



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Unidad Zacatenco

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

“Genética de poblaciones y perfiles de resistencia a antibióticos de
una colección clínica de *Pseudomonas aeruginosa*”

T E S I S

Tesis que presenta:

M. en C. Francisco Jesus Castañeda Montes

Para obtener el Grado de:

Doctor en Ciencias

En la Especialidad de:

Genética y Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Gabriel Guarneros Peña

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo con recursos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto con número 255255 y la beca de manutención otorgada por el mismo consejo a **Francisco Jesús Castañeda Montes** (CV: 288990).

Los análisis experimentales de este trabajo se realizaron en el Laboratorio 3 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección del Dr. Gabriel Guarneros Peña. Los análisis bioinformáticos se realizaron en el Laboratorio Nacional de Ciencias de la Sostenibilidad (LANCIS) del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la dirección de la Dra. Ana Elena Escalante Hernández y la Dra. Morena Avitia Cao Romero.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe

Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV-IPN

Dra. Refugio García Villegas

Departamento de Fisiología Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV-IPN

Dra. Ana Elena Escalante Hernández

Laboratorio Nacional de Ciencias de la Sostenibilidad (LANCIS) del Instituto de Ecología, UNAM.

Dra. Gloria Soberón Chávez

Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Gabriel Guarneros por la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

A mis asesores por sus valiosas aportaciones durante la escritura de la tesis.

A mis compañeros de laboratorio, quienes de forma directa o indirecta aportaron comentarios y sugerencias: Yuri, Emma, Rodo, Victor, Marco, Sandy, Ricardo, Irais, Omar y Adrián etc.

A Gaby Mora por su apoyo incondicional en la parte administrativa.

Sobre todo, agradezco a mi familia: **mamá y hermanos**, especialmente a **Indi**, por todo el apoyo que siempre me han dado en esta etapa de mi formación académica y profesional.

Tabla de contenido

ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	1
1.2 DETERMINANTES DE VIRULENCIA.....	2
1.2.1 PIGMENTOS PIOCIANINA Y FLUORESCÉINA.....	2
1.2.2 SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III.	3
1.2.3 EXOTOXINAS EFECTORAS A, S Y T.	4
1.2.4 BIOFILM.....	4
1.3 VERSATILIDAD GENÓMICA DE <i>P. AERUGINOSA</i>	5
1.4 ASPECTOS CLÍNICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS.....	6
1.4.1 FIBROSIS QUÍSTICA (FQ) Y <i>P. AERUGINOSA</i>	7
1.5 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.	7
1.5.1 MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.	8
1.5.2 MULTIRRESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y DATOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	10
1.6 FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN MÉXICO Y OTROS PAÍSES EN DESARROLLO.....	12
1.7 GENÉTICA DE POBLACIONES DE BACTERIAS PATÓGENAS.	14
1.7.1 FUNDAMENTOS DE LA GENÉTICA DE POBLACIONES BACTERIANAS.....	17
1.7.2 RECOMBINACIÓN Y MUTACIÓN EN <i>P. AERUGINOSA</i>	18
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS	22
4.1 OBJETIVO GENERAL.	22
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS	23

5.1	DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA DE ESTUDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO.	23
5.2	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.	23
5.2.1	SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS.	23
5.3	CARACTERIZACIÓN GENÉTICA.	25
5.3.1	ELECTROFORESIS EN GEL DE CAMPOS PULSADOS (PFGE).	25
5.3.2	EXTRACCIÓN DE DNA Y AMPLIFICACIÓN POR PCR.	26
5.4	ANÁLISIS DE DIVERSIDAD GENÉTICA.	28
5.4.1	DETERMINACIÓN DE COMPLEJOS CLONALES (CCS).	28
5.4.2	ANÁLISIS FILOGENÉTICO.	29
5.4.3	DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA.	29
5.4.4	DETERMINACIÓN DE LAS RELACIONES AMBIENTALES.	30
5.5	ANÁLISIS EVOLUTIVOS.	30
5.5.1	ANÁLISIS DE RECOMBINACIÓN Y MUTACIÓN.	30
5.5.2	DIVERSIDAD NUCLEOTÍDICA Y PRUEBAS DE NEUTRALIDAD.	31
6.	RESULTADOS.	32
6.1	LOS AISLADOS MEXICANOS DE <i>P. AERUGINOSA</i> SON CLONALES, SIN EMBARGO, REPRESENTAN UNA MUESTRA DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA A NIVEL GLOBAL.	32
6.2	LA ESTRUCTURA GENÉTICA ESTÁ RELACIONADA A DIFERENTES NIVELES DE RECOMBINACIÓN Y NO A FACTORES AMBIENTALES.	35
6.3	DIVERSIDAD NUCLEOTÍDICA Y PRUEBAS DE NEUTRALIDAD.	38
6.4	ÁISLADOS RESISTENTES A TODOS LOS FÁRMACOS (PDR, PAN-DRUG RESISTANT) FUERON IDENTIFICADOS EN LAS MUESTRAS DE ESTUDIO.	39
7.	DISCUSIÓN.	41
7.1	AMPLIA DIVERSIDAD GENÉTICA SIMILAR A LA ENCONTRADA A NIVEL GLOBAL.	41
7.2	ESTRUCTURA GENÉTICA EN TRES FILOGRUPOS CON DIFERENTES FRECUENCIAS DE RECOMBINACIÓN Y MUTACIÓN.	42
8.	CONCLUSIONES.	45
9.	PERSPECTIVAS.	47
10.	REFERENCIAS.	48
11.	MATERIAL SUPLEMENTARIO.	67
ANEXO	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de eBURST que muestra un análisis comparativo entre muestras mexicanas y la base de datos MLST de <i>P. aeruginosa</i>	32
Figura 2. Análisis concentrado de los 158 aislados de <i>P. aeruginosa</i>	34
Figura 3. Árbol consenso de ClonalFrame utilizando los 158 STs de la muestra de <i>P. aeruginosa</i> y siete <i>loci</i> concatenados (2882 pb).....	36
Figura 4. Análisis AdaptML de 158 aislados de <i>P. aeruginosa</i>	37
Figura 5. Resistencia a antibióticos de 158 aislamientos de <i>P. aeruginosa</i>	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Procedencia de los 158 aislados de <i>P. aeruginosa</i> analizados en este estudio.....	23
Tabla 2. Antibióticos utilizados en este estudio.....	24
Tabla 3. Clasificación de los perfiles de resistencia.....	24
Tabla 4. Primers utilizados para la amplificación por PCR.....	26
Tabla 5. Primers utilizados para la secuenciación de los productos de PCR.....	27
Tabla 6. Resumen estadístico para la diversidad nucleotídica genética y parámetros de neutralidad para cada población en cada <i>locus</i>	38
Tabla Suplementaria S1	65

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es uno de los patógenos más importantes a nivel mundial. La genética de poblaciones ha demostrado que de *P. aeruginosa* tiene una estructura epidémica con complejos clonales altamente conservados. En países en desarrollo, los estudios epidemiológicos de *P. aeruginosa* han sido ausentes o poco frecuentes. En estos países, diferentes tratamientos médicos, condiciones e infraestructura pueden tener un impacto en la dinámica de la población y evolución, incluyendo las resistencias a antibióticos. En este estudio analizamos 158 aislados de *P. aeruginosa* que corresponde a la colección más extensa de aislados clínicos procedentes de la Ciudad de México. Se determinó la estructura genética de la muestra de estudio a través de la técnica MLST (por sus siglas del inglés *Multi Locus Sequences typing*) además se analizó la resistencia a antibióticos, una de las preocupaciones asociadas a este patógeno. Por una parte, nuestros resultados concuerdan con estudios previos sobre la estructura epidémica de *P. aeruginosa*, así como con la existencia de tres principales filogrupos los cuales no están relacionados con los parámetros ambientales. Por otro lado, los perfiles de resistencia a antibióticos indican una mayor prevalencia de resistencia a múltiples antibióticos (72,78%), extremadamente resistente a antibióticos (17,72%) y pan resistente a antibióticos (9,49%) comparada con las resistencias observadas en países desarrollados. Es importante reflexionar sobre las causas que hacen que los países menos desarrollados tengan mayores resistencias a antibióticos. Por ejemplo, aspectos multifactoriales sociopolíticos que incluyen, pero no se limitan a, la implementación y aplicación de políticas públicas con respecto al acceso a antibióticos, así como la educación del personal de salud y otros obstáculos relacionados con la pobreza y el acceso desigual a los servicios y la información de salud.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is one of the most important pathogens worldwide. Population genetics studies have shown that the *P. aeruginosa* population has an epidemic structure with highly conserved clonal complexes. Nonetheless, epidemiological studies of *P. aeruginosa* have been historically absent or infrequent in developing countries, in which different medical treatments, conditions and infrastructure may have an impact in population dynamics and evolutionary outcomes, including antibiotic resistance profiles. In this study we contribute to fill this gap by analyzing 158 *P. aeruginosa* isolates from the most extensive nosocomial collection in Mexico City. We investigated the population genetic structure through a MLST approach together with a classical microbiology antibiotic resistance profiling, one of the associated concerns in the evolution of this pathogen. On the one hand, our results are in accordance with previous studies on the epidemic structure of *P. aeruginosa*, as well as the existence of three main phylogroups, that are not related to environmental parameters. On the other hand, antibiotic resistance profiles indicate higher prevalence in our sample of multi drug resistant (72.78%), extremely drug resistant (17.72%) and pan-drug resistant (9.49%) than resistance reported in developed countries. It is important to reflect on the causes that make less developed countries hotspots of antibiotic resistance, considering the multifactorial aspects of the socio-political context of such countries that include, but are not restricted to, public policy implementation and enforcement regarding access to antibiotics, as well as health care personnel education and other obstacles related to poverty and unequal access to health services and information.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADPRT: dominio ADP-ribosiltransferasa

AMK: amikacina

ARNr: ARN ribosomal

AUG: amoxicilina-ácido clavulánico

CAZ: ceftazidima

CFTR: Proteína Transmembranal Reguladora de la Fibrosis Quística

CDC: por sus siglas del inglés, *Centers for Disease Control and Prevention*

CEF: cefepima

CIP: ciprofloxacina

CRO: ceftriaxona

EARS-Net: por sus siglas del inglés, *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*

ECDC: por sus siglas en inglés, European Center for Disease Prevention and Control

ESBL: plásmidos Beta-lactamasas de espectro extendido

FQ: Fibrosis Quística

GEN: gentamicina

IMP: imipenem

MBL: metalo- β -lactamasas

MEM: meropenem

MDR: por sus siglas del inglés, *multi drug resistant*

MIC: Concentración Mínima Inhibitoria

MLST: por sus siglas en inglés, Multilocus Sequence Typing

MXF: moxifloxacina

OFX: oxifloxacina

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBP-1: proteína de unión al receptor activado por el proliferador de peroxisoma (PPAR)

PDR: por sus siglas en inglés, pan drug-resistant

PIP: piperacilina

PT: pulsotipo

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido

SUP: piperacilina-sulbactam

SXT: trimetoprima-sulfa-metoxazol

TGC: tigeciclina

TIC: ticarcilina-ácido clavulánico

TOB: tobramicina

XDR: por sus siglas del inglés, *extremely drug resist*

1. Introducción.

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas es uno de los géneros bacterianos más fascinantes y de gran interés médico, agrícola y biotecnológico, ya que está constituido por especies bacterianas que presentan un amplio rango de fenotipos y capacidades bioquímicas (Guttman et al., 2008). *Pseudomonas aeruginosa* es una gram-proteobacteria, Gram-negativa, aerobia y es considerada como el principal miembro de este género (Silby et al., 2011).

Etimológicamente, *Pseudomonas* significa “falsa unidad”, del griego *pseudo*, que significa “falso”, y *monas*, que significa “unidad simple”. *P. aeruginosa* es fácilmente cultivable en condiciones aeróbicas en medios de cultivo como el agar sangre y el agar MacConkey. Algunos aislados presentan placas autolíticas y betahemólisis en agar sangre. *P. aeruginosa* presenta un color característico azul-verdoso de ahí el nombre de *aeruginosa* que significa “el color cobre oxidado” (Mandell et al., 2010). Este color azul-verdoso es ocasionado por pigmentos fluorescentes como pioverdina (pigmento amarillo-verdoso) y piocianina (pigmento azul). Además, La mayoría de las cepas presentan un olor característico similar a la fruta madura (Ausina et al., 2006).

P. aeruginosa se caracteriza por presentar determinantes antigénicos constituidos por el lipopolisacárido-O unido a un lípido-A mediante un oligosacárido. El polisacárido-O presenta una gran heterogeneidad serológica, siendo los serogrupos O6 y O11 los aislados más comunes. En raras ocasiones se han reportado aislados pertenecientes al serogrupo O12 (García-Rodríguez et al., 1996; Murray et al., 2003)

P. aeruginosa es una bacteria metabólicamente versátil debido a que produce ácidos a partir de azúcares como fructosa, glucosa, sacarosa y lactosa. Aunado a

esto, gran parte de su versatilidad también radica en la mínima necesidad de requerimientos nutricionales, por lo cual es fácil cultivarla en el laboratorio en medios de cultivo comunes anteriormente mencionados. Estas características le permiten colonizar diferentes ambientes (agua, suelo, rizósfera, animales y humanos) (Pirnay et al., 2002; Silby et al., 2011). Además, *P. aeruginosa* es capaz de expresar una gran variedad de determinantes virulentos causando infecciones a entidades biológicas tales como plantas (Rahme et al., 1997), nemátodos (Tan and Ausubel, 2000) e insectos (Mulcahy et al., 2011).

1.2 Determinantes de virulencia.

P. aeruginosa puede causar infecciones debido a los múltiples factores de virulencia que expresa y que le permiten prolongar su adherencia a distintas superficies celulares para la exitosa colonización. Algunos de los factores más importantes de este patógeno son los pigmentos piocianina y fluoresceína (o pioverdina), el sistema de secreción tipo III, las exotoxinas A, S y T, y su capacidad de formar Biofilm (Rahme et al., 1997). A continuación, se abordará brevemente cada uno de estos.

1.2.1 Pigmentos piocianina y fluoresceína.

La piocianina es un pigmento azul, hidrosoluble y no fluorescente. Su contribución en el proceso infeccioso se debe a que es un componente redox que atraviesa las membranas celulares oxidando nucleótidos como el NADPH y generando especies reactivas del oxígeno (ROS por sus siglas del inglés: *reactive oxygen species*) sometiendo a la célula a estrés oxidativo. Un ejemplo son las células del epitelio respiratorio, las cuales sufren disminución en su capacidad de cicatrización y de expulsión de las bacterias inhaladas, lo que ocasiona aumento en la producción de mucus. Las ROS inducen la síntesis de los genes *Muc2* y *Muc5aC*

en la célula hospedera, aumentando la producción del mucus, obstruyendo las vías respiratorias y, como consecuencia, favoreciendo la infección. A largo plazo, las ROS producen la activación del factor NF- κ B, dando lugar a la transcripción de múltiples genes que codifican distintas moléculas proinflamatorias tales como IL-8 o LTB₄, estas actúan como atrayentes de neutrófilos, los cuales, en gran cantidad, dañan el epitelio respiratorio (**Rada B and Leto 2012**).

Por otra parte, la fluoresceína o también conocida como pioverdina es un pigmento de color amarillo, hidrosoluble y fluorescente. Este es un sideróforo que está constituido por una cadena peptídica variable y un cromóforo. Tiene la capacidad de quelar al Fe³⁺, el cual es un metal importante en la nutrición de *P. aeruginosa*. Este pigmento puede desenlazar este metal de la transferrina. Su contribución a la infección se debe a que el Fe³⁺ está presente en muy bajas concentraciones en los medios en los que crece *Pseudomonas aeruginosa*, como son los medios oxigenados, por lo cual, quela al Fe³⁺ para aprovecharlo (**Cornelis and Dingemans 2013**).

1.2.2 Sistema de Secreción Tipo III.

El sistema de secreción tipo III es un complejo macromolecular constituido por: (i) un sistema de secreción o *Needle Complex* (“forma de aguja”), (ii) el Sistema de translocación y (iii) las toxinas efectoras. Su función durante la infección es transmitir toxinas desde la bacteria hacia el citosol de la célula hospedera. A su vez, el *Needle Complex* está formado por el cuerpo basal y el inyectisoma. El primero es intracelular y está formado por las membranas externas e internas de la bacteria, así como por peptidoglicano. En la membrana externa se encuentran las secretinas (PscC) que forman poros en dicha membrana. Este cuerpo basal lleva las toxinas efectoras desde el citosol bacteriano a la célula blanco por el inyectisoma, un sistema con forma de aguja que transporta las toxinas hasta el sistema de translocación formando un poro en la membrana de la célula hospedera gracias a

las proteínas PopB, PopD y PcrV, insertándose y transmitiendo las toxinas directamente al citosol (**Galle et al., 2012**).

1.2.3 Exotoxinas efectoras A, S y T.

La exotoxina A es una enzima mono-ADP-ribosiltransferasa que afecta la síntesis de proteínas mediante la ribosilación de ADP del factor 2 de elongación ribosomal. La exotoxina A se libera como pro-enzima, y es activada mediante proteólisis (llevada a cabo por la endoproteasa furina) al entrar en la célula hospedera. (**Ramachandran, 2014**). Las exotoxinas S (ExoS) y T (ExoT) poseen un dominio GAP y un dominio ADPRT, el cual tiene actividad ADP ribosilasa. El dominio GAP (por sus siglas del inglés: GTPase-activating protein) da la facultad de inactivar a las GTPasas Rho, a Rac y a Cdc42, causando la desorganización del citoesqueleto de actina y provocando la fagocitosis de la célula. De esta manera, las ExoT y ExoS desorganizan el citoesqueleto de actina, provocando apoptosis celular y retrasando de la curación de heridas (**Galle et al., 2012**).

