



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

**Tipificación molecular de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*
aisladas de pacientes pediátricos con Fibrosis Quística**

QUE PRESENTA LA ALUMNA

Martínez Corona Mónica Berenice

Matrícula

2142034171

ASESORES:

Asesor interno. Dr. Gabriel Ricardo Campos Montes (No. Econ. 34761)

Asesor externo. Dr. Victor Rafael Coria Jiménez (Ced. Prof. 1054088)

México, D.F

02 de septiembre de 2021

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO.....	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
Fibrosis Quística	2
Infecciones pulmonares por <i>P. aeruginosa</i> en pacientes con FQ.....	2
Identificación de infecciones cruzadas entre pacientes con FQ.....	3
Amplificación aleatoria de ADN polimórfico en la tipificación molecular de <i>P. aeruginosa</i>	3
OBJETIVOS.....	4
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	5
METODOLOGÍA	5
Material biológico	5
Condiciones de cultivo de las cepas bacterianas.....	5
Extracción de ADN genómico bacteriano	5
Pureza e integridad del ADN genómico	6
Identificación molecular de <i>P. aeruginosa</i>	6
Tipificación molecular de cepas de <i>P. aeruginosa</i> aisladas de pacientes pediátricos con FQ	8
RESULTADOS	10
Extracción y evaluación de calidad del ADN genómico de las cepas bacterianas	10
Selección de cepas de <i>P. aeruginosa</i>	11
Genotipificación de cepas de <i>P. aeruginosa</i>	11
CONCLUSIÓN.....	18
REFERENCIAS.....	19
Anexos.....	22
Anexo 1 Características demográficas de las cepas <i>P. aeruginosa</i> aisladas de pacientes pediátricos con FQ	22
Anexo 2 Cuantificación y pureza del ADN genómico extraído.....	25
Anexo 3 Visualización de la integridad de ADN genómico extraído de las cepas de <i>P. aeruginosa</i>	27
Anexo 4 Identificación molecular de <i>P. aeruginosa</i>	28
Anexo 5 Huellas génicas de cepas de <i>P. aeruginosa</i> aisladas de pacientes pediátricos con FQ	30

Anexo 6 | Grupos de similitud integrados por una sola cepa de *P. aeruginosa* 34

Anexo 7 | Grupos de similitud integrados por más de una cepa de *P. aeruginosa* 35

INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística (FQ) presenta una ecología polimicrobiana compleja, misma que complica el tratamiento de infecciones respiratorias bacterianas, donde *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) es el patógeno comúnmente aislado de las secreciones respiratorias de los pacientes con FQ (Darch, McNally, *et al.*, 2015). Esta bacteria es considerada un patógeno nosocomial importante, cuya infección crónica se asocia con el incremento de la morbilidad y mortalidad en los pacientes con FQ, debido entre otras características a su capacidad elevada de adquirir resistencia a medicamentos antimicrobianos diversos, tornándose en infecciones muy difíciles de erradicar (Auda *et al.*, 2017). Por ende, es imprescindible la aplicación de la epidemiología molecular para identificar oportunamente brotes infecciosos de *P. aeruginosa*, así como detectar las características moleculares de las cepas, su virulencia, las estructuras responsables de la resistencia a los antibióticos e inclusive dilucidar las rutas de transmisión y diseminación, permitiendo en caso necesario, sugerir medidas para el control de infecciones causadas por esta bacteria (Tapia Conyer, 1997).

MARCO TEÓRICO

Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa es una bacteria que se distribuye ubicuamente en el ambiente y es considerada como un microorganismo oportunista que suele causar infecciones nosocomiales en personas inmunocomprometidas, en individuos con quemaduras graves (O'toole & Kolter, 1998) y pacientes con FQ (Castro *et al.*, 2018).

Esta bacteria posee uno de los genomas bacterianos grandes secuenciados a la fecha y es donde se aloja la base de su versatilidad para adaptarse a ecosistemas diversos, ya que dispone de una plétora de genes que le aportan una resistencia intrínseca sobresaliente contra muchas clases de antibióticos (Amikacina, Ceftazidima, Gentamicina) por mencionar algunos, como genes reguladores involucrados en el catabolismo, transporte y eflujo de compuestos orgánicos, así como sistemas de quimiotaxis. Adicionalmente, tiene una capacidad destacada de

adquirir rápidamente resistencia a fármacos antimicrobianos diversos (Stover et al., 2000).

Otra característica del microorganismo es su capacidad de desarrollar biopelículas, permitiéndole adherirse a superficies diversas, que van desde superficies abióticas (lentes de contacto y líneas de catéter, entre otros) hasta superficies bióticas como el epitelio pulmonar de los pacientes con FQ (O'toole & Kolter, 1998).

Fibrosis Quística

La FQ es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen *CFTR* (Regulador de la Conductancia Transmembranal de la Fibrosis Quística), ocasionando defectos severos en el transporte transepitelial del ion cloruro (Baena del Valle J., & Alegría Gómez C., 2014), generando disfunciones en las glándulas de secreción exocrina del organismo que perjudican primariamente el sistema respiratorio de los pacientes afectados (Anzaudo, Busquets, Ronchi, & Mayoral, 2005).

La composición del moco de las secreciones glandulares y la depuración mucociliar en los pacientes con FQ se encuentran dañadas, resultando en mucosidades densas y pegajosas que otorgan una predisposición mayor a la colonización bacteriana de sus vías aéreas (Baena del Valle J., & Alegría Gómez C., 2014) principalmente por *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus spp.* y *P. aeruginosa* (Anzaudo et al., 2005; Darch, McNally, et al., 2015).

Infecciones pulmonares por *P. aeruginosa* en pacientes con FQ

Los pulmones de los pacientes con FQ son infectados por *P. aeruginosa* desde edades tempranas, donde las cepas aisladas son similares a las encontradas en otros ambientes. Con el objetivo de retrasar el establecimiento de una infección crónica, estos pacientes son sometidos a terapias agresivas con antibióticos, incluso antes de la primera infección por *P. aeruginosa*; sin embargo, la bacteria se adapta a la presencia de los agentes antimicrobianos y al ambiente pulmonar estresante de los pacientes con FQ, generando ciclos intermitentes de infección que requieren una antibiótico-terapia cada vez más agresiva, misma que la bacteria evade, logrando establecer una infección crónica (Cohen & Prince, 2012).

