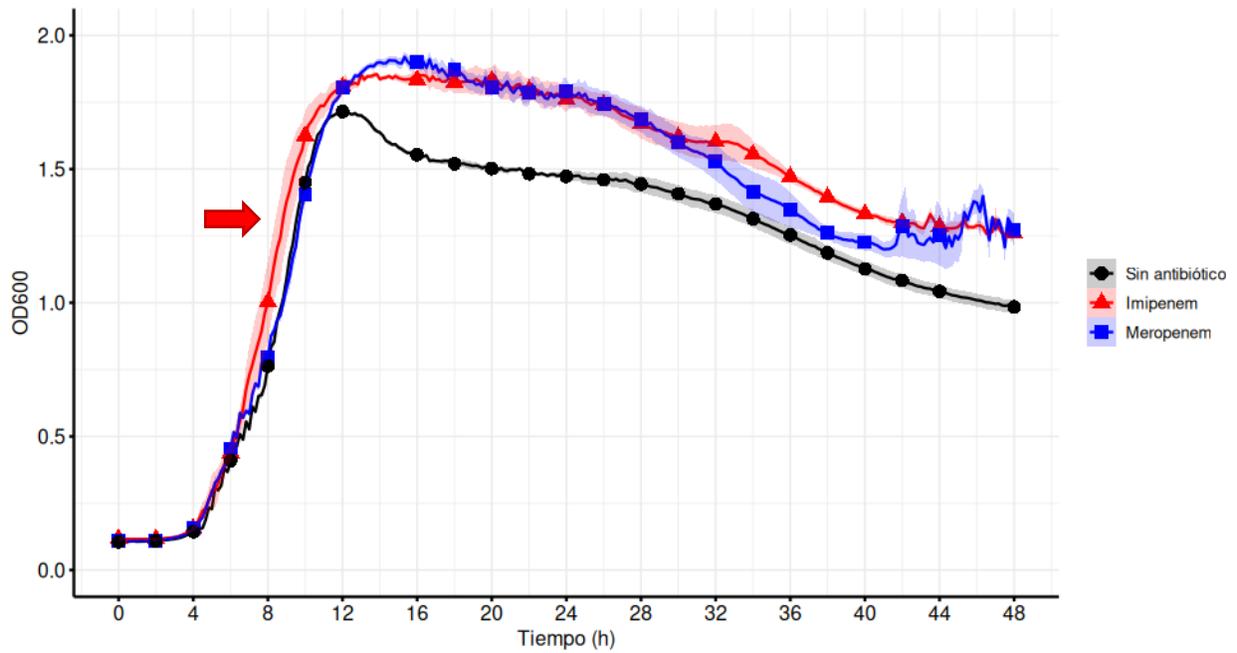




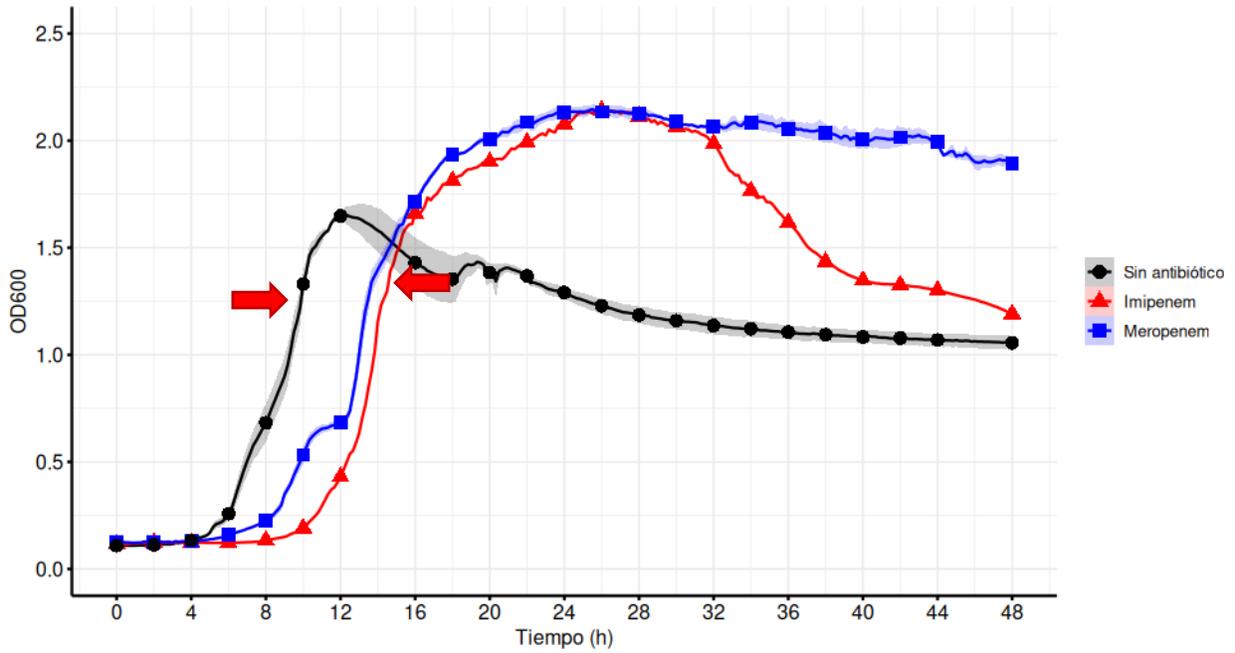
Curva de crecimiento bacteriano PAO1



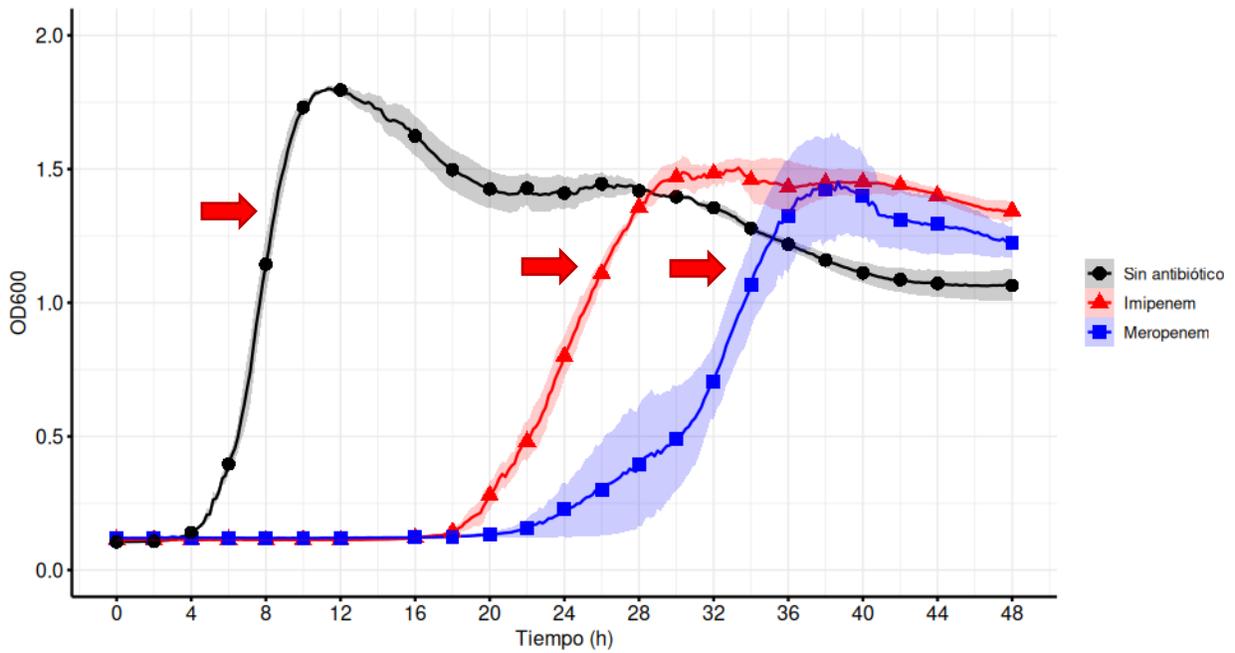
Curva de crecimiento bacteriano 92



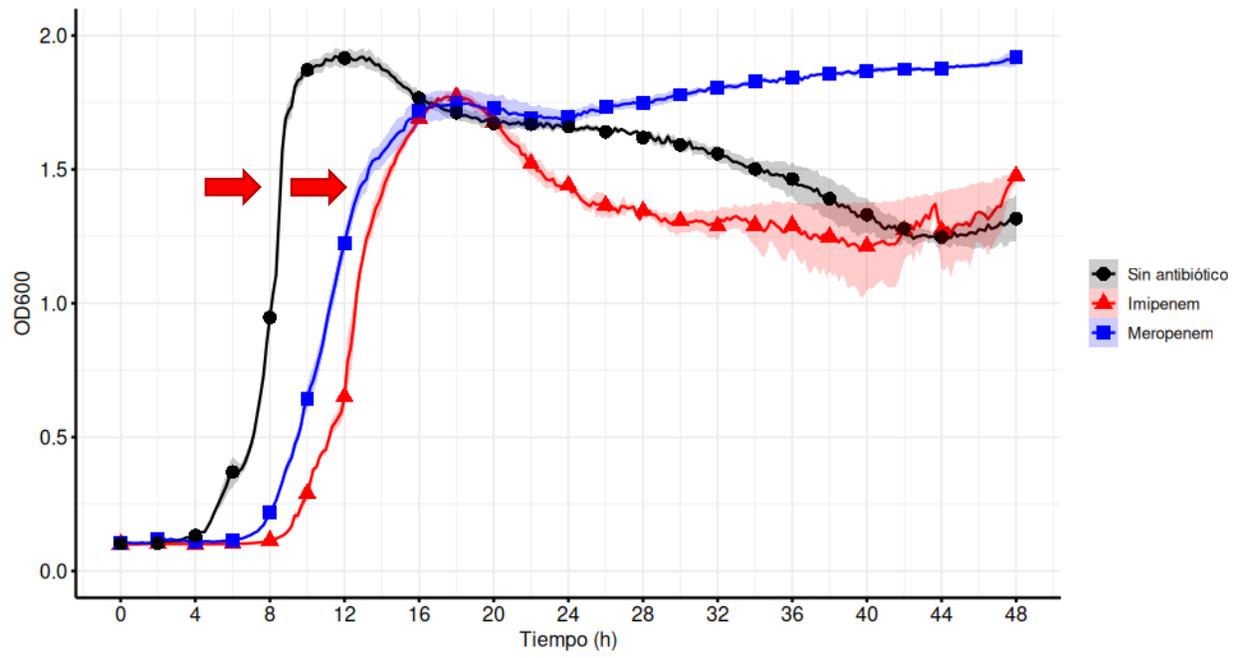
Curva de crecimiento bacteriano 2948



Curva de crecimiento bacteriano 2218



Curva de crecimiento bacteriano 1959



Anexo 6. Tasa de crecimiento específica (μ) de las cepas seleccionadas bajo tres condiciones (sin antibiótico, con imipenem y con meropenem)

Cepa	Tasa de crecimiento específica (μ)		
	Sin antibiótico	Con imipenem	Con meropenem
70	0.536133333	0.409433333	0.4752
74	0.615	0.736766667	0.4126
92	0.3118	0.333	0.276566667
221	0.273233333	0.242733333	0.110933333
281	1.0994	1.399333333	1.214133333