1.2.4 Biofilm.

Las biopelículas o *biofilms*, son una estructura simple constituida por una matriz extracelular de polímeros homopolisacáridos y heteropolisacáridos tales como el ácido algínico o alginato en aislados mucoides y los exopolisacáridos Psl (principal azúcar la manosa) y Pel (principal azúcar la glucosa) en aislados no mucoides. Su formación consta de tres procesos: adhesión, agregación celular y secreción de la matriz de polisacáridos (**Lavery et al., 2014**). Estas biopelículas permiten la adhesión de las colonias bacterianas a las superficies celulares de las células hospederas, lo que favorece tanto la colonización debido a que las protege de los antimicrobianos, así como la permanencia de la infección. Además de permitir la adhesión hacia las superficies celulares, los biofilms de *P. aeruginosa* tienen elevada afinidad por el plástico, tal y como se ha demostrado en los estudios “in vitro”. Esta característica le permite adherirse al instrumental médico como:

catéteres, sondas etc., favoreciendo el desarrollo de focos de infección nosocomial (Laverty et al., 2014).

1.3 Versatilidad genómica de *P. aeruginosa*.

P. aeruginosa presenta tres características clave que le permiten ser un patógeno exitoso: (i) es versátil, es decir que puede adaptarse fácil y rápidamente a cambios ambientales; (ii) es cosmopolita, significa que puede vivir en múltiples ambientes; y (iii) es resistente, tanto a factores medioambientales como a antimicrobianos (Pirnay et al., 2002; Rahme et al., 1997). La capacidad de adaptación se debe a la batería de genes que presenta, por lo que su versatilidad no solo se observa en su fenotipo, si no que también a nivel genómico (Spiers et al., 2000).

P. aeruginosa presenta genomas de tamaño variable, de 5 a 7 mega pares de bases (Mpb) aproximadamente (Moradali et al., 2017). Por ejemplo, el genoma de la cepa PAO1, el primer genoma de *P. aeruginosa* en secuenciarse, esta constituido por 6.2 Mpb (Silby et al. 2011), mientras que el genoma de la cepa MH19 constituido por 7.1 Mpb (Vorhölter et al., 2015).

Como muchos otros genomas bacterianos, el genoma de *P. aeruginosa* presenta regiones genómicas conservadas y otras no conservadas (genes accesorios). Sin embargo, en muchos aislados de *P. aeruginosa* se presentan genes accesorios específicos de cada aislado (Mathee et al., 2008). También se ha observado que *P. aeruginosa* cuenta con la mayor proporción de genes reguladores observados en genomas bacterianos (Stover et al., 2000; Frimmersdorf et al., 2010). Estos genes son originados por la adquisición y eliminación de segmentos genómicos (Mathee et al., 2008); la ganancia y pérdida de estos segmentos, es causada por la transferencia horizontal de genes procedentes de plásmidos, transposones, islas genómicas y bacteriófagos. Por lo tanto, *P. aeruginosa* puede modificar su genoma para adquirir la capacidad de responder y adaptarse a diversos entornos (Mathee et al., 2008).

1.4 Aspectos clínicos y epidemiológicos.

P. aeruginosa es considerada un patógeno ubicuo asociado a graves infecciones nosocomiales, siendo así uno de los patógenos nosocomiales más importantes a nivel mundial. Esto es ocasionado por la facilidad que posee de adaptarse a diversos ambientes y causar infecciones en diversas entidades biológicas (**Agodi et al., 2007**). En USA, *P. aeruginosa* es responsable de 6,700 casos de infección al año, de los cuales 440 se derivan en muertes (<https://www.cdc.gov>, consultado en diciembre 2017). Las infecciones causadas por *P. aeruginosa* son principalmente adquiridas por pacientes sometidos a ventilación mecánica, tratamiento con antibióticos, quimioterapia o cirugía; así como las asociadas a individuos inmunodeprimidos (**Berthelot et al., 2001**). *P. aeruginosa* puede infectar heridas, quemaduras, huesos, sangre, (**Pirnay et al., 2009**). Además, diferentes estudios han resaltado importantes factores que contribuyen a infecciones por *P. aeruginosa*. Por ejemplo, este patógeno puede transmitirse de un entorno clínico a otro, de persona a persona, por transmisión indirecta a través de manos contaminadas, a través de catéteres, soluciones de irrigación, y por uso de antisépticos diluidos y soluciones de limpieza (**Corona-Nakamura et al., 2001; Thuong et al., 2003; Yetkin et al., 2006; Agodi et al., 2007; Zhang et al., 2012; Cies et al., 2015**).

Las infecciones de *P. aeruginosa* no hospitalaria también están relacionadas a la exposición a entornos húmedos. Por ejemplo, baños calientes, hidromasajes, piscinas e infecciones oculares por uso prolongado de lentes de contacto. Cuando se encuentra en ambientes acuosos, *P. aeruginosa* tiende a formar biopelículas que no permiten la entrada de los antibióticos. Esta característica es de gran importancia ya que le permite prevalecer en casi cualquier equipo clínico o utensilio, provocando así el aumento de focos de infección y su propagación. (**Boyd and Chakrabarty, 1995; Berthelot et al., 2001**).

1.4.1 Fibrosis quística (FQ) y *P. aeruginosa*.

Las infecciones causadas por *P. aeruginosa* son parte de los principales factores de mortalidad y morbilidad en pacientes con fibrosis quística (FQ) (Yong et al., 2018). La FQ es una enfermedad causada por una mutación hereditaria recesiva en el gen que codifica para la proteína transmembranal reguladora de la fibrosis quística (CFTR, por sus siglas del inglés), la cual es expresada en muchas células epiteliales y sanguíneas. La FQ afecta principalmente los pulmones, y en menor medida al páncreas, hígado e intestino. Se caracteriza por el transporte anormal de sodio y cloruros en el epitelio lo que provoca secreciones espesas y viscosas (O'Sullivan and Freedman, 2009) que promueven un ambiente ideal para el crecimiento microbiano (Lieberman et al., 2014, Nguyen and Singh, 2006). Esto ocasiona que los pacientes con FQ sean altamente susceptibles a infecciones crónicas. Se ha encontrado esta bacteria en el 80% de estos pacientes lo que incrementa el deterioro de la función pulmonar y el decaimiento clínico (Curran et al., 2004).

El tratamiento para los pacientes con FQ consiste en el uso prolongado de antibióticos, esto no ha tenido mucho éxito debido a la alta resistencia a los antibióticos y/o a la formación de biopelículas (National Guideline Alliance (UK), 2017; Mauch et al., 2018).

1.5 Resistencia a antibióticos.

Pseudomonas aeruginosa es de gran interés en la clínica y epidemiología, pues este patógeno es causante del 7.1% de los casos asociados a infecciones en EUA (McCarthy, 2015). Ocasionando un aumento significativo en la morbilidad y mortalidad en pacientes con infecciones sanguíneas, septicemias y neumonías asociadas a sistemas de ventilación, (Joo et al., 2011; Schechner et al., 2011; Johnson et al., 2009; Magill SS, et al., 2014). Además, el ECDC (por sus siglas

del inglés: *european center for disease prevention and control*) reportó un panorama similar, asociando a *P. aeruginosa* con el 8.9% de los casos reportados en unidades de cuidado intensivos (**Zarb et al., 2012**).

1.5.1 Mecanismos de resistencia a antibióticos.

Los mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa* son, en parte, responsables de las infecciones que causa. Existen dos tipos de resistencia que le permiten a *P. aeruginosa* resistir a diversos tipos y familias de antibióticos, la resistencia intrínseca o natural y la extrínseca, esta última se refiere a la extraordinaria capacidad que tiene de adquirir mecanismos de resistencia mediante mutaciones (**Codjoe and Donkor, 2017; Morgan and Chandna, 1995; Poole, 2001**).

La resistencia intrínseca se refiere primeramente al *biofilm* y constituye la primera defensa de *P. aeruginosa* frente a los antibióticos debido a que no sólo separa físicamente al antibiótico de la bacteria, sino que en los *biofilms* el patógeno expresa una serie de genes que codifican distintos sistemas de resistencia. Los dos genes más relevantes son el gen *ndvB* y el gen PA1875-1877. El gen *ndvB* codifica una glucosiltransferasa que participa en la síntesis de glucanos cíclicos- β -1,3 que son capaces de unirse a los antibióticos para secuestrarlos e impedir que se unan en su blanco celular. El PA1875-1877 forma parte de un operón que codifica para una bomba que expulsa a los antibióticos que están en el interior de la célula.

La resistencia extrínseca es considerada principalmente como la adquisición de β -lactamasas, además de otros mecanismos de resistencia. La formación de *biofilm* promueve el ambiente idóneo para que se lleve a cabo la transferencia horizontal de plásmidos con genes de resistencia a antibióticos, como son los genes que codifican para enzimas β -lactamasas, aumentando progresivamente el porcentaje de individuos resistentes en la población (**Zhang et al., 2013**). Las enzimas β -lactamasas poseen la capacidad de hidrolizar el anillo betalactámico de los antibióticos, inactivándolos hacia un derivado ácido antes de que puedan unirse

a su blanco el receptor PBP-1 que es la proteína responsable de la formación de la pared celular. En *P. aeruginosa*, las β -lactamasas son inducidas durante la presencia del antibiótico, estas pueden estar cromosómicamente codificadas (OXA- β -lactamasas) o pueden transmitirse entre bacterias por plásmidos (ESBL). En función de su espectro de acción se conocen tres tipos, cada uno de ellos codificado por una serie de genes *bla* específicos (**Ur Rahman et al., 2018**). El primer tipo de β -lactamasas son las MBL o metalo- β -lactamasas, las cuales son codificadas por genes como *blaIMP*. Estas son resistentes a los inhibidores y se encuentran activos frente a todos los β -lactámicos con excepción del antibiótico aztreonam. El segundo son las ESBL o β -lactamasas de espectro extendido que son codificadas por genes como *blaTEM-1*, estas son sensibles al ácido clavulánico y actúan sobre antibióticos como las cefalosporinas. El tercer tipo son las OXA- β -lactamasas, que son codificadas por genes como *blaOXA-48* e hidrolizan a los antibióticos tipo oxacilinas y cloxacilinas (**Hakemi Vala et al., 2014**).

Los transportadores RND (por sus siglas del inglés: *Resistance nodulation cell division*) son sistemas de flujo de salida que se encuentran sobre-expresados en *P. aeruginosa*, el objetivo de estos consiste en expulsar a los antibióticos fuera del microorganismo para impedir que lleven a cabo su función. En *P. aeruginosa* hay diez sistemas distintos de transportadores RND, cada uno de ellos posee especificidad determinada: MexAB-OprM, Mex C1-OprJ, Mex EF-OprN, Mex XY-OprM, Mex JK-OprM/OprH, mex GHI-OpmD, Mex VW-OprM, Mex PQ-OpmE, Mex MN-OprM y Tri ABC-OpmH. El más importante, y el único que es expresado constitutivamente es el Mex AB-OprM, el cual produce resistencia a macrólidos, carbapenems, cloranfenicol, trimetoprim, aminoglucósidos, sulfonamidas, fluoroquinolonas, tetraciclinas y algunos β -lactámicos (ya sea sólo o con inhibidores de β -lactamasas) (**Cullen and McClean 2015; Hirsch and Tam, 2010**).

Además, la pérdida de las porinas OprD está asociada con resistencia al antibiótico imipenem y disminución de la susceptibilidad al antibiótico meropenem (**Cullen and McClean 2015; Hirsch and Tam, 2010**). También, las metilasas son

otras enzimas que juegan un papel importante en la resistencia a antibióticos, los genes *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *armA* y *npmA* que codifican para metilasas que metilan el sitio A del ARNr 16S impidiendo la unión de todos los aminoglucósidos conocidos (Cullen and McClean 2015; Hirsch and Tam, 2010). Las mutaciones en los genes *gyrA* y *parC* que codifican la ADN girasa y topoisomerasa IV respectivamente, provocan resistencia a las fluoroquinolonas (Cullen and McClean 2015; Hirsch and Tam, 2010).

1.5.2 Multirresistencia a antibióticos y datos Epidemiológicos.

A principios del 2017, la Organización mundial de la salud (OMS) ubicó a *P. aeruginosa* dentro de un grupo de bacterias que presentan un elevado grado de resistencia a antibióticos, por lo que es de gran prioridad encontrar nuevos antibióticos para su tratamiento y control

(<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>).

Cuando un aislado presenta alguno de los mecanismos anteriormente mencionados, se convierte en resistente al grupo de antibióticos (a los cuales, dicho mecanismo afecte). Si un aislado expresa suficientes mecanismos de resistencia a antibióticos, como para ser “inmune” a tres o más categorías de estos, se le considera como aislado Multirresistente a antibióticos. Entre los antibióticos comúnmente usados contra *P. aeruginosa* están las categorías de penicilinas antipseudomónicas (piperacilina), cefalosporinas (ceftazidima, cefepime), carbapenems (imipenem, meropenem, doripenem), fluoroquinolonas (ciprofloxacino), aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, amikacina), monobactamas (aztreonam) y polimixinas (colistina). Muchos aislados de *P. aeruginosa* se clasifican como multirresistentes debido a que presentan diversos mecanismos de resistencia a antibióticos.

Según Magiorakos y colaboradores en el 2011, la multirresistencia a antibióticos puede clasificarse en tres perfiles: MDR (por sus siglas del inglés: *multi drug resistant*) o bacterias multirresistentes, XDR (por sus siglas del inglés: *extremely drug resistant*) o extremadamente resistentes y Pan-resistentes (por sus siglas del inglés: *pan drug resistant*). Las bacterias MDR son aquellas que resisten a ≥ 1 antibióticos de ≥ 3 categorías. Las bacterias XDR son las que resisten a ≥ 1 antibióticos de todas menos ≥ 2 categorías. Las PDR, son aquellas bacterias que resisten a todos los antibióticos de todas las categorías (**Magiorakos et al., 2012**).

La multirresistencia a antibióticos (**Rice, 2009**) ha adquirido tal importancia que la Organización Mundial de la Salud (OMS) la ha identificado como la quinta amenaza para la salud humana. La importancia de la multirresistencia a antibióticos radica en que provoca un claro aumento de la morbimortalidad de los pacientes repercutiendo en los costos o gastos en salud pública (**Boucher et al., 2009; Aloush et al., 2006**). La existencia de un elevado grado de resistencia limita las posibilidades en la clínica debido al escaso repertorio de antibióticos efectivos (**Falagas and Bliziotis, 2007; Infectious Diseases Society of America, 2010**).

En EUA anualmente se asocian 51,000 casos clínicos ocasionados por *P. aeruginosa*. De estos, más de 6,000 (13%) son causados por aislados MDR, ocasionando 400 muertes al año. Por tal motivo, el centro para la prevención y control de enfermedades (CDC por sus siglas del inglés: *Centers for Disease Control and Prevention*) ha catalogado a *P. aeruginosa* de alto riesgo, debido a que es una bacteria de amenaza grave.

(<https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>).

En Europa, el EARS-Net (por su significado del inglés: *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*) reportó en el 2015 que *P. aeruginosa* posee una resistencia en promedio del 20% a piperacilina/tazobactam, carbapenemasas y fluoroquinolonas, y una resistencia del 13% a ceftazidima y aminoglicosidos (**Magill et al., 2014**). Además, se ha reportado que la prevalencia de aislados MDR ha

incrementado durante la última década, alcanzando resistencias del 30% en países de Europa oriental. Un estudio realizado en España reportó que el 15% de los aislados analizados fueron XDR (**Oliver et al., 2015**). También en España, en un estudio realizado por Cabot y colaboradores en el 2012 se reportó que el 10.5% de los aislados fueron XDR (n = 190). En Portugal, se analizaron 3,778 aislados colectados durante 10 años y se observó que el 52.5% de los aislados fueron MDR y el 4.1% fueron XDR. Por otro lado, en Irán se ha reportado una incidencia del 54.5% de aislados MDR y 33% de aislados XDR (**Oliver et al., 2015**).

1.6 Factores que contribuyen a la resistencia a antibióticos en México y otros países en desarrollo.

La resistencia a antibióticos se esta incrementando en países en desarrollo en comparación con países desarrollados (**Berezin et al., 2014**). Existen numerosas razones que pueden explicar el aumento en la resistencia a antibióticos en países en desarrollo, sin embargo, entre los principales factores que contribuyen están: el uso aumentado de antibióticos, el acceso a antibióticos de dudosa procedencia o inadecuados, la manufactura de antibióticos de baja calidad y la falta de recursos para pagar tratamientos con antibióticos (**Planta, 2007**).

Particularmente, en Asia y Latinoamérica, existen un fácil acceso a antibióticos y, como consecuencia, un incremento en el uso de estos (**Laxminarayan and Heyman, 2012**). Por ejemplo, en la India se reportó un incremento del 37% *per capita* en el uso de antibióticos entre el 2005 y 2010. Otro caso es China, en donde los médicos y otros profesionales de la salud reciben ganancias de parte de las farmacéuticas por prescribir los antibióticos más costosos con la finalidad de promover el uso de éstos (**Laxminarayan and Heyman, 2012**).

Una práctica común en países en desarrollo es la venta de antibióticos sin receta médica, que corresponde a más del 90% de los antibióticos usados en estos países. Por ejemplo, un estudio realizado en Rajbari, distrito de Bangladesh, mostró

que más de 100,000 dosis de antibióticos fueron vendidas sin receta medica en un mes (**Morgan et al., 2011**). En Manila, Filipinas, se demostró que el 66% de los antibióticos vendidos fueron sin receta médica (**Lansang et al., 1990**).