La infección crónica está caracterizada por el desarrollo de biopelículas, que favorecen la selección clonal hacia cepas multirresistentes a los antibióticos (Bouvier, 2016), constituyendo una de las causas de su morbi-mortalidad (Anzaudo *et al.*, 2005), debido a que progresivamente conduce a exacerbaciones respiratorias y a un proceso inflamatorio crónico (Baena del Valle J., & Alegría Gómez C., 2014) que concluye con la muerte de los pacientes infectados (Stover *et al.*, 2000).

Identificación de infecciones cruzadas entre pacientes con FQ

Es ampliamente aceptado que los pacientes con FQ adquieren del ambiente su primera infección con *P. aeruginosa* y que cada paciente infectado es colonizado por una clona personal que persiste durante largos periodos de tiempo (Okur *et al.*, 2019), aunque en pacientes con FQ pertenecientes a una misma familia, es común identificar infecciones cruzadas (Picard *et al.*, 2004).

El surgimiento de cepas con un poder de transmisión resaltante entre pacientes con FQ ha sido reportada en países diversos (Okur *et al.*, 2019), siendo la cepa epidémica de Liverpool (LES, por sus siglas en inglés) la más conocida y que presentaba resistencia elevada a los beta-lactámicos, dificultando su erradicación logrando persistir y transmitirse incluso años subsecuentes a su identificación (Kalferstova *et al.*, 2016) Incluso, algunas cepas epidémicas están relacionadas con un pronóstico pobre y con la necesidad de utilizar antibióticos intravenosos (Okur *et al.*, 2019).

Es evidente la necesidad de identificar de manera temprana el surgimiento de brotes epidemiológicos, mediante las características moleculares de las cepas, su virulencia, las estructuras responsables de su resistencia a los antibióticos, así como la identificación de sus rutas de transmisión y diseminación (Tapia Conyer, 1997), para establecer estrategias de prevención y control de las infecciones (Barnini, Dodi, & Campa, 2004; Pareja Mendoza R., 2011).

Amplificación aleatoria de ADN polimórfico en la tipificación molecular de *P. aeruginosa*

La epidemiología molecular ha permitido establecer la relación genética que existe entre los aislados bacterianos implicados en un brote epidemiológico y útil para

confirmar la fuente de infección o reservorio (Fernández Cuenca F.López Cerero L. & Pascual Hernández A., 2013).

Entre las estrategias más utilizadas para la tipificación de *P. aeruginosa* tenemos la electroforesis en geles de campos pulsados (*PFGE*, por sus siglas en inglés), considerada el “estándar de oro” para la tipificación molecular de esta bacteria, debido a que posee un poder discriminatorio resaltable, aunque requiere de un consumo de tiempo prolongado y un costo elevado.

Por otro lado, la tipificación de secuencias multilocus (*MLST*, por sus siglas en inglés) ha mostrado su utilidad en la diferenciación genética de cepas de *P. aeruginosa*, mediante el análisis de secuencias de fragmentos de siete genes conservados, los cuales presentan variaciones en las secuencias de nucleótidos ocasionadas por las diversas presiones selectivas a las que se enfrentan las bacterias, permitiendo la identificación de microorganismos con genotipos idénticos o altamente relacionados, pero es una estrategia costosa y que requiere de un consumo de tiempo prolongado.

En contraste, la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (*RAPD-PCR*, por sus siglas en inglés) es un método rápido, económico y con reproducibilidad elevada, que permite estimar la diversidad genética y comparar entre cepas aisladas de pacientes diferentes, con resultados similares a los obtenidos con *PFGE* y *MLST* (Baena del Valle J., Alegría Gómez C., 2014; Cercenado E., 2008; Kalferstova *et al.*, 2016).

OBJETIVOS

Objetivo general

Genotipificar cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes pediátricos con fibrosis quística.

Objetivos específicos

- Identificar molecularmente cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes pediátricos con FQ.
- Tipificar por *RAPD-PCR* cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes pediátricos con FQ.

METODOLOGÍA

Material biológico

Se trabajó con tres cepas de referencia de *P. aeruginosa* (ATCC 27853, ATCC 27855 y PAO1), tres cepas no-*P. aeruginosa* que fueron: *Pseudomonas alcaligenes* (*P. alcaligenes*), *Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*) y *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*), así como 130 cepas bacterianas aisladas de secreciones respiratorias de pacientes pediátricos con FQ, atendidos en el servicio de Neumología y Cirugía de Tórax del Instituto Nacional de Pediatría (SNCT-INP), previamente identificadas bioquímicamente como *P. aeruginosa* almacenadas a 4°C en viales de gelosa especial en el cepario del Laboratorio de Bacteriología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría (LBE-INP).

Condiciones de cultivo de las cepas bacterianas

Las cepas de referencia, cepas no-*P. aeruginosa* y cepas de aislados clínicos de pacientes con FQ fueron inoculadas en caldo de infusión de cerebro corazón (BHI. Becton Dickinson®) e incubadas a 37 °C/ 24 h para conformar la fase adaptativa de crecimiento de las cepas. El cultivo resultante se sembró por estría cruzada en placas de agar MacConkey (MC-agar, Becton Dickinson®) y se incubó a 37 °C/ 24 h con la finalidad de obtener colonias aisladas de cada cepa y extraer el ADN genómico de colonias únicas.