318	0.153833333	0.2042	0.224633333
787	0.300833333	0.5135	0.305966667
990	0.356466667	0.2413	0.251333333
1778	0.348	0.456766667	0.276666667
1841	0.1411	0.1834	0.6179
1871	0.708566667	0.4938	0.525133333
1878	0.369766667	0.2947	0.348066667
1940	0.5697	0.245333333	0.275466667
1942	0.544233333	0.178666667	0.314333333
1959	0.7061	0.4781	0.374133333
1962	0.367866667	0.368733333	0.1425
2218	0.550633333	0.2463	0.386733333
2948	0.276733333	0.5817	0.4299

Anexo 7. Crecimiento acumulado mediante área bajo la curva (AUC) de las cepas seleccionadas bajo tres condiciones (sin antibiótico, con imipenem y con meropenem).

Cepa	AUC (OD x h)		
	Sin antibiótico	Con imipenem	Con meropenem
70	45.35791667	53.88197222	45.09091667
74	87.71908333	74.87827778	64.97530556
92	56.15186111	66.08055556	64.10302778
221	63.11447222	69.08483333	74.67675
281	40.91791667	52.26891667	51.1485
318	38.43861111	25.44283333	46.55541667
787	36.64366667	48.37908333	60.20866667
990	42.48519444	42.03366667	55.52922222
1778	38.27394444	27.77580556	57.12616667
1841	55.39883333	33.63855556	19.82852778
1871	60.02747222	66.29641667	45.05830556
1878	44.12380556	37.1615	39.39405556
1940	49.46425	41.85141667	34.074125
1942	71.37397222	34.50355556	37.63508333
1959	64.81758333	51.84130556	67.30419444
1962	78.34772222	74.75605556	22.4555
2218	57.28775	37.52544444	26.54244444
2948	51.13952778	61.33313889	73.29486111

Anexo 8. Valores e interpretación del log₂FoldChange de los genes *oprD*, *mexA*, *mexC*, *mexE* y *mexY* de las cepas seleccionadas en condiciones sin antibiótico.