La pobreza juega un papel importante sobre la resistencia a antibióticos. La falta de recursos para pagar una consulta médica o para pagar los tratamientos médicos (incluso los menos costosos) contribuye a la resistencia a antibióticos. Las personas de escasos recursos optan por adquirir los antibióticos menos costosos y posiblemente los menos potentes. Además, las personas en situación de pobreza no terminan con el tratamiento antimicrobiano debido a que no cuentan con los recursos para pagar un tratamiento completo. De esta forma, el inapropiado uso de antibióticos y la inadecuada conclusión del tratamiento ejercen fuertes presiones selectivas sobre las poblaciones bacterianas que originan resistencias a los antibióticos (**Planta, 2007; Founou et al., 2017**). México no es la excepción y se caracteriza por un sistema de salud fragmentado debido a diversos problemas de salud pública. Entre los más importantes se encuentra la venta indiscriminada de antibióticos (**Wirtz et al., 2009**), su inadecuada prescripción y su venta sin receta medica. Por ejemplo, en el 2012 los antibióticos se ubicaron entre los medicamentos más vendidos (cerca del 40% sin receta médica), y durante muchos años su uso sobrepasa al de otros países en Latinoamérica. Estas características han sido relacionadas con la resistencia a antibióticos en México (**Dresler et al., 2012**).

Se ha documentado que otros países de América Latina también enfrentan los mismos problemas que México (**Dresler et al., 2012**). Sin embargo, existen características peculiares en México que también contribuyen con la resistencia a antibióticos como: (a) La falta de infraestructura adecuada junto con la sobrepoblación de pacientes en hospitales, (b) la disponibilidad de antibióticos en zonas marginadas o rurales, (c) el bajo número de personal de la salud como enfermeras y médicos, (d) animales que viven en la calle, (e) la inadecuada administración de residuos y de basura municipal que incrementan los niveles de contaminación fecal y (f) la contaminación ambiental por ozono, factor que

contribuye a la resistencia a antibióticos en las grandes ciudades de México (**Amábile-Cuevas, 2010; Berezin et al., 2014**).

Además, en algunos países en desarrollo no existen regulaciones o normas que aseguren la calidad de los antibióticos. Por ejemplo, se analizó una cápsula de 500 mg de ciprofloxacino adquirida en Vietnam y se observó que únicamente contenía el equivalente a 20 mg de este antibiótico. La mala calidad de los antibióticos utilizados clínicamente podría tener algún efecto en la promoción de la resistencia (**Planta, 2007**). En México, durante muchos años ha existido una tercera y rara categoría de antibióticos: los similares. Esta categoría de antibióticos no es evaluada ni con los mínimos requisitos con los que un medicamento genérico es evaluado, escapando a cualquier tipo de control de calidad (**Amábile-Cuevas, 2010; Berezin et al., 2014**).

El reto es encontrar el balance entre el fortalecimiento durante la prescripción y venta de los antibióticos y el adecuado uso de estos. Así como establecer normas sociales y culturales que ayuden al uso apropiado de los antibióticos. Además, realizar estudios locales multidisciplinarios que ayuden a abordar desde distintos puntos de vista las preguntas de circundan el problema de la resistencia a antibióticos. A continuación, se abordará como la epidemiología se ha auxiliado de otras disciplinas como la genética de poblaciones para esclarecer problemas relacionados con bacterias patógenas.

1.7 Genética de poblaciones de bacterias patógenas.

La epidemiología de enfermedades infecciosas ocasionadas por organismos patógenos se ha estudiado desde distintas perspectivas (molecular, clínico y evolutivo). Una de las aproximaciones al estudio y al diseño de estrategias para el control de epidemias es la investigación de la evolución de las poblaciones de patógenos. De esta forma, los estudios de genética de poblaciones han permitido determinar (i) los factores que originan y mantienen la diversidad, (ii) la conectividad

entre las subpoblaciones y (iii) las tasas de mutación y recombinación; entre otros factores críticos para el control epidemiológico (**Tibayrenc, 2017**).

Es necesario conocer y entender ampliamente la biología y ecología de bacterias patógenas, así como su epidemiología (**Davis and Davis, 2010**). En las últimas décadas, los estudios de genética de poblaciones de bacterias patógenas se han incrementado debido a que se está reconociendo la importancia de la estructura poblacional para el estudio de la resistencia microbiana con el fin de conocer las interacciones entre microorganismos patógenos y el sistema inmune, e identificar antígenos candidatos que servirán para el diseño de vacunas para realizar programas de vacunación efectivos.

Casos paradigmáticos que han ayudado al entendimiento de la dinámica evolutiva de enfermedades infecciosas debido a la genética de poblaciones de patógenos son: *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Helicobacter pylori* (**Hartl and Clark, 2007**). Por ejemplo, se descubrió que los principales complejos clonales (Cc), grupo de bacterias idénticas, de *Neisseria meningitidis*, son antigénicamente diferentes, hallazgo que ayudó al éxito de la vacuna conjugada contra el Meningococo C introducida en UK en 1999 (**Maiden et al., 2008**). Otro ejemplo corresponde al hallazgo de los seis grandes filogrupos de *Mycobacterium tuberculosis* con características específicas (**Gagneux and Small, 2007**) de un área geográfica en particular y con diferencias en la virulencia entre filogrupos (**Atchman, 2008**). También, gracias a la genética de poblaciones bacterianas se ha observado que las tasas de recombinación y mutación actúan de formas diferentes ocasionando diferencias en las dinámicas evolutivas. Un ejemplo es la estructura poblacional panmítica o sexual de *N. gonorrhoeae* y *H. pylori* resultado de las altas tasas de recombinación, por otro lado, la estructura poblacional clonal de *S. entérica* (**Smith et al., 1993**) resultado de las altas frecuencias de mutación con respecto a la recombinación.

Estos y otros ejemplos de casos exitosos de la genética de poblaciones bacterianas han ayudado a entender la estructura poblacional de bacterias y la naturaleza de la variación genética que existe entre poblaciones. La cantidad de variación genética de una población es un parámetro fundamental ya que determina el potencial evolutivo dentro de la población. Los tiempos generacionales cortos de la mayoría de las bacterias y los tamaños poblacionales grandes, hacen que los cambios evolutivos sean muy rápidos. Por lo tanto, entender la dinámica de aparición y selección de mutantes o la importancia relativa de las mutaciones y recombinación en estas poblaciones, es esencial para entender como se producen los cambios epidemiológicos (**Hartl and Clark, 2007**).

Los estudios de genética de poblaciones también han sido útiles para caracterizar aislados de bacterias patógenas, aspecto esencial en la epidemiología de enfermedades infecciosas. Durante la caracterización es de gran importancia entender las relaciones genéticas existentes entre cepas patógenas y no-patógenas miembros de una misma especie debido a que la comparación puede ayudar a entender los orígenes de la patogenicidad identificando las diferencias genéticas (**Tibayrenc, 2017**).

Con ayuda de la genética de poblaciones bacterianas, se ha visto que, por lo general, existe una aparente asociación entre algunos complejos clonales y el desarrollo de la enfermedad. Lo anterior indica que existe menor diversidad genética en cepas patógenas comparadas con las de vida libre (**Hartl and Clark, 2007; Tibayrenc M, 2017**). Estas observaciones han sugerido que la mayoría de las bacterias patógenas presentan una estructura poblacional clonal, aunque esto no siempre es el caso (**Oliver et al., 2015**). El creciente número de estudios aunado a la aplicación de técnicas moleculares ha mostrado que la frecuencia de la recombinación genética no es igual en todas las especies, y que en algunos casos puede llegar a romper la estructura clonal de la población (**Didelot and Maiden 2010**).

Desde hace mucho tiempo se sabe sin duda que la recombinación ocurre en las poblaciones bacterianas. La adquisición de material extra-cromosómico tiene importantes consecuencias en la evolución de las bacterias, tanto a corto plazo por la distribución horizontal de genes de resistencia, como a largo plazo por la adquisición de nuevos determinantes de virulencia o propiedades metabólicas que puedan producir variación genotípica que, a su vez, puede producir un cambio importante en la patogenicidad. Por lo tanto, la variación genotípica en las poblaciones de microorganismos plantea importantes dificultades para el control de las enfermedades infecciosas como (i) la emergencia de nuevas cepas patógenas, (ii) la aparición constante de poblaciones de bacterias resistentes a los antibióticos o (iii) las dificultades asociadas a la obtención de vacunas contra microorganismos antigénicamente diversos o cambiantes (**Didelot and Falush 2007**).

Lo anterior corresponde a una muestra de la importancia práctica del conocimiento de los procesos micro evolutivos que operan en las poblaciones de bacterias. No obstante, es importante señalar que la genética de poblaciones bacterianas es una disciplina separada y diferente a la epidemiología de enfermedades infecciosas, los métodos, análisis e interpretación de los datos, así como los esquemas conceptuales son diferentes (**Feil and Spratt, 2001; Didelot and Maiden 2010**).

1.7.1 Fundamentos de la genética de poblaciones bacterianas

La evolución es una consecuencia del cambio en la composición genética de las poblaciones bacterianas. De tal manera que la genética de poblaciones estudia la variabilidad genética de las poblaciones para explicar los mecanismos por los cuales evoluciona una especie. Lo anterior, responde a preguntas específicas sobre la historia particular de una especie y de sus poblaciones.

En las especies bacterianas no existe una absoluta homogeneidad genética, distintas poblaciones de una misma especie pueden presentar diferencias

genéticas. Para la genética de poblaciones el proceso evolutivo consiste en cambios en la constitución genética de las distintas poblaciones de una misma especie.

Los cambios genéticos como: mutación, recombinación, deriva génica y selección natural, son producidos por diferentes mecanismos que afectan las frecuencias genéticas de la población. Estos cambios difieren en su naturaleza y en la velocidad que ocurren. Por ejemplo, la mutación es el proceso fundamental que impulsa todo cambio evolutivo. No obstante, debido a que las tasas de mutación son muy bajas, los cambios producidos por mutaciones son muy lentos. Por otro lado, la recombinación implica el intercambio de una región pequeña del cromosoma con la correspondiente región de otra bacteria de la misma especie, en algunos casos, de otra especie estrechamente relacionada y es mucho más frecuente que la mutación. La deriva génica se basa en que las frecuencias de una población pueden cambiar por razones esencialmente aleatorias. Dado que todas las poblaciones son finitas, la deriva génica es más evidente en poblaciones pequeñas comparadas con poblaciones grandes. Por último, la selección natural elige aquellos microorganismos que presentan mayor eficacia biológica. La selección conserva los logros conseguidos durante generaciones y eliminando a los individuos divergentes.

1.7.2 Recombinación y mutación en *P. aeruginosa*.

Se sabe que la estructura poblacional de las bacterias puede ser panmítica o sexual en la cual la recombinación juega un papel importante distribuyendo aleatoriamente los alelos, un ejemplo de este tipo de estructura esta es *Neisseria gonorrhoeae*. Sin embargo, la estructura poblacional también puede ser clonal, en donde los alelos no están distribuidos aleatoriamente y la evolución ocurre principalmente mediante mutaciones, como es el caso de *Salmonella entérica* (Smith et al., 1993). En este sentido, muchos estudios que han tratado de explicar la estructura genética de *P. aeruginosa*, mencionan que presenta una estructura poblacional clonal (Kiewitz and Tümmler, 2000; Pirnay et al., 2002; Pirnay et al., 2009; Martin et al., 2013). Sin embargo, no ha sido posible establecer una

relación entre *P. aeruginosa* y sus orígenes de aislamiento o hábitats (**Pirnay et al., 2002; Kidd et al., 2012**).

Se ha observado que *P. aeruginosa* es representada principalmente por complejos clonales (Ccs) distribuidos globalmente y relacionados con ambientes clínicos. (**Tümmler et al., 2014**). Por ejemplo, aislados como la clona C, PA14, DK2 y LESB58 han sido relacionados con infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística (**Cramer et al., 2011; Marving et al., 2014; James et al., 2012**). Algunos como la clona C y PA14, se han observado únicamente en hábitats clínicos (**Wiehlmann et al., 2015**). Otros, como el Cc 235 descendiente de PA14, el Cc 17 descendiente de la clona C, el Cc 142 y Cc 111 descendiente de LESB58, se han asociado a epidemias por su alta prevalencia, su amplia distribución global y su alta resistencia a antibióticos, catalogados como MDR (multi drug resistant) o XDR (extensively drug resistant).

Estos Ccs son denominados de alto riesgo, debido a que pueden asociarse a altas tasas de mortalidad y morbilidad, esparciéndose fácilmente entre pacientes y hospitales (**Maatallah et al., 2011; Oliver A. et al., 2015; Treepong et al 2018**). Lo anterior sugiere que *P. aeruginosa* presenta una estructura clonal con dos particularidades. Por un lado, esta bacteria presenta características compartidas a nivel global y a nivel local. Por otra parte, la estructura clonal permanece estable a través del tiempo originando Ccs específicos de una hábitat o ambiente. En este esquema la recombinación tiene un papel importante (**Tümmler et al., 2014**). Algunos autores han analizado la frecuencia de recombinación, observando diferencias significativas. Por ejemplo, Maatallah et al. 2011, mencionan una frecuencia de recombinación dos veces mas alta a la frecuencia reportada por **Kidd TJ et al. 2012**.

Por otra parte, recientes estudios en donde analizan SNP's del genoma conservado de más de 300 aislados de *P. aeruginosa* (**Stewart et al., 2014; Freschi et al., 2015**), han mostrado tres grades linajes filogenéticos, pero no explican las posibles causas que originan la separación filogenética de estos linajes.

La genética de poblaciones ha sido una aproximación exitosa que trata de responder cuáles son las causas y la dinámica de la diversidad genética en aislados de origen clínico. En este sentido, el análisis MLST (*multilocus sequence typing*) es una técnica que emplea secuencias nucleotídicas, de aproximadamente 450 pb, de genes de mantenimiento o “*housekeeping*” distribuidos a través del genoma, se ha utilizado para indagar los mecanismos (recombinación y mutación) y los procesos (selección natural y deriva génica) que promueven la diversificación bacteriana (**Maiden et al., 1998; Feil, 2004**). Particularmente, esta técnica se ha aplicado en una gran cantidad de géneros y especies con el fin de aportar datos sobre las frecuencias de recombinación (**Maiden, 2006**). Sin embargo, es de notar que la mayoría de los estudios de este tipo están centralizados en poblaciones de Europa, Asia y América del Norte. Sin embargo y a pesar de la elevada incidencia de infecciones y muertes causadas por *P. aeruginosa* en México (**Amábile-Cuevas, 2010; Alonso-Aguilar et al., 2017**), la información de este tipo es escasa.

2. Planteamiento del problema.

Pseudomonas aeruginosa es uno de los patógenos más importantes a nivel mundial debido al amplio número de casos clínicos por año que ocasiona (6,700 casos y 440 muertes en EUA) y por la alta prevalencia de aislados resistentes a múltiples antibióticos. Además, *P. aeruginosa* es causante de una amplia variedad de infecciones hospitalarias ocasionando una alta tasa de morbilidad y mortalidad. Por lo cual, esta bacteria sigue siendo un problema de salud pública a nivel global reflejándose en los altos costos de inversión por los sistemas de salud.

Lo anterior se llevó a cabo analizando una muestra de estudio de 158 aislados de *P. Aeruginosa* procedentes de tres hospitales de la Ciudad de México

3. Hipótesis.

- I. La muestra de estudio está representada por aislados pertenecientes a *Cc* globalmente distribuidos.
- II. La estructura poblacional es epidémica y está relacionada con el origen del aislamiento.
- III. Dado el contexto socioeconómico de México, existen mayores resistencias a antibióticos comparado con las resistencias encontradas en países desarrollados.

4. Objetivos.

4.1 Objetivo General.

Determinar la genética poblacional y los perfiles de resistencia a antibióticos de una colección mexicana de *Pseudomonas aeruginosa*.

4.2 Objetivos Específicos.

- I. Determinar la diversidad genética, así como, las frecuencias de recombinación y mutación, en aislados clínicos procedentes de la ciudad de México.
- II. Analizar la distribución de los Ccs de la muestra de estudio, sus relaciones con Ccs de importancia a nivel global y sus resistencias a antibióticos.
- III. Analizar los aspectos multifactoriales que podrían estar involucradas en mayores resistencias a antibióticos en países en desarrollo comparadas con países desarrollados.

5. Materiales y Métodos.

5.1 Descripción de la muestra de estudio y condiciones de cultivo.

En este estudio se analizaron 158 aislados clínicos de *P. aeruginosa* procedentes de tres hospitales de la Ciudad de México (**Tabla 1**) asociados a fibrosis quística, septicemias neonatales y varias enfermedades nosocomiales (S1). Cada aislado fue cultivado durante toda la noche en 5 mL de caldo LB a 37°C con 200 rpm de agitación. Los cultivos se cosecharon centrifugando a 12,000 rpm por tres minutos.

Tabla 1. Procedencia de los 158 aislados de *P. aeruginosa* analizados en este estudio.

	Fibrosis Quística	Septicemia neonatal	Enfermedades nosocomiales
Instituto Nacional de Pediatría	83 Fc	41 Ps	
Hospital Infantil de México			24 H
Hospital Primero de octubre		10 Ps	

5.2 Caracterización fenotípica.

5.2.1 Susceptibilidad a antibióticos.

Se analizó la susceptibilidad de los 158 aislados a 17 antibióticos comúnmente utilizados en la clínica. El análisis se realizó con el equipo Vitek2 de Biomerieux usando el antibiograma AST-N119 constituido por 8 categorías de antibióticos. Como se observa en la siguiente tabla:

Tabla 2. Antibióticos utilizados en este estudio

Categoría del antibiótico	Antibiótico
Penicilinas	Piperacillina
Cefalosporinas de cuarta generación	Cefepima
Carbapenemasas	Imipenem, Meropenem
Cefalosporinas de tercera generación	Ceftazidima, Ceftriaxona
Inhibidores de tetrahidrofolato	Trimetoprima-Sulfametoxazol
Quinolones de nueva generación	Ciprofloxacino, Moxifloxacino, Oxifloxacino
Aminoglicosidos de segunda generación	Amikacina, Gentamicina, Tobramycina, Tigeciclina
Lactámicos	Tircacillina-Ácido clavulánico, Amoxicillina-Ácido clavulánico, Piperacillina-Sulbactam

La susceptibilidad a antibióticos fue determinada a través de la concentración mínima inhibitoria (MIC ug/mL) clasificando a la población en susceptible, resistente o intermedio de acuerdo a la MIC observada. En la siguiente tabla se describe la clasificación de los perfiles de resistencias a antibióticos (**Magiorakos et al. 2012**).