Extracción de ADN genómico bacteriano

De las placas de cada cepa se seleccionaron colonias aisladas que fueron inoculadas en 3mL de caldo de BHI, después se incubaron a 37 °C hasta alcanzar

una turbidez equivalente a la del tubo 3 del Nefelómetro de McFarland, el cual fue centrifugado para recuperar las células bacterianas. El botón celular se resuspendió en 200µl de solución salina para posteriormente lisar la membrana celular bacteriana con isotiocianato de guanidina (GES, Sigma-Aldrich®) siguiendo las recomendaciones de autores diversos (Pitcher, Saunders, & Owen, 1989; Riffiani, Sulistinah, & Sunarko, 2015). Posteriormente, se añadieron 500µl de solución de fenol cloroformo-álcool isoamílico (25:24:1) (Sigma-Aldrich®) al producto lisado, después se agitó vigorosamente y se centrifugó. La fase acuosa se trasladó a un microtubo de 1.5 mL y se adicionó cloroformo (Sigma-Aldrich®), repitiendo el proceso de agitación, centrifugación y traslado de la fase acuosa. Finalmente, se añadió isopropanol (Sigma-Aldrich®) para precipitar el ADN genómico, mismo que fue lavado con etanol absoluto, después con etanol al 70% y secado a temperatura ambiente antes de ser hidratado con agua libre de nucleasas.

Pureza e integridad del ADN genómico

El ADN genómico extraído se cuantificó y se evaluó su pureza mediante un espectrofotómetro de UV-Vis (Nanodrop 2000, Spectrophotometer®), aceptando para la relación de absorbancia 260/280, valores ≥ 1.8 y valores de 2.0-2.2 para la relación 260/230, conforme a las recomendaciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific®).

Adicionalmente, las muestras de ADN que cumplieron dichos criterios se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1 % para verificar la integridad del ADN genómico, caracterizado por la presencia de una banda de peso molecular elevado y sin evidencia de degradación.

Las muestras que cumplieron con los criterios de pureza e integridad fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

Identificación molecular de *P. aeruginosa*

La identificación molecular se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*) con un par de iniciadores especie-específicos (PA1 y PA2) (Tabla 1. **Secuencia de iniciadores especie-específicos para *P. aeruginosa***) que amplifican una región del espacio intergénico entre los genes ribosomales 16S-23S (16S-23S

rDNA (ITS)) de *P. aeruginosa* (Viedma, 2014), componente crítico en la función celular y que puede actuar como un cronómetro molecular al presentar un alto grado de conservación. Este par de iniciadores ha demostrado generar amplicones con un peso molecular de 181 pb para esta especie bacteriana (Bou G., Olmos Fernandez A., García C., 2011).

Tabla 1. Secuencia de iniciadores especie-específicos para *P. aeruginosa*

Iniciador	Secuencia	Referencia
PA1	TCCAAACAATCGTCGAAAGC	(Vaněrková et al., 2017)
PA2	CCGAAAATTCGCGCTTGAAC	

Las cepas de referencia y las cepas no-*P. aeruginosa* fueron empleadas como controles positivos y negativos, respectivamente. Las condiciones de amplificación fueron establecidas conforme a las condiciones descritas previamente (Lavenir, Jocktane, Laurent, Nazaret, & Cournoyer, 2007) (Tabla 2. **Condiciones de amplificación del PCR especie-específico de *P. aeruginosa***). Los productos de PCR fueron cargados en geles de agarosa al 1.5% teñido con 0.2 µg/mL de Bromuro de Etidio, montados en una cámara electroforética (MINICELL® EC370M, Electrophoretic gel system) y sometidos a una corriente eléctrica de 90V/1h. Posteriormente los geles fueron trasladados a un transiluminador (White/Ultraviolet Trasiluminator, UVP) para la visualización del amplicón específico para cepas de *P. aeruginosa* y la ausencia de la banda en cepas no *P. aeruginosa*.

Tabla 2. Condiciones de amplificación del PCR especie-específico de *P. aeruginosa*

Fase	Temperatura	Ciclos	Tiempo
Desnaturalización Inicial	95°C	1	5 min
Desnaturalización	94°C	30	30 s
Alineamiento	58°C		30 s
Elongación	72°C		30 s
Elongación Final	72°C	1	10 min
	4°C	1	∞

Tipificación molecular de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes pediátricos con FQ

Las cepas bacterianas identificadas bioquímica y molecularmente como *P. aeruginosa* fueron tipificadas molecularmente mediante *RAPD-PCR* con el iniciador OPY-02 (CATCGCCGCA), bajo las condiciones descritas por Baena del Valle (Tabla 3. **Condiciones de amplificación para la tipificación de cepas de *P. aeruginosa***), mismo que ha demostrado un poder de tipificación sobresaliente para *P. aeruginosa* (Baena del Valle J., Alegría Gómez C., 2014).

Los productos de *PCR* fueron cargados en geles de Acrilamida:Bisacrilamida 19:1 desnaturalizante (UREA 6 M) para ácidos nucleicos al 10% (Soto et al., 2013). Una vez finalizada la corrida y previo a la visualización se prepararon las soluciones necesarias para la tinción con nitrato de plata, conforme a las recomendaciones de Bassam B: Solución fijadora (CH₃COOH al 7.5 %), solución de desarrollo (NaCO₃ al 3 %), solución de paro (CH₃COOH al 7.5 %), solución de formaldehido (CH₂O al 15 %) y solución stock de tiosulfato (Na₂S₂O₃ al 0.4 %) (Bassam & Gresshoff, 2007).

Tabla 3. Condiciones de amplificación para la tipificación de cepas de *P. aeruginosa*

Fase	Temperatura	Ciclos	Tiempo
Desnaturalización Inicial	95°C	1	5 min
Desnaturalización	94°C	30	1 min
Alineamiento	36°C		1 min
Elongación	72°C		1 min
Elongación Final	72°C		1
	4°C	1	∞

La tinción procedió sumergiendo el gel en un recipiente con solución fijadora, incubándolo durante 30 min en agitación constante, bajo esas mismas condiciones el gel se lavó por triplicado con H₂O destilada estéril/2 min, después se añadió la solución de formaldehido e incubó por 10 min, tiempo utilizado para preparar la solución de tinción (AgNO₃ al 0.3 %), misma que fue añadida a la solución y se incubó en agitación constante durante 20 min. Inmediatamente se decantó la solución, el gel fue lavado con H₂O destilada estéril por 10 s. En paralelo, se mezcló

la solución de tiosulfato con la solución de desarrollo, la cual se puso en contacto con el gel durante el tiempo necesario para el revelado de las bandas y para finalizar esa reacción se adicionó la solución de paro del desarrollo (Soto *et al.*, 2013).