Cepa	log ₂ FoldChange (vs PAO1)									
	<i>oprD</i>		<i>mexA</i>		<i>mexC</i>		<i>mexE</i>		<i>mexY</i>	
70	-3.71561623	↓	4.77736092	↑	-4.13280169	↓	-4.26016045	↓	-1.093910217	↓
74	-3.1538353	↓	0.20821762	↔	-4.87830226	↓	-4.65340233	↓	-0.595111847	↔
92	-8.60172081	↓	1.83452606	↑	-2.74464862	↓	-2.97338867	↓	-4.823303223	↓
221	-7.67912483	↓	-0.6465683	↓	-5.9670016	↓	0.86230469	↔	0.010442734	↔
281	-25.7145433	↓	-10.4308729	↓	-14.2330415	↓	-13.1583719	↓	-8.17169857	↓
318	-10.5065575	↓	-0.82484245	↓	-9.85207812	↓	-2.44298172	↓	2.023485184	↑
787	-13.9439869	↓	0.30162811	↔	-6.14930217	↓	-5.73016548	↓	0.231103897	↔
990	-12.7286511	↓	-2.25992584	↓	-5.96962229	↓	-3.29986191	↓	1.824213028	↑
1778	-15.0386353	↓	2.44977951	↑	-0.93464915	↔	-3.76849747	↓	5.813581467	↑
1841	-10.903677	↓	-0.6751976	↔	-7.97065036	↓	-5.27957153	↓	2.168485641	↑
1871	-3.54179382	↓	5.77178955	↑	1.77012761	↑	-3.00298309	↓	0.672807694	↔
1878	-6.93589401	↓	3.37485313	↑	-0.75867907	↔	-5.7771759	↓	-0.144115448	↔
1940	-4.07949257	↓	-0.73848915	↔	5.15984853	↑	-1.27078247	↓	2.31439209	↑
1942	-0.43841362	↓	1.50174141	↑	-0.00820414	↔	-2.51605034	↓	-1.898233414	↓
1959	-5.55513763	↓	1.28511047	↑	1.9079984	↑	-0.53812599	↔	0.081727982	↔
1962	-9.57207108	↓	-6.79378891	↓	-4.66280619	↓	-4.25068665	↓	0.782844544	↔
2218	-5.34689903	↓	-4.06809425	↓	-2.68916766	↓	-3.57872009	↓	2.069051743	↑
2948	-15.89328	↓	-5.86594009	↓	0.65290769	↔	-2.4546814	↓	5.841890335	↑

↑: Sobreexpresión; ↓: Subexpresión; ↔: Sin cambio en la expresión

Anexo 9. Valores e interpretación del log₂FoldChange de los genes *oprD*, *mexA*, *mexC*, *mexE* y *mexY* de las cepas seleccionadas en condiciones con imipenem.