Tabla 3. Clasificación de los perfiles de resistencia (**Magiorakos et al. 2012**)

Perfil de Resistencia a antibiótico	Descripción
MDR (Multidrug resistant)	Aislados resistentes a ≥ 1 antibióticos de ≥ 3 categorías.
XDR (Extensively drug resistant)	Aislados resistentes a ≥ 1 antibiótico en todas excepto ≤ 2 categorías.
PDR (Pandrug-resistant)	aislados resistentes a todas las categorías de antibióticos usados.

5.3 Caracterización genética.

5.3.1 Electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE).

El ADN genómico en bloques de agarosa, se preparó utilizando procedimientos de protocolos para PulseNet PFGE de *E. coli* O157: H7, *E. coli* O157 (STEC), serotipos de *Salmonella*, de *Shillega sonnei* y de *Shigella flexneri* con algunas modificaciones. En breve, las bacterias se extendieron en placas de agar LB y se incubaron durante 12 horas a 37°C. Cada cepa se diluyó en un buffer o solución amortiguadora de células en suspensión (NaCl 75 mM, EDTA 25 mM) hasta una densidad óptica (OD) de 0,85 a 0,95 a 600 nm. Enseguida se mezclaron 350 µL de la suspensión celular con un volumen igual de agarosa SeaKem Gold al 1%. La mezcla se extrajo en moldes de tapón desechables (BioRad) y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Los moldes se incubaron durante la noche a 37°C en 3 ml de buffer de lisis (6 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 1 M NaCl, 0,5% Brij 58, 0,2% deoxicolato sódico, 0,5% laurilsarcosina, 50 mg/ml Lisozima, pH 7,5). Enseguida los bloques se incubaron nuevamente durante toda la noche a 50°C en solución de lisis (1% de lauroil sarcosina, 500 mM de EDTA, 0,5 mg / ml de proteinasa K, pH 8,0). Finalmente, los bloques se lavaron 3 veces durante 30 min con solución amortiguadora TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0) y se almacenaron en solución amortiguadora TE a 4°C. Bloques portaobjetos de 2 mm se pre incubaron en buffer Spel 1X durante 30 min a 4°C y enseguida se incubaron con 100 µl de buffer 1X nuevo que contenía 30 U de Spel (Thermo Scientific, Estados Unidos) a 37°C durante toda la noche para digerir ADN en los bloques. Los fragmentos Spel se separaron por electroforesis (1% de gel de agarosa SeaKem Gold, buffer TBE 0,5) en un CHEF-DR III (BioRad, Estados Unidos) a 14°C durante 18 h en las siguientes condiciones: tiempo de cambio inicial, 4 s; tiempo de cambio final, 40 s; ángulo incluido, 120°; y gradiente de voltaje, 6 V/cm. Los patrones de fragmentos de ADN se normalizaron usando los fragmentos XbaI del estándar global H9812 de *Salmonella braenderup* (ATCC BAA-664). El análisis de agrupados se realizó

utilizando el coeficiente de datos con el software BioNumerics versión 7.5 (Applied Maths, Bélgica). Los dendrogramas se generaron mediante el método del grupo de pares no ponderados utilizando enlaces promedio (UPGMA), con ajustes de 1 % y de 1% de optimización del. Un límite de similitud de $\geq 80\%$ se utilizó para definir cepas genéticamente relacionadas de acuerdo con **Singh A., et. al., 2006.**

5.3.2 Extracción de DNA y amplificación por PCR.

A partir de los cultivos cosechados se extrajo el material genético siguiendo el protocolo de extracción de DNA por precipitación salina para bacterias Gram negativas (**Chen and Kuo, 1993**). Se utilizó el sistema MLST para *P. aeruginosa* (**Curran et al. 2004**) que se basa en la amplificación parcial de siete genes *housekeeping*: *acsA* (Acetil coenzima A sintetasa), *aroE* (Shikimato deshidrogenasa), *guaA* (GMP sintasa), *mutL* (proteína del sistema de reparación de errores *mismatch* en el DNA), *nuoD* (Cadena C, D del NADH deshidrogenasa I), *ppsA* (Fosfoenol piruvato sintasa) y *trpE* (Componente I del antracilo sintetasa). Para amplificar las secuencias parciales de los siete genes mediante PCR se utilizó el kit PCR Core (Qiagen, Valencia, CA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se utilizaron los siguientes parámetros de amplificación: desnaturalización inicial 96°C por 5 min, 30 ciclos de: 96°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min y una extensión final de 72°C 10 min. Los primers usados para la amplificación por PCR de los fragmentos internos de estos genes se encuentran en la siguiente tabla:

Tabla 4. Primers utilizados para la amplificación por PCR

Nombre del primer	Secuencia
acsA-F	ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC
acsA-R	GACATAGATGCCCTGCCCTTGAT
aroE-F	TGGGGCTATGACTGGAAACC
aroE-R	TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA
guaA-F	CGGCCTCGACGTGTGGATGA

guaA-R	GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA
mutL-F	CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG
mutL-R	CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC
nuoD-F	ACCGCCACCCGTA CTG
nuoD-R	TCTCGCCCATCTTGACCA
ppsA-F	GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG
ppsA-R	GGTTCTCTTCTTCCGGCTCGTAG
trpE-F	GCGGCCAGGGTCGTGAG
trpE-R	CCCGGCGCTTGTTGATGGTT

Los siguientes pares de primers fueron usados para la secuenciación:

Tabla 5. Primers utilizados para la secuenciación de los productos de PCR

Nombre del primer	Secuencia
acsA-F	GCCACACCTACATCGTCTAT
acsA-R	AGGTTGCCGAGGTTGTCCAC
aroE-F	ATGTCACCGTGCCGTTCAAG
aroE-R	TGAAGGCAGTCGGTTCCTTG
guaA-F	AGGTCGGTTCCTCCAAGGTC
guaA-R	GACGTTGTGGTGCGACTTGA
mutL-F	AGAAGACCGAGTTCGACCAT
mutL-R	GGTGCCATAGAGGAAGTCAT
nuoD-F	ACGGCGAGAACGAGGACTAC
nuoD-R	TGGCGGTCGGTGAAGGTGAA
ppsA-F	GGTGACGACGGCAAGCTGTA
ppsA-R	GTATCGCCTTCGGCACAGGA
trpE-F	TTCAACTTCGGCGACTTCCA
trpE-R	GGTGTCCATGTTGCCGTTCC

Los productos de PCR fueron secuenciados por MacroGen (Seul, Korea) utilizando el kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystem, CA, USA). Las reacciones de amplificación y secuenciación se realizaron utilizando los primers

descritos en la base de datos pubmlst para *P. aeruginosa* (<http://pubmlst.org/paeruginosa/info/primers.shtml>, Nov-2016). Las secuencias forward y reverse se inspeccionaron visualmente usando el programa FinchTV (Perkin-Elmer Inc, Waltham, MA, USA.). Posteriormente, se alinearon utilizando el servidor web ClustalOmega (Li et al. 2015) para después realizar el ensamblaje. Las secuencias alineadas se depositaron en Genebank con los siguientes números de acceso, acsA: MF672021-MF672178, aroE: MF672179-MF672336, guaA: MF672337-MF672494, mutL: MF672495-MF672652, nuoD: MF672653-MF672810, ppsA: MF672811-MF672968, trpE: MF672969-MF673126.

5.4 Análisis de diversidad genética.

5.4.1 Determinación de complejos clonales (Ccs).

Se sabe que *P. aeruginosa* presenta una gran diversidad genética, por lo cual, para entender la diversidad genética de la muestra de estudio en un contexto global, se compararon los 158 aislados mexicanos contra la base de datos pubmlst.org mediante el programa eBURST V3 (Feil et al., 2004). Este programa usa un modelo evolutivo simple en el que un secuenciotipo ancestral (o fundador) aumentará su frecuencia en una población, y al hacerlo, diversificará produciendo grupos de secuenciotipos relacionados y descendientes del secuenciotipo fundador. Estos grupos de secuenciotipos son denominados complejos clonales (Ccs). El programa permite identificar grupos de secuenciotipos que comparten al menos 6 alelos similares. Este análisis se realizó con un *bootstrap* de 1,000,000 para identificar los Ccs en la población. En este y el resto de los análisis, se utilizaron 13 aislados de referencia: PAO1, PA14, PA7, PAK, M18, LESB58, DK2, PSE9, B136-33, ATCC9027, EML548, EML528 y EML545. las secuencias MLST de los aislados controles se obtuvieron del Genebank.

5.4.2 Análisis filogenético.

Determinar las relaciones filogenéticas permite rastrear características compartidas entre aislados que conforman filogrupos, ya que la diversidad genética dentro de los filogrupos obedece a una historia evolutiva en común. Utilizando el concatenado de los siete genes MLST (2882 pb) se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud (ML). La reconstrucción filogenética se realizó con el programa en línea, RaxML Blackbox (**Stamatakis et al., 2008**), utilizando el modelo de sustitución nucleotídica GTR+I+G determinado con el programa Jmodel Test (**Posada and Crandall 1998**).

5.4.3 Determinación de la estructura genética.

Los filogrupos pueden diferenciarse de otros por presentar diferencias genéticas muy marcadas, convirtiéndose en subpoblaciones que presentan diferentes frecuencias alélicas debido a que son ancestralmente diferentes. Por lo cual, se determinó la estructura genética utilizando el programa STRUCTURE (**Pritchard et al., 2000**). Este programa, determina probabilísticamente la ancestría de cada aislados para agruparlos por similitud genética. Además, STRUCTURE puede identificar aislados que presentan mezcla genética (*Admixture*), los que pueden pertenecer a más de una subpoblación. Usando el modelo de *Admixture*, se realizaron 10 corridas independientes, infiriendo la presencia de 10 subpoblaciones ($K = 1$ a 10) con 200,000 iteraciones como *burn-in* y 500,000 MCMC. Con el método de Evanno (**Evanno et al. 2005**), se obtuvo un valor óptimo de $K = 3$ el cual se corroboró comparando las probabilidades posteriores de los datos.

5.4.4 Determinación de las relaciones ambientales.

Diversos estudios han demostrado la importancia que los factores ambientales y/o ecológicos tienen en determinar la estructura de las poblaciones bacterianas. Por tal motivo, se utilizó el programa en línea AdaptML que permite identificar las relaciones ambientales entre grupos filogenéticos (**Hunt et al. 2008**). En este análisis se usó una filogenia ML con el concatenado de los 158 aislados mexicanos. El programa se alimentó con datos del hospital de procedencia, enfermedad y sensibilidad a antibióticos, y se corrió con los parámetros predeterminados utilizando 100 tipologías. La figura circular de AdaptML se realizó con el programa en línea iTOL v2.0 (**Letunic and Bork, 2011**).

5.5 Análisis evolutivos.

5.5.1 Análisis de recombinación y mutación.

Se sabe que la recombinación es una de las fuerzas evolutivas responsable de la generación de diversidad, la redistribución de esta e incluso a la adaptación a diferentes ambientes. La frecuencia con la que sucede determina su efecto, jugando un papel importante sobre la estructura genética. Por lo cual, se determinaron las frecuencias de recombinación utilizando el concatenado de los siete genes MLST con el programa ClonalFrame 1.2 (**Didelot and Falush 2007**). Este programa se basa en un algoritmo que considera los efectos de la recombinación homóloga como eventos que rompen los patrones de ligamiento entre locus adyacentes. El programa se corrió por duplicado con 2,000,000 de MCMC y 1,000,000 de iteraciones de *burn-in*. La convergencia de las dos corridas fue evaluada con la prueba estadística de Gelman-Rubin. Las genealogías se fusionaron para determinar el árbol genealógico con el 50% de consenso utilizando la versión gráfica de ClonalFrame (**Didelot and Falush 2007**).

Posteriormente se obtuvieron las frecuencias de recombinación y mutación (ρ/θ), así como, la tasa de la probabilidad de que un polimorfismo ocurra por mutación o recombinación (r/m). Lo anterior se realizó utilizando la versión gráfica de ClonalFrame para la muestra completa y para cada subgrupo.

5.5.2 Diversidad nucleotídica y pruebas de neutralidad.

Para entender la diversidad genética dentro de la estructura genética observada se calcularon los índices de diversidad genética y de neutralidad al interior de cada uno de los grupos con el programa DnaSP (**Rozas et al., 2003**). Se infirieron los valores de diversidad nucleotídica por sitio (π) y el valor de θ de Watterson por sitio, ambos son métodos que estiman a variación intra específica. π compara la diversidad nucleotídica entre pares de secuencias mostrando el grado de polimorfismos existentes. por otra parte la θ de Watterson se basa en el número de sitios segregativos presentes y observados en el tamaño efectivo de la población (N_e), por lo cual, son útiles para observar la historia demográfica (**Hedrick, 2011**).

Por otro lado, se determinaron los parámetros de neutralidad usando Tajima's D, Fu & Li's D^* y F^* , y Fu's F_s . La D de Tajima evalúa las diferencias entre π y la θ de Watterson. Bajo el modelo neutral de Wright-Fisher, se espera que los valores de π y la θ de Watterson sean iguales; las desviaciones dan información sobre eventos demográficos de la población. Las evaluaciones de evalúan si la frecuencia de variación de los singletons son consistentes con la deriva génica esperada (**Fu and Li, 1993**). F_s es un parámetro mucho más sensible a crecimientos poblacionales por lo que se ha utilizado para respaldar hallazgos de procesos demográficos (**Lessa et al. 2003**). Para demostrar la significancia de los parámetros de neutralidad se utilizaron 10,000 simulaciones coalescentes usando el número de sitios segregativos.

6. Resultados.

6.1 Los aislados mexicanos de *P. aeruginosa* son clonales, sin embargo, representan una muestra de la diversidad genética a nivel global.

En el análisis comparativo entre los 158 aislados mexicanos de *P. aeruginosa* y la base de datos pubmlst.org, se observaron a los aislados mexicanos agrupando con la mayoría de los Ccs, desde los más chicos hasta los más grandes. Sin embargo, se observan aislados mexicanos agrupando preferentemente con los Ccs chicos, aumentando la frecuencia de los secuenciotipos que los componen. Por ejemplo, el Cc 598 esta formado por cinco aislados, la muestra de estudio se enriqueció con 10 aislados. Este patrón también se observó en los Ccs 708 y 319. También, observamos 8 Ccs, 235, 319, 309, 708, 155, 244, 179 y 598, clasificados como los más importantes por ser los que presentan mayoritariamente a los aislados mexicanos. Entre estos, los Ccs 708, 155 y 598 son los que presentaron la mayor cantidad de aislados mexicanos, con 11, 10 y 10, respectivamente. (**Figura 1**).

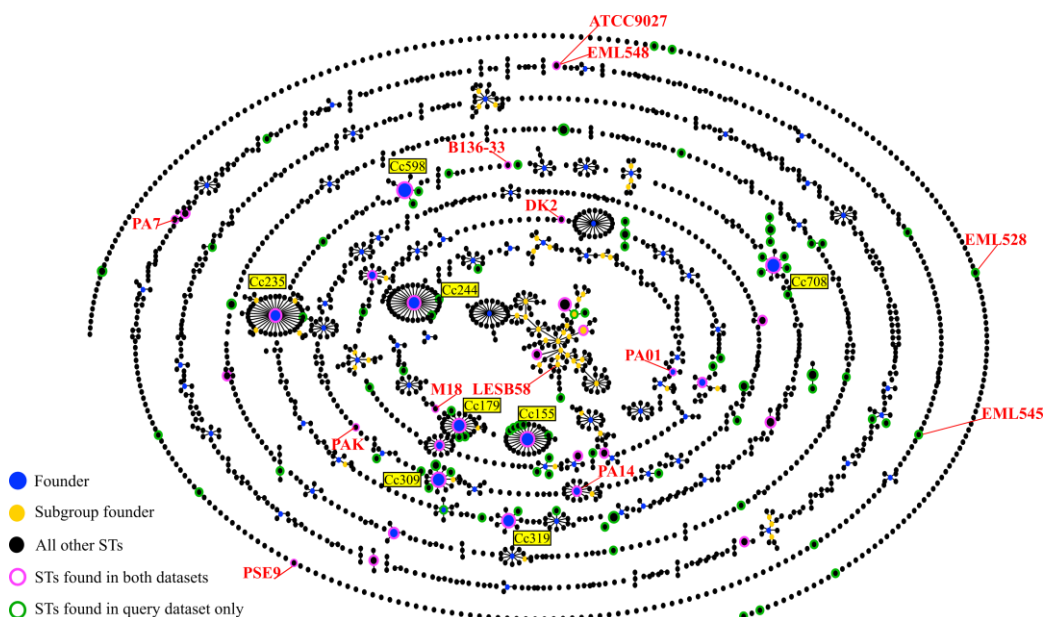


Figura 1. Diagrama de eBURST que muestra un análisis comparativo entre muestras mexicanas y la base de datos MLST de *P. aeruginosa*. El tamaño de cada círculo es proporcional al número de aislamientos con el mismo ST. Los cuadros amarillo claro

muestran los Ccs principales. Los grupos fundadores se muestran en azul y los subgrupos fundadores se muestran en amarillo. Los ST encontrados en la muestra de estudio y en la base de datos se muestran con un halo rosa. Los ST encontrados solo en la población mexicana se muestran con un halo verde. Además, los aislados de referencia se muestran en rojo.