Los geles revelados fueron fotodocumentados con ayuda de la luz blanca del transiluminador (White/Ultraviolet Transiluminator, Ultra-Violet Products UVP®). Posteriormente se calcularon los pesos moleculares de los amplicones obtenidos de las huellas génicas de cada cepa de *P. aeruginosa*, mismas que fueron comparadas mediante el índice de similitud de Jaccard (Auda *et al.*, 2017), considerando idénticas a aquellas cepas con un porcentaje de similitud $\geq 85\%$ (Kalferstova, Dedeckova, Antuskova, & Melter, 2015).

RESULTADOS

Extracción y evaluación de calidad del ADN genómico de las cepas bacterianas

Un total de 130 cepas bacterianas aisladas de muestras de secreciones respiratorias de pacientes pediátricos con FQ, previamente identificadas bioquímicamente como *P. aeruginosa* (los datos demográficos están descritos en el Anexo 1) y tres cepas no-*P. aeruginosa*, fueron inoculadas en caldo de BHI, incubadas y seleccionadas conforme a lo enmarcado en el apartado metodológico. El ADN genómico extraído de cada cepa fue cuantificado con un Nanodrop 2000, Spectrophotometer®, obteniendo concentraciones adecuadas (que fueron desde los 160ng/μL hasta 9123ng/μL) y valores de pureza óptimos (Anexo 2), Adicionalmente, su análisis en geles de agarosa demostró una integridad aceptable (Anexo 3) para su uso en los estudios moleculares posteriores.

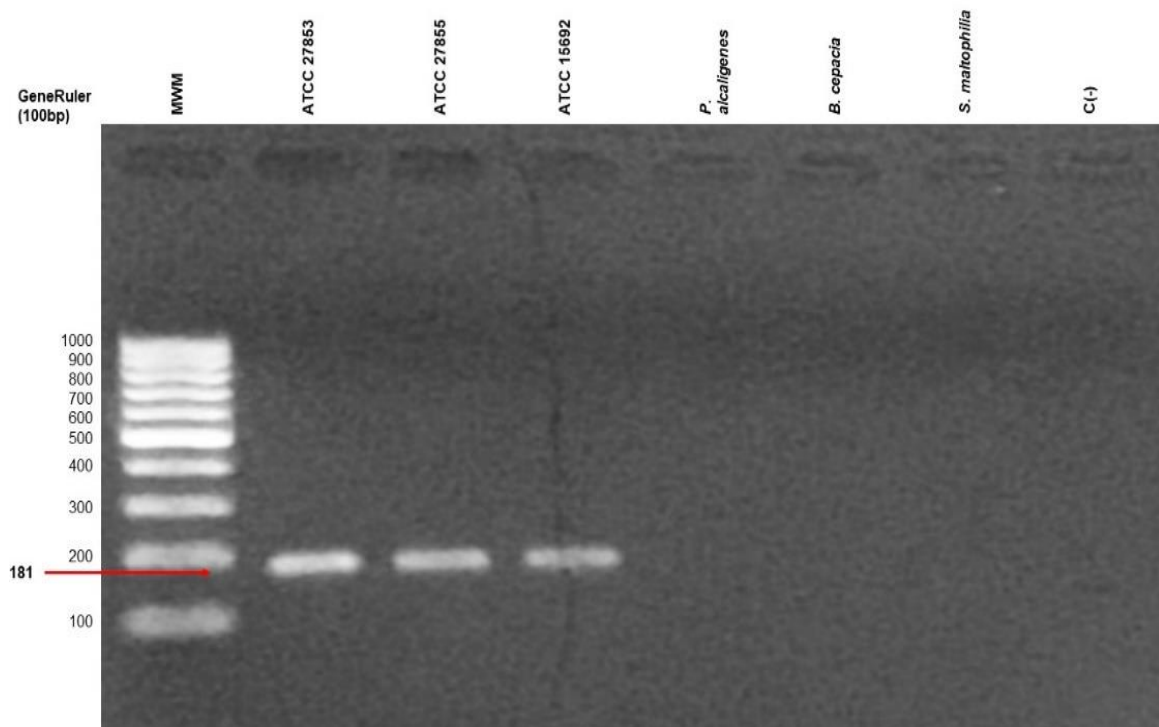


Figura 1. Iniciadores especie-específicos

Se visualiza el amplicón de 181pb en las cepas de referencia y su ausencia en las cepas no-*P. aeruginosa*, así como en el control negativo.

Selección de cepas de *P. aeruginosa*

Inicialmente, los iniciadores PA1 y PA2 utilizados en conjunto con el ADN genómico extraído de las tres cepas de referencia y las tres cepas no-*P. aeruginosa*, mostraron una especificidad adecuada para discriminar entre bacterias de especies y géneros cercanos a *P. aeruginosa*, indicados por la presencia del amplicón específico solo en las cepas ATCC 27853, ATCC27855 y PAO1, así como su ausencia en *P. alcaligenes*, *B. cepacia* y *S. malthophilia* (Figura 1. **Iniciadores especie-**).

La misma metodología fue empleada para la identificación molecular de las cepas provenientes de aislados clínicos, permitiendo descartar 12 cepas que mostraron la ausencia del amplicón específico para *P. aeruginosa* (Anexo 4).

Genotipificación de cepas de *P. aeruginosa*

Un total de 128 cepas identificadas bioquímicamente como *P. aeruginosa* y confirmadas molecularmente mediante PCR, fueron genotipificadas con el iniciador inespecífico OPY-02 y visualizadas como se describió en la metodología (Figura 2), permitiendo el cálculo de 41 pesos moleculares de diferentes amplicones que fueron desde los 200pb hasta los 1000pb.

Los diferentes pesos moleculares de cada amplicón de las huellas génicas permitieron comparar cada cepa y agruparlas conforme al coeficiente de similitud de Jaccard en 40 grupos (Figura 3), 20 de ellos constituidos por una sola cepa donde el 75 % presentaron un fenotipo no mucoide, resaltando cuatro pacientes que presentaron infecciones con clonas diferentes en dos aislamientos subsecuentes distintos (Anexo 6).