Cepa	log ₂ FoldChange (vs intracepa)									
	<i>oprD</i>		<i>mexA</i>		<i>mexC</i>		<i>mexE</i>		<i>mexY</i>	
70	-2.256097794	↓	-13.64475632	↓	2.094600677	↑	2.48840332	↑	1.933368683	↑
74	-0.285470963	↔	-0.219404221	↔	1.157125473	↑	2.880607605	↑	-0.323144913	↔
92	-2.718370438	↓	-2.728223801	↓	-2.06567955	↓	0.061306	↔	3.239421844	↑
221	-8.683279037	↓	-0.766607285	↔	-2.752151489	↓	-5.307613373	↓	-3.996192932	↔
281	9.214945793	↑	13.84749317	↑	9.781067848	↑	14.93542957	↑	11.9638586	↑
318	1.26546669	↑	2.402927399	↑	4.745029449	↑	0.76966095	↔	2.289970398	↑
787	-0.767354965	↓	-1.706817627	↓	0.173213959	↓	-0.957778931	↔	1.363603592	↑
990	1.137065887	↑	4.430028915	↑	3.840934753	↑	1.437707901	↑	0.772361755	↑
1778	1.535167694	↑	-1.096654892	↓	0.946489334	↔	0.692867279	↔	-1.676942825	↓
1841	-4.65180397	↓	3.320148468	↑	1.513835907	↑	3.782680893	↑	-0.012701035	↔
1871	-9.365066528	↓	-3.491872787	↓	-4.745014191	↑	-7.861440659	↓	3.144638062	↑
1878	1.663124084	↑	0.18469429	↔	3.207353592	↑	2.674833298	↑	1.508062363	↑
1940	-0.803155899	↓	-3.205049515	↓	-2.301193237	↑	-2.056409836	↓	-1.320962906	↓
1942	0.654981613	↔	0.779159546	↔	1.986692429	↑	1.852968216	↑	1.771621704	↑
1959	4.407709122	↑	0.285997391	↔	4.70970726	↑	5.638334274	↑	8.232328415	↑
1962	4.089994431	↑	6.069301605	↑	4.937587738	↑	1.179271698	↑	3.326639175	↑
2218	2.569217682	↑	3.045963287	↑	2.474841118	↑	4.746208191	↑	4.712173462	↑
2948	3.665594101	↑	3.816640854	↑	-0.019054413	↔	0.127407074	↔	1.877622604	↑

↑: Sobreexpresión; ↓: Subexpresión; ↔: Sin cambio en la expresión

Anexo 10. Valores e interpretación del log₂FoldChange de los genes *oprD*, *mexA*, *mexC*, *mexE* y *mexY* de las cepas seleccionadas en condiciones con meropenem.

Cepa	log ₂ FoldChange (vs intracepa)									
	<i>oprD</i>		<i>mexA</i>		<i>mexC</i>		<i>mexE</i>		<i>mexY</i>	
70	-5.577363968	↓	-7.395519257	↓	-1.239995956	↓	-1.604436874	↓	-2.062871933	↓
74	-0.7144927979	↓	1.25834465	↑	0.9544582367	↔	-2.061513901	↓	0.4740753174	↔
92	3.014120102	↑	2.107702255	↑	1.236595154	↑	1.820667267	↑	4.372432709	↑
221	11.05755711	↑	-1.387878418	↓	-7.690395355	↓	-5.781259537	↓	-7.556991577	↓
281	9.978692055	↑	0.1767911911	↔	7.286257744	↑	9.047400475	↑	10.67952061	↑
318	-0.9551944733	↓	3.760206223	↑	5.987829208	↑	1.866464615	↑	-2.295154572	↓
787	-4.96585083	↓	-0.1596794128	↔	2.007102966	↑	-1.7554245	↓	0.9441776276	↔
990	0.8927879333	↓	0.4716644287	↔	1.482383728	↑	-0.2845783234	↔	-0.9378433228	↔
1778	1.521312714	↑	-3.087915421	↓	-1.390216827	↓	-1.532007217	↓	-3.284749985	↓
1841	-6.975728989	↓	-0.002833366394	↔	-2.296253204	↓	-0.3155632019	↔	-4.14667511	↓
1871	-0.9713687897	↓	-2.816387177	↓	0.3679542542	↔	-0.4425945282	↔	-1.093618393	↓
1878	4.412214279	↑	0.01373672485	↔	3.48654747	↑	5.366752625	↑	-1.417993546	↓
1940	-1.379398346	↓	0.2207584381	↔	-2.686578751	↓	0.7698707581	↔	0.1351928711	↔
1942	-1.022880554	↓	-3.189210892	↓	-0.7982158661	↔	-2.092666626	↓	2.997198105	↑
1959	8.049646378	↑	23.46814537	↑	3.81517081	↑	1.095373154	↑	7.500471115	↑
1962	1.907766342	↑	5.101701736	↑	2.003190994	↑	2.292444229	↑	1.659858704	↑
2218	-0.1018695831	↓	2.275075912	↑	-0.9090480804	↔	0.02667617798	↔	-1.793931961	↓
2948	11.62501144	↑	4.345504761	↑	1.20614624	↑	3.584957123	↑	0.7941379547	↔

↑: Sobreexpresión; ↓: Subexpresión; ↔: Sin cambio en la expresión