Se observó que algunos de estos Ccs fueron altamente clonales, presentando el mismo secuenciotipo y pulsotipo (PT). Por ejemplo, los aislados mexicanos que conforman el Cc 319 presentan el PT-64. La relación Pulsotipo-secuenciotipo se observó en los Ccs 708 y 598 (**Figura. 2b y Figura 2e**). La alta clonalidad también se observó fenotípicamente en algunos Ccs. Por ejemplo, en el Cc 309 se encuentran los aislados H12, H29 y H32, clasificados como PDR, más Ps5, clasificado como XDR. Además, en el Cc 235 se observó a Ps42 y Ps43, clasificados como XDR (**Tabla S1**).

Por otra parte, observamos a los 8 Ccs más importantes formando clados bien definidos en el árbol filogenético de máxima verosimilitud (**Figura 2**), evidenciándose la clonalidad de la muestra de estudio. También, en el análisis filogenético se observó la separación de los aislados en tres grandes filogrupos (**Figura 2a**), afirmados por *STRUCTURE* (**Figura 2c**).

En el análisis filogenético y en *STRUCTURE*, observamos la misma composición en cada filogrupo: el filogrupo más grande, constituido por 98 aislados, fue denominado grupo-1. En este filogrupo se encuentran PAO1, PAK, LESB58, PSE9, DK2 y M18. El siguiente filogrupo está formado por 60 aislados y fue denominado grupo-2. En este filogrupos encontramos a PA14 y B136-33. El ultimo filogrupo, el más pequeño, se denominó grupo-3 y está formado por PA7, ATCC9027, EML528, EML545 y EML548, más un aislado mexicano, Ps9 (**Figura 2f**). Además, *STRUCTURE* mostró una $k = 3$, sugiriendo la existencia de tres linajes ancestralmente diferentes. Estos linajes no están completamente aislados. Observamos bajos niveles de admixture (intercambio genético) entre el grupo-1 y grupo-2, (**Figura 2c**).

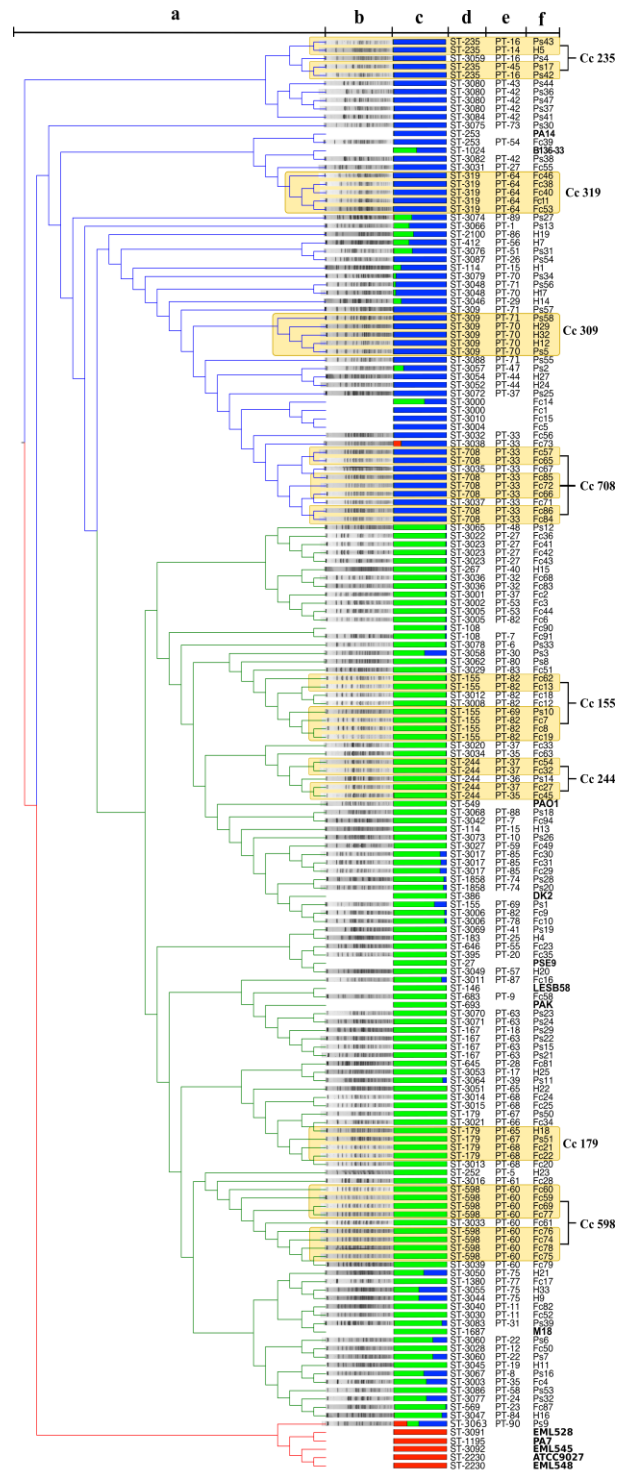


Figura 2. Analisis concentrado de los 158 aislados de *P. aeruginosa*. (a) Árbol filogenético de máxima verosimilitud donde se observa muestra la muestra de 158 especies de *P. aeruginosa* en México, dividida en tres grupos filogenéticos. (b) Patrones de restricción de PFGE que usan enzima SpeI. (c) K = 3 grupos ancestrales inferidos por STRUCTURE donde cada barra de color representa un aislado individual e indica la proporción de

ascendencia de los tres grupos filogenéticos ancestrales (azul, verde y rojo). (d) STs. (e) Pulsotipo de cada aislado. (f) El código de color indica el perfil de resistencia a antibióticos: gris claro para MDR, gris oscuro para XDR y negro para PDR. (g) ID de aislamiento. Los Ccs principales se muestran en cuadros amarillos.

6.2 La estructura genética está relacionada a diferentes niveles de recombinación y no a factores ambientales.

Los bajos niveles de admixture son coherentes con los niveles de recombinación (ρ/θ) y mutación (r/m) encontrados en los 158 aislados mexicanos. Observamos que las mutaciones son aproximadamente 3 veces más frecuentes $\rho/\theta = 0.3636$ (95% [IC: 0.22-0.56]) que la recombinación. Sin embargo, la probabilidad de que un cambio sea introducido por mutación o por recombinación es la misma $r/m = 1.22$ (95% [IC: 0.83-1.71]) (**Figura 3**).

No obstante, la cladograma de ClonalFrame (**Figura 4**), nuevamente evidencia la estructura genética donde los grupos son constituidos por los mismos aislados observados en *STRUCTURE* y en el análisis filogenético. Debido a la coherencia observada, se determinaron los niveles de recombinación (ρ/θ) y mutación (r/m) para cada grupo. En el grupo-1 se obtuvieron valores de $\rho/\theta = 1.70$ (95% [IC: 0.97-2.61]) y $r/m = 2.35$ (95% [IC: 1.50-3.41]), estos valores sugieren que la recombinación es 1.7 veces más frecuente que las mutaciones e introduce aproximadamente 2 veces más cambios que la mutación. En el grupo-2 se observaron valores de $\rho/\theta = 0.0065$ (95% [IC: 0.024-0.133]) y $r/m = 0.47$ (95% [IC: 0.179-0.966]), sugiriendo que la recombinación es menos frecuente que las mutaciones, siendo esta última la principal fuerza generadora de diversidad genética. En el grupo-3 se obtuvieron valores de $\rho/\theta = 5.73$ (95% [IC: 0.0039-39.746]) y $r/m = 4.56$ (95% [IC: 0.0039-32.055]) lo que sugiere que la recombinación es casi 6 veces más frecuente e introduce aproximadamente 4 veces más cambios nucleotídicos que la mutación (**Figura 3**).

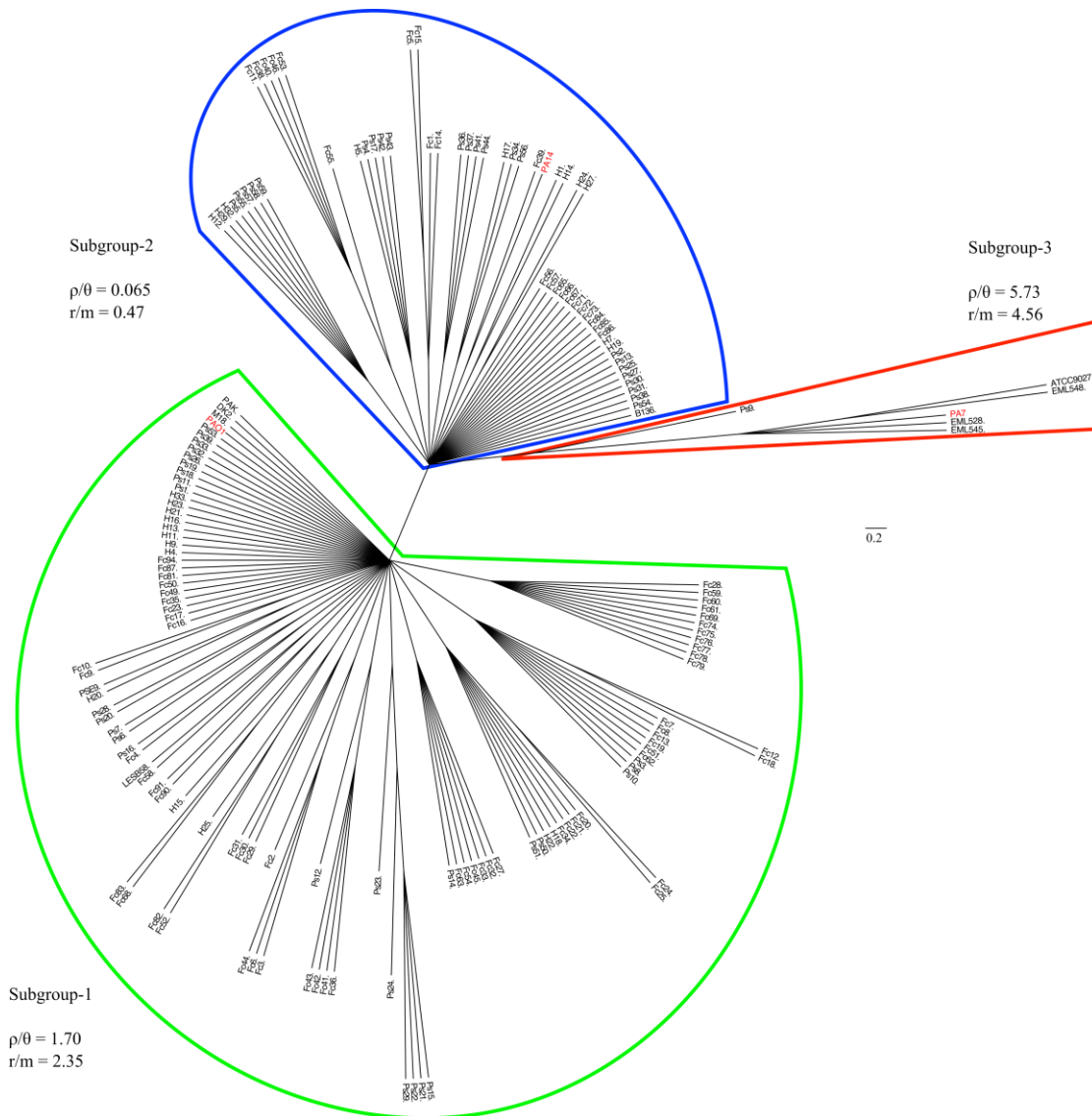


Figura 3. Arbol consenso ClonalFrame utilizando el cncatenado de los siete loci (2882 pb) de los 158 STs de la muestra de *P. aeruginosa* y. El dendrograma se construyó a partir de la combinación de dos corridas de ClonalFrame con un valor de corte de 0.5 como consenso de mayoría. El árbol muestra 3 subgrupos principales que corresponden con STRUCTURE $k=3$ filogrupos (A, B y C) y sus respectivos valores de recombinación y mutación. El primer valor se calculó para todos los ST, el segundo valor se calculó para ST únicos.

Los factores ambientales y/o ecológicos tienden a determinar la estructura genética, por tal motivo, buscamos aislados agrupados por su similitud genética y ecológica. Como factores ecológicos se utilizó información sobre origen de

aislamiento, ancestría, resistencia a antibióticos y/o enfermedad producida. No se observaron relaciones genético-ecológicas entre los 158 aislados mexicanos (**Figura 4a**). Sin embargo, observamos que todos los aislados clasificados como XDR y la mayoría de los PDR, proceden de septicemias neonatales y enfermedades nosocomiales (**Figura 4b**).

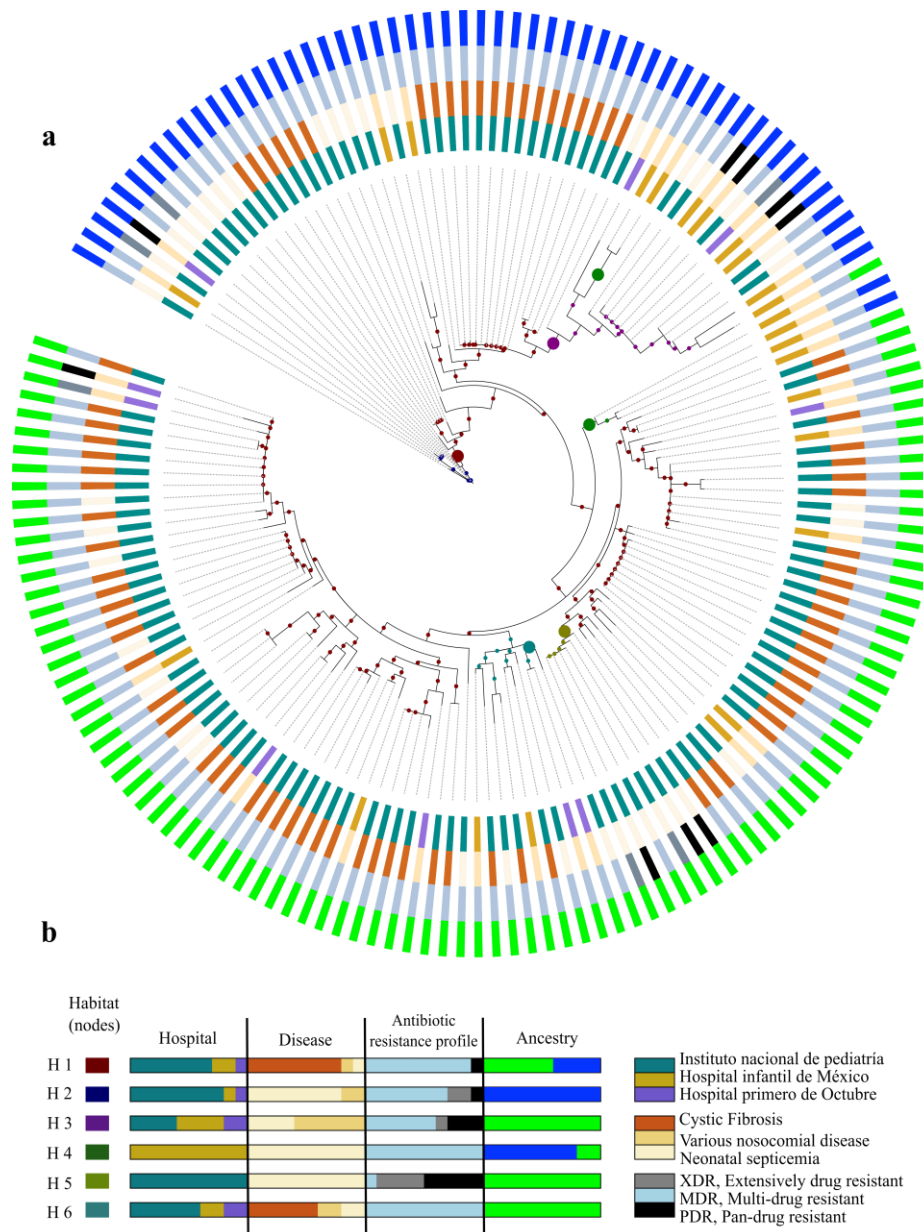


Figura 4. Análisis AdaptML de 158 aislados de *P. aeruginosa*. a) filogenia ML de los Siete loci concatenados (2882 pb). Los círculos de colores en los nodos de la filogenia muestran los seis hábitats inferidos por el programa. Los círculos concéntricos alrededor de la filogenia representan los diferentes parámetros ambientales analizados, desde el exterior

en: "Ascestría" o "filogrupo", "Sensibilidad a los antibióticos", "Enfermedad" y "Hospital" de origen. b) Proporción de los aislados en cada uno de los seis hábitats inferidos según: Hospital de aislamiento, enfermedad, perfiles resistentes a antibióticos y Phylogroups. Los aislados de referencia no se usaron en este análisis.

6.3 Diversidad nucleotídica y pruebas de neutralidad.

Los resultados obtenidos en los análisis de diversidad nucleotídica y en las pruebas de neutralidad se muestran en la **Tabla 6**. Podemos observar que los valores de diversidad genética obtenidos en π y θ son bajos en los tres grupos (**Tabla 6**). Por otra parte, en las pruebas de neutralidad, la mayoría de los valores en la D de Tajima y para los parámetros de Fu & Li, fueron negativos sugiriendo que la población presentó eventos de expansión. Sin embargo, los resultados en la prueba de Fs de Fu, la cual es más sensible detectando expansiones poblacionales, fueron no significativos (**Tabla 6**). En general, estos análisis genéticos clásicos no permiten realizar fuertes conclusiones sobre la historia demográfica de la población de estudio.

Tabla 6. Resumen estadístico para la diversidad nucleotídica genética y parámetros de neutralidad para cada población en cada locus.