Los 20 grupos restantes se conformaron por más de una cepa de 13 pacientes distintos, mostrando una distribución de fenotipo equitativa (49 % mucoides y 51 % no-mucoides) y la existencia de cepas provenientes de un solo proceso de aislamiento de cinco pacientes (2-5 cepas) distribuidas en un mismo grupo de similitud por individuo (Anexo 7).

En adición, se identificaron ocho pacientes con infecciones recurrentes, cuyas cepas se distribuyeron en 20 grupos de similitud y permitieron hacer un seguimiento paulatino de la selección de cada clona causante de la primera infección de esos pacientes detectada en el periodo que se analiza en este trabajo. Específicamente, la cepa Pa02m aislada del Px02 (08/05/2015) sometido a terapia con antibióticos, se mantuvo indetectable durante el segundo y tercer aislamiento (19/02/2016 ,23/02/2016 respectivamente), donde se lograron identificar clonas distintas pertenecientes al grupo de similitud 39 (Pa27ma, Pa27mb y Pa27r), que persistieron hacia el tercer aislamiento (Pa28m). Sin embargo, en el cuarto proceso de aislamiento (04/03/2016) las cepas del grupo de similitud 39 no fueron identificadas, pero la cepa inicial (Pa02m) se presentó nuevamente bajo el nombre de Pa29ma y Pa29mb con una similitud del 100 % constituyendo el grupo de similitud 40, lo que podría indicar por un lado la efectividad del tratamiento en reducir la población bacteriana e incluso su erradicación, pero su reinfección con el mismo patógeno aproximadamente 10 meses después, podría indicar que el lugar de infección es un lugar posiblemente frecuentado por el paciente (Tabla 4).

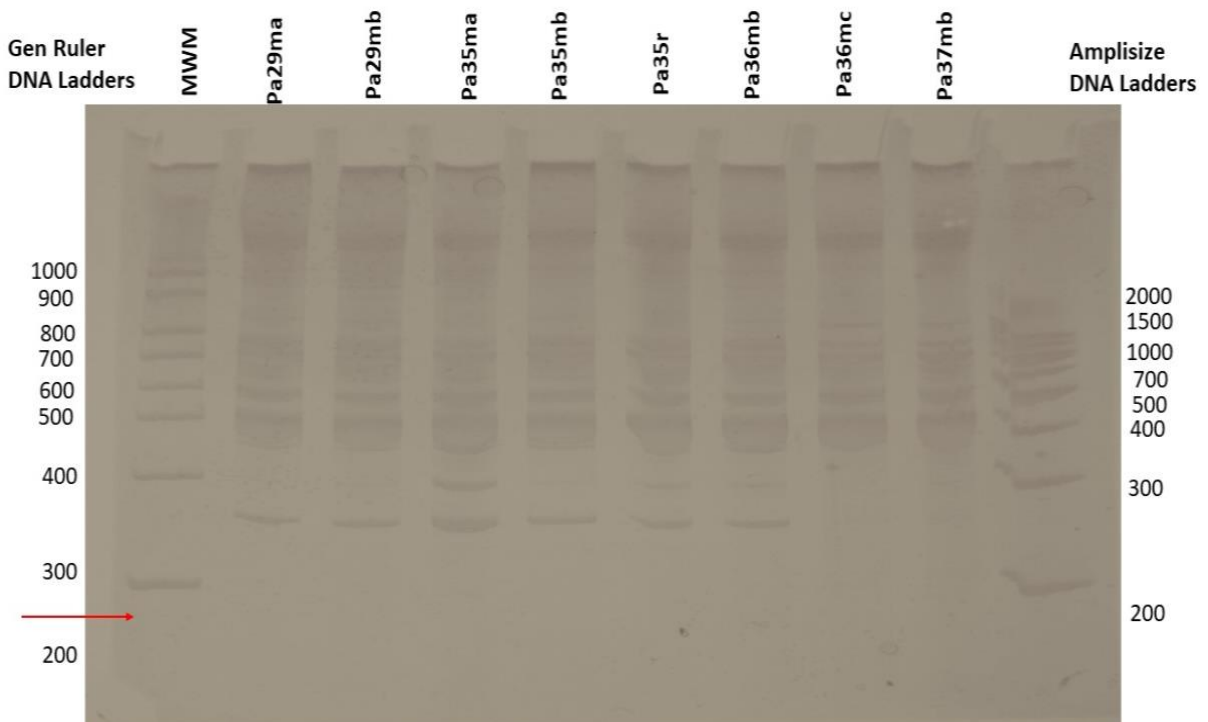


Figura 2. Gel de Acrilamida:Bisacrilamida 10% 6M Urea teñido con AgNO_3

Visualización de huellas génicas generadas con el iniciador OPY-02 de ocho cepas de *P. aeruginosa* (Las huellas génicas de todas las cepas están ilustradas en el Anexo 5).