Group-1	π	θ	D	D*	F*	Fu's Fs
<i>acsA</i>	0.0095	0.0068	1.0437	-1.3032	-0.5392	-1.9862
<i>aroE</i>	0.0026	0.0123	-2.3982	-5.0377	-4.7898	-15.4680
<i>guaA</i>	0.0066	0.0139	-1.5721	-1.0002	-1.4628	-10.1819
<i>mutL</i>	0.0037	0.0056	-0.8825	-1.4838	-1.5093	-3.9002
<i>nuoD</i>	0.0048	0.0073	-0.9116	-3.0143	-2.6836	-3.5030
<i>ppsA</i>	0.0077	0.0072	0.1686	0.4078	0.3826	-2.2685
<i>trpE</i>	0.0071	0.0091	-0.6366	-0.4019	-0.5865	-3.7479

Group-2	π	θ	D	D*	F*	Fu's Fs
<i>acsA</i>	0.0099	0.0089	0.3463	-0.2129	-0.0229	-2.1475

<i>aroE</i>	0.0047	0.0074	-1.0842	-1.8462	-1.8760	-1.6954
<i>guaA</i>	0.0079	0.0122	-1.0999	-3.1022	-2.8459	-2.8768
<i>mutL</i>	0.0067	0.0279	-2.5934	-6.2646	-5.8412	-0.7378
<i>nuoD</i>	0.0010	0.0047	-2.0821	-3.8340	-3.8405	-5.7423
<i>ppsA</i>	0.0064	0.0046	0.9996	1.2934	1.4100	-2.4417
<i>trpE</i>	0.0087	0.0088	-0.0360	-0.0112	-0.0236	-5.4417

6.4 Aislados resistentes a todos los fármacos (PDR, Pan-drug resistant) fueron identificados en las muestras de estudio.

La susceptibilidad a antibióticos de aislados de *P. aeruginosa* se probó usando un antibiograma para 17 antibióticos. Los resultados muestran que >85% de los aislados son resistentes a AUG, CRO, TGC y SXT, en contraste <15% son susceptibles a MEM, IMP, FEP, CIP (**Figura 5a**). Un análisis global de los perfiles de resistencia antibiótica, y de acuerdo con **Magiorakos et al., 2012**, 115 aislamientos son MDR (75,15%), 28 aislamientos son XDR (17,72%) y 15 aislamientos son PDR (9,49%) (**Figura 5b**).

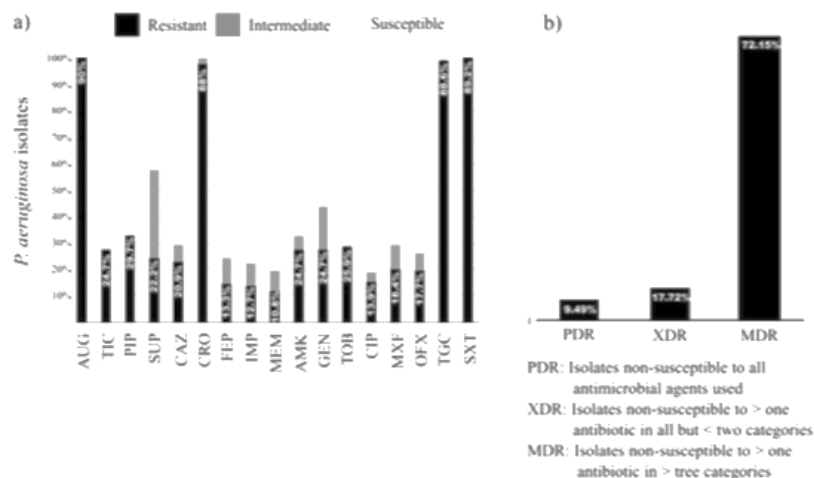


Figura 5. Resistencia a antibióticos de 158 aislamientos de *P. aeruginosa*. a) Porcentaje de aislados resistentes a 17 antibióticos utilizados en este estudio. La resistencia más alta fue para AUG 90%, CRO 88%, TGC 88,6% y SXT 89,2%. b) Porcentaje de aislados clasificados como PDR, XDR y MDR. Debido a la alta resistencia a los antibióticos mostrada en este estudio, todos los aislamientos se clasificaron, al menos en el grupo resistente a múltiples

antibióticos (72,15%). Abreviaturas: piperacilina (PIP), cefepima (CEF), imipenem (IMP), meropenem (MEM), ceftazidima (CAZ), ceftriaxona (CRO), trimetoprima-sulfa-metoxazol (SXT), ciprofloxacina (CIP), moxifloxacina (MXF), oxifloxacina (OFX), amikacina (AMK), gentamicina (GEN), tobramicina (TOB), tigeciclina (TGC), ticarcilina-ácido clavulánico (TIC), amoxicilina-ácido clavulánico (AUG), piperacilina-sulbactam (SUP) . Pan resistente a los medicamentos (PDR), extremadamente resistente a los medicamentos (XDR) y resistente a múltiples medicamentos (MDR).

7. Discusión.

7.1 Amplia diversidad genética similar a la encontrada a nivel global.

En este estudio, observamos 130 secuenciotipos (ST) (82%) agrupados en 41 Ccs. Entre estos, el 235, 319, 309, 708, 155, 244, 179 y 598, son los más importantes por ser los que presentan más aislados mexicanos (**Figura 1**). Interesantemente, en el Cc309 se ubicaron aislados mexicanos (H12, H29 y H32) catalogados como PDR, además Ps5 clasificado como XDR y Ps58 clasificado como MDR (**Figura 2**), denominándose complejo clonal emergente y de alto riesgo, ya que el Cc309 ha incrementado su resistencia a antibióticos con respecto a otros estudios realizados con aislados mexicanos (**Morales-Espinosa R. et al., 2017**). Los aislados con el ST309 son principalmente procedentes de infecciones del tracto urinario e infecciones sanguíneas, las que han incrementado un 42%, dependiendo de la población de estudio (**McCarthy, 2015**). Cabe mencionar que en este estudio no se usó la polimixina B, el cual es un antibiótico usado en la clínica en el tratamiento contra infecciones causadas por bacterias Gramm negativas. Como se muestra en el estudio de **Morales-Espinosa R. et al., (2012)** en donde se analizó una colección clínica de 100 aislados de *P. aeruginosa* de la Ciudad de México, todos mostraron susceptibilidad a la polimixina B.

El Cc235 se encuentra prácticamente en todo el mundo, por lo que no es raro que esté conformado por aislados de diversas enfermedades nosocomiales y de infecciones sanguíneas y por lo tanto agrupan aislados mexicanos MDR (**Empel et al., 2007; Chen Y, et al., 2014**). Existen varias teorías que tratan de explicar el éxito en la distribución del Cc235. Por ejemplo, su distribución global le otorga mayor oportunidad de intercambiar nuevos genes en diferentes regiones geográficas. Por otra parte, algunos aislados presentes en Cc235 han perdido regiones genómicas responsables de la defensa contra DNA de fagos o plásmidos, sugiriendo que estas clonas tienen la capacidad de adquirir material genético exógeno sin restricciones. (**Kos et al., 2015; Turton et al., 2015**). Se han observado a los ST1725 y ST233 de alto riesgo y emergentes en aislados de la Ciudad de México (**Aguilar-Rodea, et**

al., 2017), Sin embargo, en este estudio no encontramos aislados relacionados a estos secuenciotipos.

7.2 Estructura genética en tres filogrupos con diferentes frecuencias de recombinación y mutación.

A pesar de que existen complejos clonales estables a través del tiempo y del espacio, y que han sido relacionados a ambientes clínicos, la estructura poblacional de *P. aeruginosa* no es completamente clonal y los estudios que tratan de explicarla no están en completa concordancia. (Kiewitz, C. Y Tümmler B., 2000; Pirnay et al., 2002, Pirnay et al., 2009; Martin et al., 2013; Wiehlmann et al., 2007; Kidd et al., 2012). Sin embargo, en este estudio encontramos una estructura genética relacionada a tres grandes filogrupos. Esta estructura se ha observado en análisis de SNP's de genomas completos (Stewart L. et al., 2014; Freschi L. et al., 2015). Sin embargo y al igual que en otros estudios, la estructura genética no está relacionada con el origen de aislamiento. De esta manera, las cepas clínicas de *P. aeruginosa* no representan poblaciones distintas a las poblaciones ambientales. Además de ser un patógeno oportunista, *P. aeruginosa* una bacteria ambiental, por lo cual, puede ser más relevante determinar una estructura genética tomando en cuenta las características ambientales (Grosso-Becerra MV et al., 2014).

Nuestros resultados sugieren que la estructura poblacional observada es una combinación de características compartidas a nivel global y local (Tümmler et al., 2014). Por ejemplo, encontramos aislados relacionados al Cc235 observado en otras regiones geográficas. Por otra parte, solo aislados de la Ciudad de México relacionados al ST309 presentan altas resistencias a antibióticos.

Lo anterior sugiere que la recombinación juega un papel importante y algunos estudios han propuesto que es frecuente en *P. aeruginosa* (Pirnay et al., 2009). Por ejemplo, en una muestra de aislados clínicos de cinco países del Mediterráneo se encontró una *r/m* de 8.4, sugiriendo que la recombinación tiene más impacto en la evolución de *P. aeruginosa* que las mutaciones (Maatallah et al. 2011). Por otra

parte, en un análisis de 500 aislados australianos de origen ambiental y diversas infecciones, se observó que es 3.5 veces más probable que los cambios genéticos sucedan por recombinación y no por mutación (**Kidd et al., 2012**).

En este estudio, encontramos un valor r/m de 1.22, sugiriendo que la recombinación y la mutación tienen la misma probabilidad de generar cambios genéticos. Esta discrepancia puede estar asociada a diferencias en los métodos de muestreo (**Pérez-Losada M. et al., 2006**), por ejemplo, la sobre representación debido a la alta frecuencia de complejos clonales mundialmente distribuidos puede ocasionar sesgo al estimar tasas de recombinación y mutación (**Smith, et al., 1993**), fenómeno observado en *E. coli*, *S. aureus* y *H. Influenzae* (**Vos M. and Didelot X, 2009**). Además, se ha observado que la adquisición de regiones génicas mediante recombinación, ocasionan una distribución genética similar, característica observada en géneros bacterianos estrechamente relacionados como *Pseudomonas* (**Schmidt et al., 1996**). Por lo que, el valor de $r/m = 1.22$, encontrado en este estudio, no está alejado de valores encontrados en especies hermanas como *P. viridiflava* con $r/m = 2.0$ y *P. syringae* con $r/m = 1.5$ (**Vos M. y Didelot X. 2009**).

Las dinámicas entre la recombinación y las mutaciones son complejas y pueden cambiar, incluso, entre diferentes linajes de una misma especie (**Feil and Spratt, 2001; Denamur et al., 2000; Didelot and Maiden 2010**). La estructura genética encontrada obedece a diferentes linajes con frecuencias de recombinación diferentes (**Figura 4**). Por ejemplo, en el filogrupo-1 ($r/m = 2.35$) y 3 ($r/m = 5.73$) la recombinación es más frecuente que las mutaciones. Contrariamente al filogrupo-2 ($r/m = 0.47$), en el que las mutaciones son la principal fuente de diversidad (**Figura 4**). Por otro lado, en el filogrupo-2 se encuentra el Cc235 y el Cc309 (**Figura 2**), la presencia de complejos clonales de amplia distribución puede ocasionar bajas frecuencias de recombinación. No obstante, se observa que la recombinación es más frecuente dentro de algunos filogrupos y prácticamente no sucede entre ellos.

Las diferencias en la recombinación y mutación pueden reflejarse en los índices de diversidad nucleotídica (π y θ). En este estudio observamos que los valores obtenidos en π y θ (**Tabla 2**) son bajos. Sin embargo, son comparables a los valores obtenidos por **Aguilar-Rodea. et al., 2017** en aislados mexicanos. Incluso, son valores similares a los encontrados por **Maatallah et al. 2011**, en aislados del Mediterráneo. En conjunto, lo anterior sugiere que, aunque la recombinación existe dentro de algunos filogrupos, no es tan frecuente como para romper los linajes clonales.

Es evidente que el filogrupo-1 tiene una frecuencia de recombinación casi cinco veces más alta que el filogrupo-2. Esta diferencia llama la atención ya que se han observado diferencias en la tasa de recombinación entre linajes asociadas con la virulencia. Por ejemplo, el caldo de *M. catarrhalis* conformado por aislados sero-resistentes, el cual incluye a la mayoría de las cepas virulentas, tiene una frecuencia de recombinación seis veces más alta que el resto de la población (**Wirth, T. et al., 2007**). Diferencias del mismo orden de magnitud se han observado en el linaje II comparado con el linaje I en *L. monocytogenes* (**den Bakker, H.C. et al., 2008**; **Orsi, R. et al., 2008**). También, se han visto estas diferencias en las frecuencias de recombinación entre los linajes hiperinvasivos de *N. meningitidis* (**Didelot and Maiden, 2010**).

8. Conclusiones.

En el presente estudio, llevamos a cabo un estudio de genética de poblaciones utilizando un enfoque MLST y realizamos un perfil de resistencia a antibióticos en una colección mexicana de *P. aeruginosa*, en la cual analizamos 158 aislamientos de hospitales de la Ciudad de México. Dado el tamaño de la colección, suponemos que representa la dinámica evolutiva de los patógenos oportunistas en las ciudades superpobladas de los países en desarrollo, donde las enfermedades infecciosas y la resistencia a los antibióticos son importantes problemas de salud pública.

En general, nuestros resultados concuerdan con estudios previos sobre estructura epidémica de *P. aeruginosa* que está representada por Ccs distribuidas globalmente, así como la existencia de tres filogroups principales, que no están correlacionados con rasgos ambientales.

Las fuerzas selectivas o presiones impuestas por las condiciones ambientales a las que están expuestos los organismos son importantes para estructurar sus poblaciones, sin embargo, en este estudio no encontramos una correlación entre la estructura de la población y algunos de los parámetros ambientales analizados. Incluso cuando se observa la expresión fenotípica (es decir, resistencia a antibióticos) de las presiones selectivas históricas de la exposición a antibióticos (**Figura 2**), no se encontró alguna correlación con la estructura de la población genética. Esta falta de asociación podría ser el resultado de los genes seleccionados para los análisis (housekeeping), por lo que prometen caminos para comprender la dinámica ecológica de los filogrupos de *P. aeruginosa* y los Ccs incluyen estudios genómicos de población que capturan la diversidad más allá de los genes housekeeping.

Finalmente, es importante reflexionar sobre las causas que hacen que los países menos desarrollados se conviertan en puntos críticos de resistencia a los antibióticos, considerando los aspectos multifactoriales del contexto sociopolítico de

dichos países que incluyen, pero no se limitan a, implementación de políticas públicas y cumplimiento acceso a antibióticos, así como la educación del personal de salud y muchos otros obstáculos relacionados con la pobreza y el acceso desigual a los servicios de salud y la información (**Amabile-Cuevas, 2010; Dreser et al., 2008, Dreser et al. 2012; Planta, 2007**).

9. Perspectivas.

La estructura genética de *P. aeruginosa* no está relacionada con el origen de aislamiento. Los aislados clínicos no representan poblaciones distintas a las poblaciones ambientales. De esta manera, puede ser más relevante determinar una estructura genética tomando en cuenta las características ambientales. Por lo que se recomienda incluir en futuros análisis aislados de diferentes orígenes ambientales para determinar la estructura genética de *P. aeruginosa*.

10. Referencias.

1. Achtman M. (2008). Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol* 62:53-70. doi: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162832.
2. Agodi A, Barchitta M, Cipresso R, Giaquinta L, Romeo MA, Denaro C. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* carriage, colonization, and infection in ICU patients. *Intensive Care Med.* 33(7):1155-1161. doi: 10.1007/s00134-007-0671-6.
3. Aguilar-Rodea P, Zúñiga G, Rodríguez-Espino BA, Olivares Cervantes AL, Gamiño Arroyo AE, Moreno-Espinosa S, de la Rosa Zamboni D, López Martínez B, Castellanos-Cruz MD, Parra-Ortega I, Jiménez Rojas VL, Viguera Galindo JC, and Velázquez-Guadarrama N. (2017). Identification of extensive drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains: New clone ST1725 and high-risk clone ST233. *PLoS One*, 12(3):e0172882. doi: 10.1371/journal.pone.0172882.
4. Alonso-Aguilar NM, Juarez-Enriquez SR, Castro-Escarpulli G, Rivera G, Bocanegra-García V, Guo X, Luna-Herrera J, and Aguilera-Arreola MG. (2017). Aetiology and Significance of Hospital-Acquired Infections in Mexico. *Clin Lab*, 63(2):207-218. doi: 10.7754/Clin.Lab.2016.151119.
5. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. (2006). Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* 50(1):43-8. DOI: 10.1128/AAC.50.1.43-48.2006.
6. Amabile-Cuevas C. (2010). Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *J. Infect. Dev. Ctries.* 4(3):126–131. PMID: 20351451

7. Ausina RV and Moreno GS. (2006). Tratado de SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Editorial Médica Panamericana; Madrid, España.
8. Berezin EN, Solórzano F; Latin America Working Group on Bacterial Resistance. (2014). Gram-negative infections in pediatric and neonatal intensive care units of Latin America. *J Infect Dev Ctries*, 8(8):942-53. doi: 10.3855/jidc.4590.
9. Berthelot P, Grattard F, Mahul P, Pain P, Jospé R, Venet C, Carricajo A, Aubert G, Ros A, Dumont A, Lucht F, Zéni F, Auboyer C, Bertrand JC, Pozzetto B. (2001). Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med*. 2001 Mar;27(3):503-12.
10. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, and Bartlett J. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 1;48(1):1-12. doi: 10.1086/595011.
11. Boyd A, and Chakrabarty AM. (1996). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *J Ind Microbiol*. 15(3):162-8. PMID: 8519473.
12. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, Rodríguez C, Moyà B, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver A; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). (2012). Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(12):6349-57. doi: 10.1128/AAC.01388-12.

13. Chen WP, and Kuo TT. (1993). TTA simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 21(9): 2260
PMID: 8502576
14. Cies JJ, Moore WS 2nd, Chopra A, Lu G, Mason RW. (2015). Stability of furosemide and chlorothiazide stored in syringes. *Am J Health Syst Pharm.* 5;72(24):2182-8. doi: 10.2146/ajhp150023. PMID: 26637518
15. Codjoe FS, and Donkor ES. (2017). Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci Base.* 6(1):1-28 doi: 10.3390/medsci6010001
16. Cornelis P, and Dingemans J. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Frot Cell Infect Microbiol,* 14;3:75. doi: 10.3389/fcimb.2013.00075.
17. Corona-Nakamura AL, Miranda Novales MG, Leños-Miranda B, Portillo-Gómez L, Hernández-Chávez A, Anthor-Rendón J, Aguilar Benavides S. (2001). Epidemiologic Study of *Pseudomonas aeruginosa* in critical patients and reservoirs. *Arch Med Res,* 32(3):238-42.
18. Cramer N, Klockgether J, Wrasman K, Schmidt M, Davenport CF, Tümmler B. (2011). Microevolution of the major common *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14 in cystic fibrosis lungs. *Environ Microbiol.* 13(7):1690-704. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02483.x.
19. Cullen L, and McClean S. (2015). Bacterial Adaptation during Chronic Respiratory Infections. *Pathogens* 4(1):66-89. doi: 10.3390/pathogens4010066.
20. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, and Dowson CG. (2004). Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 42(12):5644-9.

21. Davies J, and Davies D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 74(3):417-33.
22. Denamur E, Lecointre G, Darlu P, Tenailon O, Acquaviva C, Sayada C, Sunjevaric I, Rothstein R, Elion J, Taddei F, Radman M, Matic I. (2000). Evolutionary implications of the frequent horizontal transfer of mismatch repair genes. *Cell.* 103(5):711-21. PMID: 11114328.
23. den Bakker HC, Didelot X, Fortes ED, Nightingale KK, and Wiedmann M. (2008). Lineage specific recombination rates and microevolution in *Listeria monocytogenes*. *BMC Evol Biol.* 8:277. doi: 10.1186/1471-2148-8-277. PMID: 18842152
24. Didelot X, and Falush D. (2007). Inference of bacterial microevolution using multilocus sequence data. *Genetics*, 175(3):1251-66. PMID: 17151252.
25. Didelot X, and Maiden MC. (2010). Impact of recombination on bacterial evolution. *Trends Microbiol*, 18(7):315-22. doi: 10.1016/j.tim.2010.04.002.
26. Dreser A, Wirtz VJ, Corbett KK, and Echániz G. (2008). Antibiotic use in Mexico: review of problems and policies. *Salud Publica Mex.* 50 (Suppl. 4), S480–S487.
27. Dreser A, Vázquez-Vélez E, Treviño S and Wirtz VJ. (2012). Regulation of antibiotic sales in Mexico: an analysis of printed media coverage and stakeholder participation. *BMC Public Health* 2012, 12:1051
28. Empel J, Filczak K, Mrówka A, Hryniewicz W, Livermore DM, and Gniadkowski M. (2007). Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. *J Clin Microbiol*, 45(9):2829-34. PMID: 17634312

29. Evanno G, Regnaut S, and Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol*, 14(8):2611-20. PMID: 15969739.
30. Falagas ME and Bliziotis IA (2007). Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era?. *Int J Antimicrob Agents*. 29(6):630-6. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2006.12.012
31. Feil EJ, and Spratt BG. (2001). Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol*, 55:561-90. PMID: 11544367
32. Feil EJ. (2004). Small change: keeping pace with microevolution. *Nat Rev Microbiol*. 2(6):483-95.
33. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, and Spratt BG. (2004). eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 186(5):1518-30.
34. Founou RC, Founou LL, and Essack SY. (2017). Clinical and economic impact of antibiotic resistance in developing countries: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 12(12):e0189621. doi: 10.1371/journal.pone.0189621
35. Freschi L, Jeukens J, Kukavica-Ibrulj I, Boyle B, Dupont MJ, Laroche J, Larose S, Maaroufi H, Fothergill JL, Moore M, Winsor GL, Aaron SD, Barbeau J, Bell SC, Burns JL, Camara M, Cantin A, Charette SJ, Dewar K, Déziel É, Grimwood K, Hancock RE, Harrison JJ, Heeb S, Jelsbak L, Jia B, Kenna DT, Kidd TJ, Klockgether J, Lam JS, Lamont IL, Lewenza S, Loman N, Malouin F, Manos J, McArthur AG, McKeown J, Milot J, Naghra H, Nguyen D, Pereira SK, Perron GG, Pirnay JP, Rainey PB, Rousseau S, Santos PM, Stephenson A, Taylor V, Turton JF, Waglechner N, Williams P, Thrane SW, Wright GD, Brinkman FS,

- Tucker NP, Tümmler B, Winstanley C, and Levesque RC. (2015). Clinical utilization of genomics data produced by the international *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *Front Microbiol*, 6:1036. doi: 10.3389/fmicb.2015.01036
36. Frimmersdorf E, Horatzek S, Pelnikevich A, Wiehlmann L, and Schomburg D. (2010). How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. *Environ Microbiol*, 12(6):1734-47. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02253.x.
37. Fu YX, and Li WH (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133:693–709.
38. Gagneux S, Small PM. (2007). Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *Lancet Infect Dis*. 7(5):328-37. PMID: 17448936
39. Galle M, Carpentier I, and Beyaert R. (2012). Structure and function of the Type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protein Pept Sci* 13(8):831-42. PMID: 23305368.
40. García-Rodríguez JA and Picazzo JJ. (1996). *Pseudomonas* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. *Microbiología Médica*; Madrid, España.
41. Grosso-Becerra MV, Santos-Medellín C, González-Valdez A, Méndez JL, Delgado G, Morales-Espinosa R, Servín-González L, Alcaraz LD, Soberón-Chávez G (2014) *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC-Genomics* 15: 318. doi: 10.1186/1471-2164-15-318.
42. Guttman DS, Morgan RL, Wang PW. (2008). *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens-Identification, Epidemiology and Genomics, Springer Science and Business Media, Agadir, Morocco, 433.

43. Hakemi Vala M, Hallaizadeh M, Hashemi A, Goudarzi H, Tarhani M, Sattarzadeh Tabrizi M, and Bazmi F. (2024). Detection of Ambler class A, B and D β -lactamases among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from burn patients. *Ann Burns Fire Disasters* 27(1):8-13 PMID: 25249841.
44. Hartl, Daniel L., Clark, Andrew G., 2007. *Principles of Population Genetics*, 4th Edn. XV Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (652 pp.).
45. Hedrick PW. (2011). *Genetics of Populations* Jones & Bartlett Publishers.
46. Hirsch EB, and Tam VH. (2010). Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*, 10(4):441-51. doi: 10.1586/erp.10.49.
47. Hunt, D.E., David, L.A., Gevers, D., Preheim, S.P., Alm, E.J., Polz, M.F., 2008. Resource partitioning and sympatric differentiation among closely related bacterioplankton. *Science* 320, 10811085. DOI: 10.1126/science.1157890
48. Infectious Diseases Society of America. (2010). The 10 x '20 Initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020. *Clin Infect Dis*. 15;50(8):1081-3. doi: 10.1086/652237.
49. James CE, Fothergill JL, Kalwij H, Hall AJ, Cottell J, Brockhurst MA, and Winstanley C. (2012). Differential infection properties of three inducible prophages from an epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol*. 2012 Sep 21;12:216. doi: 10.1186/1471-2180-12-216.
50. Johnson LE, D'Agata EM, Paterson DL, Clarke L, Qureshi ZA, Potoski BA, Peleg AY. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia over a 10-year period:

multidrug resistance and outcomes in transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 11(3):227-34. doi: 10.1111/j.1399-3062.2009.00380.x. PMID: 19302282

51. Joo EJ, Kang CI, Ha YE, Kim J, Kang SJ, Park SY, Lee NY, Wi YM, Chung DR, Peck KR, Song JH. (2011). Clinical predictors of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia among Gram-negative bacterial infections in non-neutropenic patients with solid tumor. *J Infect.* 2011 63(3):207-14. doi: 10.1016/j.jinf.2011.06.011. PMID: 21777616.

52. Kidd TJ, Ritchie SR, Ramsay KA, Grimwood K, Bell SC, and Rainey PB. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* exhibits frequent recombination, but only a limited association between genotype and ecological setting. *PLoS One.* 2012;7(9):e44199. doi: 10.1371/journal.pone.0044199.

53. Kiewitz C, Tümmler B. (2000). Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution. *J Bacteriol.* 82(11):3125-35. PMID: 10809691

54. Kos VN, Déraspe M, McLaughlin RE, Whiteaker JD, Roy PH, Alm RA, Corbeil J, and Gardner H. (2015). The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother,* 59(1):427-36. doi: 10.1128/AAC.03954-14. PMID: 25367914

55. Lansang MA, Lucas-Aquino R, Tupasi TE, et al. Purchase of antibiotics without prescription in Manila, the Philippines. Inappropriate choices and doses. *J Clin Epidemiol.* 1990;43:61–7.

56. Lavery G, Gorman SP, and Gilmore BF. (2014). Biomolecular Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilm Formation. *Pathogens,* 18;3(3):596-632. doi: 10.3390/pathogens3030596.

57. Laxminarayan R, and Heyman DL. (2012). Challenges of drug resistance in the developing world. *BMJ*, 344:e1567. doi: 10.1136/bmj.e1567.
58. Lessa EP, Cook JA, Patton JL. (2003). Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the Late Quaternary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(18):10331-4. PMID: 12913123
59. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Res*, 39:W475-8. doi: 10.1093/nar/gkr201. PMID: 21470960
60. Lieberman TD, Flett KB, Yelin I, Martin TR, McAdam AJ, Priebe GP, Kishony R. (2014). Genetic variation of a bacterial pathogen within individuals with cystic fibrosis provides a record of selective pressures. *Nat Genet* 46(1):82-7. doi: 10.1038/ng.2848.
61. Li W, Cowley A, Uludag M, Gur T, McWilliam H, Squizzato S, Park YM, Buso N and Lopez R. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res* 43: W580–W584 doi: [10.1093/nar/gkv279](https://doi.org/10.1093/nar/gkv279)
62. Maatallah M, [Cheriaa J](#), [Backhrouf A](#), [Iversen A](#), [Grundmann H](#), [Do T](#), [Lanotte P](#), [Mastouri M](#), [Elghmati MS](#), [Rojo F](#), [Mejdi S](#), and [Giske CG](#). (2011). Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. *PLoS One* 6(10):e25617. doi: 10.1371/journal.pone.0025617
63. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, Lynfield R, Maloney M, McAllister-Hollod L, Nadle J, Ray SM, Thompson DL, Wilson LE, Fridkin SK, Emerging Infections Program Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use Prevalence Survey Team.

- (2014). Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med*, 370(13):1198-208. doi: 10.1056/NEJMoa1306801
64. Magill SS, Rhodes B, and Klompas M. (2014). Improving ventilator-associated event surveillance in the National Healthcare Safety Network and addressing knowledge gaps: update and review. *Curr Opin Infect Dis*. 2014 Aug;27(4):394-400. doi: 10.1097/QCO.0000000000000083. PMID: 24945615
65. Magiorakos AP et al., (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
66. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, and Spratt BG. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(6):3140-5.
67. Maiden MC. (2006). Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60:561-88. DOI:10.1146/annurev.micro.59.030804.121325 PMID: 14973027
68. Maiden MC, Ibarz-Pavón AB, Urwin R, Gray SJ, Andrews NJ, Clarke SC, Walker AM, Evans MR, Kroll JS, Neal KR, Ala'aldeen DA, Crook DW, Cann K, Harrison S, Cunningham R, Baxter D, Kaczmarek E, Maclennan J, Cameron JC, Stuart JM. (2008). Impact of meningococcal serogroup C conjugate vaccines on carriage and herd immunity. *J Infect Dis*. 197(5):737-43. doi: 10.1086/527401.
69. Mandell GL, Bennett JE, and Dolin R. (2010). *Principles and Practice of Infectious Diseases (PPID)*, Elsevier, Philadelphia, PA.

70. Martin K, Baddal B, Mustafa N, Perry C, Underwood A, Constantidou C, Loman N, Kenna DT, Turton JF. (2013). Clusters of genetically similar isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from multiple hospitals in the UK. *J Med Microbiol.* 62(Pt 7):988-1000. doi: 10.1099/jmm.0.054841-0.
71. Marvig RL, Damkiær S, Khademi SM, Markussen TM, Molin S, and Jelsbak L. Within-host evolution of *Pseudomonas aeruginosa* reveals adaptation toward iron acquisition from hemoglobin. *MBio.* 2014 May 6;5(3):e00966-14. doi: 10.1128/mBio.00966-14.
72. Mathee K, Narasimhan G, Valdes C, Qiu X, Matewish JM, Koehrsen M, Rokas A, Yandava CN, Engels R, Zeng E, Olavarietta R, Doud M, Smith RS, Montgomery P, White JR, Godfrey PA, Kodira C, Birren B, Galagan JE, and Lory S. (2008). Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc Natl Acad Sci*, 105(8):3100-5. doi: 10.1073/pnas.0711982105.
73. Mauch RM, Jensen PO, Moser C, Levy CE, Hoiby N. (2018). Mechanisms of humoral immune response against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 17(2):143-152. doi: 10.1016/j.jcf.2017.08.012.
74. McCarthy K. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*: evolution of antimicrobial resistance and implications for therapy. *Semin Respir Crit Care Med*, 36(1):44-55. doi: 10.1055/s-0034-1396907. PMID: 25643270.
75. Moradali MF, Ghods S, and Rehm BH. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol*, 15;7:39. doi: 10.3389/fcimb.2017.00039.
76. Morales-Espinosa R, Delgado G, Espinosa LF, Isselo D, Méndez JL, Rodriguez C, Miranda G, and Cravioto A. (2017). 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.* 8:313 doi: 10.3389/fmicb.2017.00313.

77. Morales-Espinosa R, Soberón-Chávez G, Delgado-Sapie'n G, Sandner-Miranda L, Méndez JL, et al. (2012) Genetic and Phenotypic Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* Population with High Frequency of Genomic Islands. *PLoS ONE* 7(5): e37459. doi:10.1371/journal.pone.0037459.
78. Morgan JE, and Chandna A. (1995). Intraocular pressure after peribulbar anaesthesia: is the Honan balloon necessary?. *Br J Ophthalmol* 79(1):46-9. PMID: PMC505019.
79. Morgan DJ, Okeke IN, Laxminarayan R, Perencevich EN, and Weisengerg S. (2011). Non-prescription antimicrobial use worldwide: a systematic review. *Lancet Infect Dis*, 11(9):692-701. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70054-8.
80. Mulcahy H, Sibley CD, Surette MG, and Lewenza S. (2011). *Drosophila melanogaster* as an animal model for the study of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections in vivo. *PLoS pathogens*, 7(10)
81. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, and Pfaller MA. (2003). *Pseudomonas y microorganismos relacionados*; Elsevier, Microbiología Médica; Madrid, España.
82. National Guideline Alliance (UK). (2017). *Cystic Fibrosis: Diagnosis and management*. London: National Institute for Health and Care Excellence (UK); National Institute for Health and Care Excellence: Clinical Guidelines. PMID: 29106796

83. Nguyen D, and Singh PK. (2006). Evolving stealth: genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections. *Proc Natl Acad Sci* 30;103(22):8305-6. PMID: 16717189
84. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, and Juan C. (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat.* 21-22:41-59. doi: 10.1016/j.drug.2015.08.002.
85. Orsi RH, Borowsky ML, Lauer P, Young SK, Nusbaum C, Galagan JE, Birren BW, Ivy RA, Sun Q, Graves LM, Swaminathan B and Wiedmann M. (2008). Short-term genome evolution of *Listeria monocytogenes* in a non-controlled environment *BMC Genomics.* 9:539. doi: 10.1186/1471-2164-9-539.
86. O'Sullivan BP, and Freedman SD. (2009). Cystic fibrosis. *Lancet,* 30;373(9678):1891-904. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60327-5.
87. Pérez-Losada M, Browne EB, Madsen A, Wirth T, Viscidi RP, and Crandall KA. (2006). Population genetics of microbial pathogens estimated from multilocus sequence typing (MLST) data. *Infect Genet Evol.* 6(2):97-112. PMID: 16503511
88. Pirnay JP, De Vos D, Cochez C, Bilocq F, Vanderkelen A, Zizi M, Ghysels B, and Cornelis P. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays an epidemic population structure. *Environ Microbiol.* 4(12):898-911. PMID: 12534471
89. Pirnay JP, Bilocq F, Pot B, Cornelis P, Zizi M, Van Eldere J, Deschaght P, Vaneechoutte M, Jennes S, Pitt T, De Vos D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS One,* 13;4(11):e7740. doi: 10.1371/journal.pone.0007740.
90. Planta MB. (2007). The role of poverty in antimicrobial resistance. *J Am Board Fam Med.* 20(6):533-9.

91. Poole K. (2001). Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 3(2):255-64 PMID: 11321581
92. Posada D, and Crandall KA. (1998). MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14(9):817-8. PMID: 9918953
93. Pritchard JK, Stephens M, and Connelly P. (2002). Pritchard Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2):945-59. PMID: 10835412.
94. Rada B and Leto TL. (2012). Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. *Trends Microbiol*, 21(2):73-81 doi: 10.1016/j.tim.2012.10.004.
95. Rahme LG, Tan M-W, Le L, Wong SM, Tompkins RG, Calderwood SB, and Ausubel FM. (1997). Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 25(94):13245-13250.
96. Ramachandran G. (2014). Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: a brief review. 5(1):213-8. doi: 10.4161/viru.27024.
97. Rice LB. (2009). The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Curr Opin Microbiol*. 12(5):476-81. doi: 10.1016/j.mib.2009.08.001. Epub 2009 Aug 27.
98. Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messenguer X, and Rozas R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19(18):2496-7

99. Schechner V, Gottesman T, Schwartz O, Korem M, Maor Y, Rahav G, Karplus R, Lazarovitch T, Braun E, Finkelstein R, Lachish T, Wiener-Well Y, Alon D, Chowers M, Bardenstein R, Zimhony O, Paz A, Potasman I, Giladi M, Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Hochman M, Marchaim D, and Carmeli Y. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia upon hospital admission: risk factors for mortality and influence of inadequate empirical antimicrobial therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 71(1):38-45. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.05.010. PMID: 21763093
100. Schmidt K. D., Tümmler B., Römling U. (1996). Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats. *J. Bacteriol.* 178, 85–93 PMID: 8550447
101. Silby MW, Winstanley C, Godfrey SA, Levy SB and Jackson I. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable, *FEMS Microbiology Reviews* 35(4):652-680.
102. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. (2006). Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev,* 19(3):512-30.
103. Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. (1993). How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:4384–4388.
104. Spiers AJ, Buckling A, and Rainey PB. (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* 146 (10):2345-50.
105. Stamatakis A, Hoover P, and Rougemont J. (2008). A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Syst Biol,* 57(5):758-71. doi: 10.1080/10635150802429642.