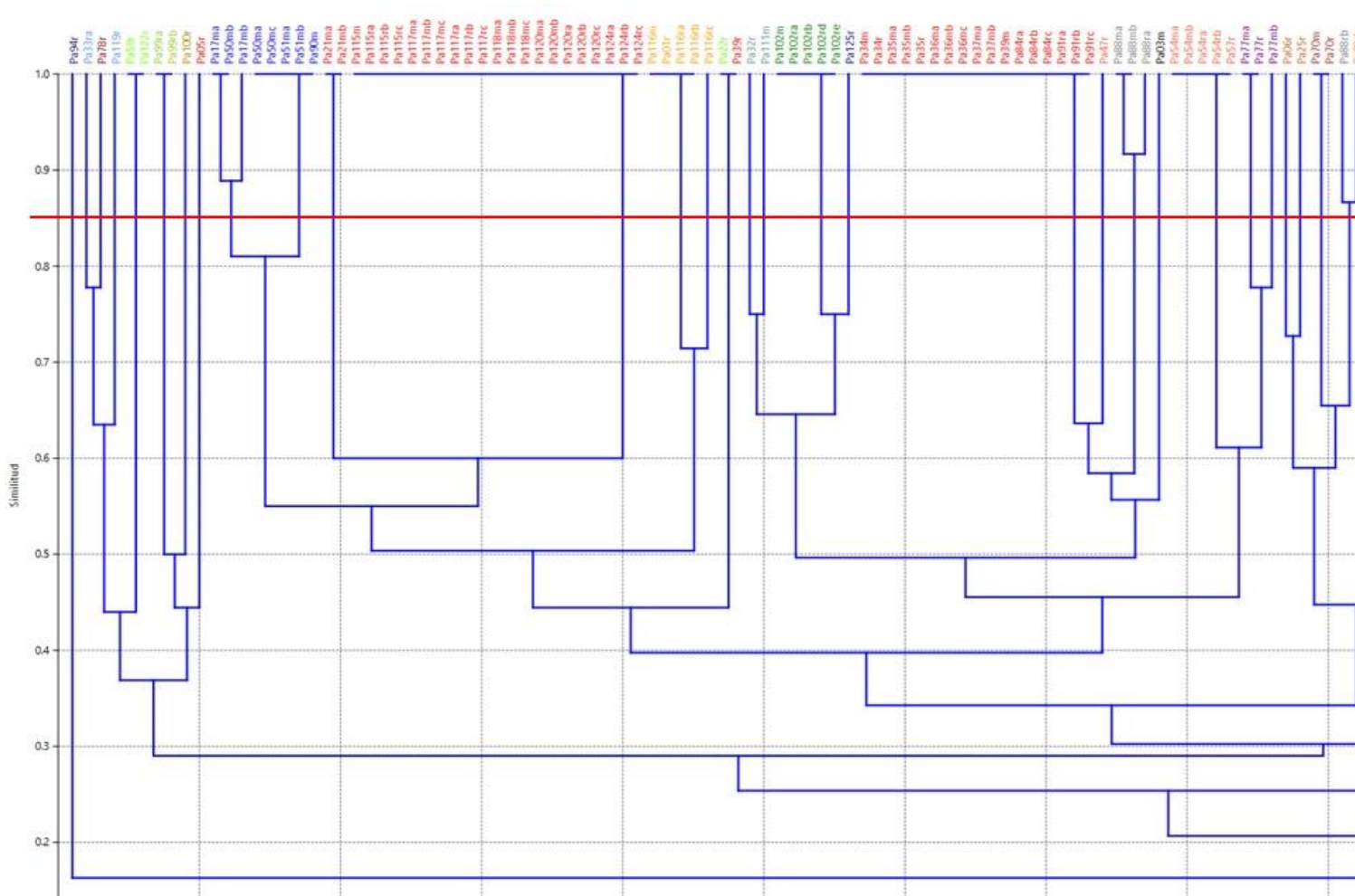


Figura 3. Dendrograma de 128 cepas *P. aeruginosa* de los pacientes pediátricos con

Agrupaciones generadas con el coeficiente de similitud de Jaccard, considerando a cepas con una similitud mayor al 85% como pertenecientes a un mismo grupo. Este nivel de similitud hace referencia a cepas aisladas de pacientes distintos.

Tabla 4. Paciente reinfestado con la cepa identificada en el primer aislamiento

Paciente (Px)	Cepa	Fecha de aislamiento	Fenotipo colonial	Tratamiento	Grupo
Px02	Pa02m	08/05/2015	Mucoide	GM/CIP	40
	Pa27ma	19/02/2016	Mucoide	S/T	39
	Pa27mb	19/02/2016	Mucoide	S/T	39
	Pa27r	19/02/2016	No mucoide	S/T	39
	Pa28m	23/02/2016	Mucoide	CAZ/AN	39
	Pa29mb	04/03/2016	Mucoide	S/T	40
	Pa29ma	04/03/2016	Mucoide	S/T	40

Pie de Nota: GM, Gentamicina; CIP, Ciprofloxacina; S/T, Sin tratamiento; CAZ, Ceftazidime y AN, Amikacina

El Px04 mostró una infección inicial (28/10/2016) por tres cepas (Pa53ra, Pa53rb y Pa53m) pertenecientes a dos grupos de similitud distintos (Pa53ra y Pa53rb del grupo 35; Pa53m del grupo 36) indicando una infección por dos clonas genéticamente diferentes, similar a lo encontrado en el Px10, cuyas cepas aisladas se agruparon en dos grupos de similitud distintos (Pa88ma, Pa88mb y Pa88ra del grupo 22; Pa88rb, del grupo 30). Sin embargo, en los aislados posteriores del Px04 solo se detectaron cepas que se integraron al grupo de similitud 35 (Pa58m y Pa58ra aisladas el 11/11/2016; Pa60m y Pa60r aisladas el 15/11/2016), infiriendo una colonización robusta por esas cepas y el desplazamiento de la clona del grupo 36 (Tabla 5).

Tabla 5. Pacientes con infecciones iniciales conformadas por dos clonas diferentes

Paciente (Px)	Cepa	Fecha de aislamiento	Fenotipo colonial	Grupo
Px04	Pa53m	28/10/2016	Mucoide	36
	Pa53ra	28/10/2016	No mucoide	35
	Pa53rb	28/10/2016	No mucoide	35
	Pa58m	11/11/2016	Mucoide	35
	Pa58ra	11/11/2016	No mucoide	35
	Pa60m	15/11/2016	Mucoide	35
	Pa60r	15/11/2016	No mucoide	35
Px10	Pa88ma	07/07/2017	Mucoide	22
	Pa88mb	07/07/2017	Mucoide	22
	Pa88ra	07/07/2017	No mucoide	22
	Pa88rb	07/07/2017	No mucoide	30

La primera cepa de este trabajo (Pa01r) aislada del Px13 (22/04/2015), logró establecer una infección crónica durante más de tres años (10/08/2018), hecho evidenciado por la identificación de las cepas Pa116m, Pa116ra y Pa116rb, con un porcentaje de similitud entre ellas del 100%, quienes con Pa01r formaron el grupo de similitud 13 (Tabla 6), hecho demostrado en las ramificaciones del dendrograma, los datos de este proyecto sugieren que la cepa original tuvo un proceso de adaptación que generó el surgimiento de la cepa Pa116rc, ya que Pa01r tiene una similitud mayor al 70% con el grupo de cepas descritas (Figura 3).