106. Stewart L, Ford A, Sangal V, Jeukens J, Boyle B, Kukavica-Ibrulj I, Caim S, Crossman L, Hoskisson PA, Levesque R, and Tucker NP. (2014). Draft genomes of 12 host-adapted and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and their positions in the core genome phylogeny. *Pathog Dis.* 71(1):20-5. doi: 10.1111/2049-632X.12107.
107. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S and Olson MV. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799):959-64.
108. Tan MW, and Ausubel FM. (2000). *Caenorhabditis elegans*: a model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Current opinion in microbiology*, 3(1):29-34.
109. Thuong M, Arvaniti K, Ruimy R, de la Salmonière P, Scanvic-Hameg A, Lucet JC, Régnier B. (2003). Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and risk factors for carriage acquisition in an intensive care unit. *J Hosp Infect*, 53(4):274-82. PMID: 12660124.
110. Tibayrenc M, 2017. *Genetics and Evolution of Infectious Diseases*, second edition xvii Elsevier, Amsterdam; Boston (667 pp.).
111. Tümmler B, Wiehlmann L, Klockgether J, Cramer N. (2014). Advances in understanding *Pseudomonas*. *F1000Prime Rep.* 6:9. doi: 10.12703/P6-9.

112. Treepong P, Kos VN, Guyeux C, Blanc DS, Bertrand X, Valot B, and Hocquet D. (2018). Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. *Clin Microbiol Infect Clin Microbiol*, 24(3):258-266. doi: 10.1016/j.cmi.2017.06.018.
113. Turton JF, Wright L, Underwood A, Witney AA, Chan YT, Al-Shahib A, Arnold C, Doumith M, Patel B, Planche TD, Green J, Holliman R, and Woodford N. (2015), High-Resolution Analysis by Whole-Genome Sequencing of an International Lineage (Sequence Type 111) of *Pseudomonas aeruginosa* Associated with Metallo-Carbapenemases in the United Kingdom. *J Clin Microbiol*, 53(8):2622-31. doi: 10.1128/JCM.00505-15. PMID: 26041902
114. Ur Rahman S, Ali T, Ali I, Khan NA, Han B, and Gao J. (2018). The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. *Biomed Res Int*, doi: 10.1155/2018/9519718.
115. Vorhölter FJ, Tielen P, Wibberg D, Narten M, Schobert M, Tüpker R, Blom J, Schatschneider S, Winkler A, Albersmeier A, Goesmann A, Pühler A, and Jahn D. (2015). Genome Sequence of the Urethral Catheter Isolate *Pseudomonas aeruginosa* MH19. *Genome Announc*, 3(2). doi: 10.1128/genomeA.00115-15.
116. Vos M, Didelot X. (2009). A comparison of homologous recombination rates in bacteria and archaea. *ISME J*, 3(2):199-208. doi: 10.1038/ismej.2008.93.
117. Wiehlmann L, Wagner G, Cramer N, Siebert B, Gudowius P, Morales G, Köhler T, van Delden C, Weinel C, Slickers P, and Tümmler B. (2007). Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(19):8101-6. DOI: 10.1073/pnas.0609213104

118. Wiehlmann L, Cramer N, Tümmler B. (2015). Habitat-associated skew of clone abundance in the *Pseudomonas aeruginosa* population. *Environ Microbiol Rep.* 2015 Dec;7(6):955-60. doi: 10.1111/1758-2229.12340.
119. Wirth T, Morelli G, Kusecek B, van Belkum A, van der Schee C, Meyer A, and Achtman M. (2007). The rise and spread of a new pathogen: seroresistant *Moraxella catarrhalis*. *Genome Res.* 2007 Nov;17(11):1647-56. PMID: 17895425
120. Wirtz VJ, Taxis K, and Dresser A. (2009). Pharmacy customers' knowledge of side effects of purchased medicines in Mexico. *14(1):93-100.* doi: 10.1111/j.1365-3156.2008.02186.x.
121. Yetkin G, Otlu B, Cicek A, Kuzucu C, Durmaz R. (2006). Clinical, microbiologic, and epidemiologic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a University Hospital, Malatya, Turkey. *Am J Infect Control*, 34(4):188-92. PMID: 16679175 DOI: [10.1016/j.ajic.2005.11.010](https://doi.org/10.1016/j.ajic.2005.11.010)
122. Yong VFL, Sho MM, Jaggi TK, Mac Aogáin M, and Chotirmall SH. (2018). The Microbial Endocrinology of *Pseudomonas aeruginosa*: Inflammatory and Immune Perspectives. *Arch Immunol ther Exp (Warsz)* doi: 10.1007/s00005-018-0510-1.
123. Zarb P, Coignard B, Griskeviciene J, Muller A, Vankerckhoven V, Weist K, Goossens M, Vaerenberg S, Hopkins S, Catry B, Monnet D, Goossens H, Suetens C. (2012). The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. National Contact Points for the ECDC pilot point prevalence survey; Hospital Contact Points for the ECDC pilot point prevalence survey. *Euro Surveill.* 15;17(46). PMID: 23171822

124. Zhang L, Hinz AJ, Nadeau JP, Mah TF. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* tssC1 links type VI secretion and biofilm-specific antibiotic resistance. *J Bacteriol*, 193(19):5510-3. doi: 10.1128/JB.00268-11. PMID: 21784934

125. Zhang L, Fritsch M, Hammond L, Landreville R, Slatculescu C, Colavita A, and Mah TF. (2013). Identification of genes involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-specific resistance to antibiotics. *PLoS One* 8(4):e61625. doi: 10.1371/journal.pone.0061625.

126. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>

127. <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>.

11. Material suplementario.

Tabla Suplementaria S1.

No.	ID	Hospital	Isolation date	Disease	Antibiotic profile	Phylogroup
1	Fc1	INP	September-1996	Sputum/QF	MDR	B
2	Fc2	INP	September-1996	Sputum/QF	MDR	A
3	Fc3	INP	October-1996	Sputum/QF	MDR	A
4	Fc4	INP	November-1996	Sputum/QF	MDR	A
5	Fc5	INP	February-1997	Sputum/QF	MDR	B
6	Fc6	INP	August-1997	Sputum/QF	MDR	A
7	Fc7	INP	August-1997	Sputum/QF	XDR	A
8	Fc8	INP	September-1997	Sputum/QF	XDR	A
9	Fc9	INP	October-1997	Sputum/QF	MDR	A
10	Fc10	INP	February-1997	Sputum/QF	MDR	A
11	Fc11	INP	April-1998	Sputum/QF	XDR	B
12	Fc12	INP	April-1998	Sputum/QF	XDR	A
13	Fc13	INP	April-1998	Sputum/QF	XDR	A
14	Fc14	INP	May-1998	Sputum/QF	MDR	B
15	Fc15	INP	May-1998	Sputum/QF	MDR	B
16	Fc16	INP	June-1998	Sputum/QF	MDR	A
17	Fc17	INP	June-1998	Sputum/QF	MDR	A
18	Fc18	INP	June-1998	Sputum/QF	MDR	A
19	Fc19	INP	June-1998	Sputum/QF	MDR	A
20	Fc20	INP	June-1998	Sputum/QF	MDR	A
21	Fc21	INP	June-1998	Sputum/QF	MDR	A
22	Fc22	INP	August-1998	Sputum/QF	MDR	A
23	Fc23	INP	August-1998	Sputum/QF	MDR	A
24	Fc24	INP	August-1998	Sputum/QF	MDR	A
25	Fc25	INP	October-1998	Sputum/QF	MDR	A

No.	ID	Hospital	Isolation date	Disease	Antibiotic profile	Phylogroup
26	Fc27	INP	November-1998	Sputum/QF	MDR	A
27	Fc28	INP	December-1998	Sputum/QF	MDR	A
28	Fc29	INP	January-1999	Sputum/QF	MDR	A
29	Fc30	INP	January-1999	Sputum/QF	MDR	A
30	Fc31	INP	February-1999	Sputum/QF	MDR	A
31	Fc32	INP	April-1999	Sputum/QF	MDR	A
32	Fc33	INP	April-1999	Sputum/QF	MDR	A
33	Fc34	INP	May-1999	Sputum/QF	MDR	A
34	Fc35	INP	May-1999	Sputum/QF	MDR	A
35	Fc36	INP	May-1999	Sputum/QF	MDR	A
36	Fc38	INP	July-1999	Sputum/QF	MDR	B
37	Fc39	INP	July-1999	Sputum/QF	MDR	B
38	Fc40	INP	July-1999	Sputum/QF	MDR	B
39	Fc41	INP	August-1999	Sputum/QF	MDR	A
40	Fc42	INP	August-1999	Sputum/QF	XDR	A
41	Fc43	INP	August-1999	Sputum/QF	XDR	A
42	Fc44	INP	September-1999	Sputum/QF	MDR	A
43	Fc45	INP	September-1999	Sputum/QF	MDR	A
44	Fc46	INP	September-1999	Sputum/QF	XDR	B
45	Fc49	INP	January-2000	Sputum/QF	MDR	A
46	Fc50	INP	March-2000	Sputum/QF	MDR	A
47	Fc51	INP	April-2000	Sputum/QF	MDR	A
48	Fc52	INP	April-2000	Sputum/QF	MDR	A
49	Fc53	INP	April-2000	Sputum/QF	XDR	B
50	Fc54	INP	May-2000	Sputum/QF	MDR	A
51	Fc55	INP	May-2000	Sputum/QF	MDR	B
52	Fc56	INP	May-2000	Sputum/QF	MDR	B

No.	ID	Hospital	Isolation date	Disease	Antibiotic profile	Phylogroup
53	Fc57	INP	May-2000	Sputum/QF	MDR	B
54	Fc58	INP	May-2000	Sputum/QF	MDR	A
55	Fc59	INP	June-2000	Sputum/QF	MDR	A
56	Fc60	INP	June-2000	Sputum/QF	MDR	A
57	Fc61	INP	June-2000	Sputum/QF	MDR	A
58	Fc62	INP	June-2000	Sputum/QF	XDR	A
59	Fc63	INP	July-2000	Sputum/QF	MDR	A
60	Fc65	INP	August-2000	Sputum/QF	MDR	B
61	Fc66	INP	August-2000	Sputum/QF	MDR	B
62	Fc67	INP	August-2000	Sputum/QF	MDR	B
63	Fc68	INP	September-2000	Sputum/QF	MDR	A
64	Fc69	INP	September-2000	Sputum/QF	MDR	A
65	Fc71	INP	September-2000	Sputum/QF	MDR	B
66	Fc72	INP	September-2000	Sputum/QF	MDR	B
67	Fc73	INP	September-2000	Sputum/QF	MDR	B
68	Fc74	INP	January-2001	Sputum/QF	MDR	A
69	Fc75	INP	January-2001	Sputum/QF	MDR	A
70	Fc76	INP	January-2001	Sputum/QF	MDR	A
71	Fc77	INP	January-2001	Sputum/QF	MDR	A
72	Fc78	INP	January-2001	Sputum/QF	MDR	A
73	Fc79	INP	February-2000	Sputum/QF	MDR	A
74	Fc81	INP	July-2001	Sputum/QF	MDR	A
75	Fc82	INP	March-2001	Sputum/QF	MDR	A
76	Fc83	INP	March-2001	Sputum/QF	MDR	A
77	Fc84	INP	May-2001	Sputum/QF	MDR	B
78	Fc85	INP	July-2001	Sputum/QF	MDR	B

No.	ID	Hospital	Isolation date	Disease	Antibiotic profile	Phylogroup
79	Fc86	INP	November-2001	Sputum/QF	MDR	B
80	Fc87	INP	November-2001	Sputum/QF	MDR	A
81	Fc90	INP	June-2002	Sputum/QF	MDR	A
82	Fc91	INP	June-2002	Sputum/QF	MDR	A
83	Fc94	INP	June-2002	NA	MDR	A
84	Ps1	H1O	NA	Expectoration culture	MDR	A
85	Ps2	H1O	NA	Catheter	MDR	B
86	Ps3	H1O	NA	Urine culture	PDR	A
87	Ps4	H1O	NA	Sepsis/hemoculture	PDR	B
88	Ps5	H1O	NA	Catheter	XDR	B
89	Ps6	H1O	NA	Pharyngeal exudate culture	MDR	A
90	Ps7	H1O	NA	Coproculture	MDR	A
91	Ps8	H1O	NA	Sepsis/hemoculture	XDR	A
92	Ps9	H1O	NA	NA	MDR	C
93	Ps10	H1O	NA	NA	MDR	A
94	Ps11	H1O	NA	Dialysis	MDR	A
95	Ps12	H1O	NA	Ear	MDR	A
96	Ps13	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	B
97	Ps14	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	A
98	Ps15	INP	NA	Sepsis/hemoculture	XDR	A
99	Ps16	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	A
100	Ps17	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	B
101	Ps18	INP	NA	Sepsis/hemoculture	XDR	A
102	Ps19	INP	NA	Sepsis/hemoculture	XDR	A
103	Ps20	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	A
104	Ps21	INP	NA	Sepsis/hemoculture	XDR	A
105	Ps22	INP	NA	Sepsis/hemoculture	PDR	A
106	Ps23	INP	NA	Sepsis/hemoculture	PDR	A

No.	ID	Hospital	Isolation date	Disease	Antibiotic profile	Phylogroup
107	Ps24	INP	NA	Sepsis/hemoculture	PDR	A
108	Ps25	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	B
109	Ps26	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	A
110	Ps27	INP	NA	Sepsis/hemoculture	XDR	B
111	Ps28	INP	NA	Sepsis/hemoculture	XDR	A
112	Ps29	INP	NA	Sepsis/hemoculture	XDR	A
113	Ps30	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	B
114	Ps31	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	B
115	Ps32	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	A
116	Ps33	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	A
117	Ps34	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	B
118	Ps36	INP	NA	Sepsis/hemoculture	XDR	B
119	Ps37	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	B
120	Ps38	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	B
121	Ps39	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	A
122	Ps41	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	B
123	Ps42	INP	NA	Sepsis/hemoculture	XDR	B
124	Ps43	INP	NA	Sepsis/hemoculture	XDR	B
125	Ps44	INP	NA	Sepsis/hemoculture	XDR	B
126	Ps47	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	B
127	Ps50	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	A
128	Ps51	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	A
129	Ps53	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	A
130	Ps54	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	B
131	Ps55	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	B
132	Ps56	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	B
133	Ps58	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	B
134	Ps59	INP	NA	Sepsis/hemoculture	MDR	B
135	H1	HIM	May-2004	Sputum/QF	MDR	B

No.	ID	Hospital	Isolation date	Disease	Antibiotic profile	Phylogroup
136	H4	HIM	September-2005	Renal infection	MDR	A
137	H5	HIM	NA	Peritonitis	MDR	B
138	H7	HIM	May-2005	Sputum/QF	MDR	B
139	H9	HIM	July-2004	Sputum/QF	MDR	A
140	H11	HIM	March-2007	Sepsis/hemoculture	MDR	A
141	H12	HIM	March-2007	Sepsis/hemoculture	PDR	B
142	H13	HIM	NA	Wound infection	MDR	A
143	H14	HIM	April-2007	Renal infection	MDR	B
144	H15	HIM	NA	Gastroschisis	MDR	A
145	H16	HIM	June-2004	Sepsis/hemoculture	MDR	A
146	H17	HIM	February-2006	Sepsis/hemoculture	PDR	B
147	H18	HIM	July-2007	Sepsis/hemoculture	XDR	A
148	H19	HIM	November-2005	Sputum/QF	MDR	B
149	H20	HIM	April-2007	Pneumonia	XDR	A
150	H21	HIM	April-2007	Glioblastom multiform	MDR	A
151	H22	HIM	April-2007	Sepsis/hemoculture	XDR	A
152	H23	HIM	April-2007	Pneumonia	MDR	A
153	H24	HIM	June-2007	Gastroschisis	MDR	B
154	H25	HIM	May-2005	Pneumonia	MDR	A
155	H27	HIM	April-2007	Gastroschisis	MDR	B
156	H29	HIM	April-2007	Gastroschisis	PDR	B
157	H32	HIM	October-2005	Pneumonia	PDR	B
158	H33	HIM	January-2005	Pneumonia	MDR	A

INP: Instituto Nacional de Pediatría.

HIM: Hospital Infantil de México.

H1O: Hospital Primero de Octubre.

MDR: Multi resistente a antibióticos

XDR: Extremadamente resistente a antibióticos

PDR: Pan-resistente a antibióticos

NA: No Disponible

ANEXO

Artículo publicado

Castañeda-Montes FJ, Avitia M, Sepúlveda-Robles O, Cruz-Sánchez V, Kameyama L, Guarneros G, Escalante AE. “*Population structure of Pseudomonas aeruginosa through a MLST approach and antibiotic resistance profiling of a Mexican clinical collection*”. *Infect. Genet. Evol.* 2018 Jul 10;65:43-54. doi: 10.1016/j.meegid.2018.06.009.