Tabla 6. Identificación de la cepa del grupo 14 a partir de la cepa inicial del grupo 13

Paciente (Px)	Cepa	Fecha de aislamiento	Fenotipo colonial	Grupo
Px13	Pa01r	22/04/2015	No mucoide	13
	Pa116m	10/08/2018	Mucoide	13
	Pa116ra	10/08/2018	No mucoide	13
	Pa116rb	10/08/2018	No mucoide	13
	Pa116rc	10/08/2018	No mucoide	14

Por otro lado, se identificaron cuatro cepas con morfologías coloniales diferentes (Pa54ma, Pa54mb, Pa54ra y Pa54rb) en el primer aislamiento del Px05 (01/11/2016), mientras en el siguiente aislamiento (10/11/2016) sólo se identificó la cepa Pa57r, todas ellas incluidas en el grupo de similitud 24. Esa disminución en la identificación de morfologías coloniales pudo deberse tanto al origen de la muestra (Lavado broncoalveolar (LBA) y secreción bronquial (Seq-bronq), respectivamente) (Anexo 1), que se ha descrito que puede limitar en algunos casos la identificación bacteriana al analizar regiones pulmonares distintas, como al tratamiento con antibióticos administrado, que pudo reducir la población bacteriana de esas formas coloniales hasta impedir su detección en el último aislamiento (28/11/2017), donde se identificó la cepa Pa98rb con una huella génica diferente a las cepas anteriores, indicando la infección con una clona distinta (Anexo 7).

Las cepas Pa70m y Pa70r del grupo de similitud 29, fueron identificadas en el primer aislamiento del Px12 (31/03/2017) que se encontraba en terapia con antibióticos (Anexo 1), hecho que pudo ocasionar que estas cepas no fueran detectadas en sus siguientes aislamientos, donde se hallaron cepas genéticamente diferentes pertenecientes al grupo de similitud 32 (Pa82r y Pa82mb, aisladas el 31/03/2017) que pese a la antibioticoterapia persistieron hacia el último aislamiento (17/04/2017) identificadas como Pa83ma, Pa83mb y Pa83r (Anexo 7).

Respecto al Px28, en su primer aislamiento disponible (23/09/2015) se identificaron las cepas Pa17ma y Pa17mb del grupo de similitud 09, encontrándose en el segundo aislamiento (07/10/2016) como Pa50mb en combinación con cepas del grupo 10 (Pa50ma y Pa50mc) que persistieron hacia el tercer y cuarto aislamiento pese al tratamiento con antibióticos (Pa51ma y Pa51mb, 10/10/2016; Pa90m, 18/07/2017) (Anexo 1), mismo que pudo disminuir la población de clonas del grupo 09 impidiendo su detección.

Con relación a los procesos de aislamiento del Px14, la cepa Pa22r identificada en el primero de ellos (21/12/2015) se ubicó en el grupo 15 y no fue recuperada en aislamientos posteriores, debido probablemente al tratamiento con antibióticos otorgado al paciente (Anexo 1), donde se encontraron las cepas Pa59r y Pa122r (aisladas el 11/11/2016 y 05/03/2019, respectivamente) pertenecientes a un grupo de similitud distinto (Grupo 05).

El Px22 es reconocido como el paciente con más cepas recuperadas (43 cepas) de una morfología principalmente no mucoide, obtenidas de diferentes tipos de muestras (Esputo, LBA y expectoración) (Anexo 1) y distribuidas en seis grupos de similitud (Anexo 6 y Anexo 7), este paciente mostró una colonización progresiva iniciada con la cepa Pa05r (22/05/2015) que fue indetectable en los aislamientos siguientes, probablemente por el tratamiento con antibióticos, que fue un aspecto constante en este paciente, sin embargo dentro de las infecciones recurrentes, las cepas Pa34m y Pa34r (01/06/2016) integradas en el grupo de similitud 20 mostraron una persistencia aproximada de un año (20/07/2017) con las cepas Pa91ra, Pa91rb y Pa91rc, mostrando una erradicación o disminución de las poblaciones

bacterianas, cada vez más complicada. Como se observó con las cepas posteriores Pa115m, Pa115ra, Pa115rb y Pa115rc (27/07/2018) que lograron adaptarse a la terapia con antibióticos y a las condiciones pulmonares del paciente hasta el 16/04/2019 que fue la última fecha de aislamiento de este paciente donde se encontraron las cepas Pa124ra, Pa124tb y Pa124rc del grupo de similitud 12.

Un dato resaltable entre el Px14 y Px22 fue la presencia de cepas integradas en el grupo de similitud 15 (Pa22r y Pa39r, respectivamente), lo que podría indicar la presencia de una infección cruzada, sin embargo la información demográfica de cada cepa y paciente (Anexo 1) no reflejan una relación directa entre ellos, además de que la diferencia temporal entre la identificación del patógeno en ambos pacientes fue de casi 6 meses (21/12/2015 y 22/06/2016), lo que dificulta identificar la zona o momento de infección entre ambos individuos. A diferencia de lo ocurrido con la infección cruzada entre el Px10 y Px05 con las cepas Pa88rb y Pa98rb del grupo de similitud 30 (07/07/2017 y 28/11/2017, respectivamente) aisladas con una diferencia temporal menor a cinco meses, ambas provenientes de LBA, sin tratamiento antibacteriano e incluso con edades similares de los pacientes (ocho y nueve años, respectivamente (Anexo 1). Aun así, la identificación del lugar o tiempo de infección es complicada con los datos disponibles.

CONCLUSIÓN

Los hallazgos demuestran que el par de iniciadores PA1/PA2 es efectivo para diferenciar entre *P. aeruginosa* y otras especies cercanamente relacionadas. Además, el iniciador OPY-02 permite tipificar por RAPD-PCR a las cepas, logrando distinguir clonas únicas y específicas para cada paciente, que en algunos casos persisten por periodos prolongados de tiempo en los pulmones de los pacientes con FQ. En adición, la genotipificación de este patógeno en pacientes con FQ demostró su utilidad en la identificación de infecciones cruzadas, lo cual es importante para establecer estrategias tempranas de prevención y control de infecciones, que eviten la transmisión descontrolada de agentes infecciosos.

REFERENCIAS

- Anzaudo, M. M., Busquets, N. P., Ronchi, S., & Mayoral, C. (2005). Microorganismos patógenos aislados en muestras respiratorias de niños con fibrosis quística. *Revista Argentina de Microbiología*, 37(3), 129–134.
- Auda, I. G., Al-Kadmy, I. M. S., Kareem, S. M., Lafta, A. K., A'Affus, M. H. O., Khit, I. A. A., ... Ramakrishnaiah, R. (2017). RAPD-and ERIC-based typing of clinical and environmental pseudomonas aeruginosa isolates. *Journal of AOAC International*, 100(2), 532–536. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0267>
- Baena del Valle J., Alegría Gómez C., C. G. D. (2014). Susceptibilidad antimicrobiana y genotipificación de Pseudomonas aeruginosa de pacientes con fibrosis quística y otras patologías en Cartagena (Colombia). *Salud Uninorte*, 30(2), 104–120. <https://doi.org/10.14482/sun.30.1.4309>
- Barnini, S., Dodi, C., & Campa, M. (2004). Enhanced resolution of random amplified polymorphic DNA genotyping of Pseudomonas aeruginosa. *Letters in Applied Microbiology*, 39, 274–277. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01576.x>
- Bassam, B. J., & Gresshoff, P. M. (2007). Silver staining dna in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, 2(11), 2649–2654. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.330>
- Bou G., Olmos Fernandez A., García C., N. S. A. y V. S. (2011, October). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Vol. 29, pp. 601–608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Bouvier, N. M. (2016). Cystic fibrosis and the war for iron at the host-pathogen battlefield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(6), 1480–1482. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525101113>
- Castro, H. E., Sojo Aguirre, A., Ortega, D. G., María, J., & Ortega, N. (2018). Fibrosis quística. *Asociación Española de Pediatría AEP*, 1, 99–109.
- Cercenado E., C. R. (2008). Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. *Microbiología Clínica*, 3(1), 3–47. Retrieved from <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia30.pdf>
- Cohen, T. S., & Prince, A. (2012). review Cystic fibrosis : a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nature Medicine*, 18(4), nm.2715-11. <https://doi.org/10.1038/nm.2715>
- Darch, S. E., McNally, A., Harrison, F., Corander, J., Barr, H. L., Paszkiewicz, K., ... Diggle, S. P. (2015). Recombination is a key driver of genomic and phenotypic diversity in a Pseudomonas aeruginosa population during cystic fibrosis infection. *Scientific Reports*, 5(7649), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep07649>
- Darch, S. E., McNally, A., Harrison, F., Corander, J., Barr, H. L., Paszkiewicz, K., ... Diggle, S. P. (2015). Recombination is a key driver of genomic and phenotypic diversity in a Pseudomonas aeruginosa population during cystic fibrosis infection. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep07649>
- Fernández Cuenca F.López Cerero L. & Pascual Hernández A. (2013). Técnicas de

tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(Supl 1), 20–25.

- Kalferstova, L., Dedeckova, K. V., Antuskova, M., & Melter, O. (2015). How and why to monitor *Pseudomonas aeruginosa* infections in the long term at a cystic fibrosis centre. *Journal of Hospital Infection*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.09.010>
- Kalferstova, L., Vilimovska Dedeckova, K., Antuskova, M., Melter, O., & Drevinek, P. (2016). How and why to monitor *Pseudomonas aeruginosa* infections in the long term at a cystic fibrosis centre. *Journal of Hospital Infection*, 92(1), 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.09.010>
- Lavenir, R., Jocktane, D., Laurent, F., Nazaret, S., & Cournoyer, B. (2007). Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target. 70, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.008>
- O'toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), 295–304.
- Okur, D. S., Yuruyen, C., Gungor, O., Aktas, Z., Erturan, Z., Akcakaya, N., ... Koksalan, K. (2019). Genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from turkish children with cystic fibrosis. *Infection and Drug Resistance*, 12, 675–685. <https://doi.org/10.2147/IDR.S183151>
- Pareja Mendoza R. (2011). ¿Qué es la Epidemiología? *Epidemiología*, 1(1), 3–94.
- Picard, E., Aviram, M., Yahav, Y., Rivlin, J., Blau, H., Bentur, L., ... Kerem, E. (2004). Familial concordance of phenotype and microbial variation among siblings with CF. *Pediatric Pulmonology*, 38(4), 292–297. <https://doi.org/10.1002/ppul.20111>
- Pitcher, D. G., Saunders, N. A., & Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, 8(4), 151–156. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>
- Riffiani, R., Sulistinah, N., & Sunarko, B. (2015). Comparison of three dna isolation and purification methods of bacterial dna. *KnE Life Sciences*, 2(1), 491. <https://doi.org/10.18502/kls.v2i1.199>
- Soto, C., Guillermo, J., Plata María Del Carmen, C., Sepúlveda, L., Efraín, R., Ojeda Eligio, E., ... Antonio, J. (2013). Evaluación de Procedimientos de Tinción para el Análisis de Proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE). *Invurnus*, 8(1), 19–26.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., ... Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959–964. <https://doi.org/10.1038/35023079>
- Tapia Conyer, R. (1997). La epidemiología molecular en la transición epidemiológica. *Gaceta Médica México*, 133(1), 161–166.
- Vaněrková, M., Mališová, B., Kotásková, I., Holá, V., Růžička, F., & Freiburger, T. (2017). Biofilm formation, antibiotic susceptibility and RAPD genotypes in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from single centre intensive care unit patients. *Folia Microbiologica*, 62(6), 531–538. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0526-7>

Viedma, E. M. (2014). *Caracterización Molecular y Epidemiológica de Aislamientos Clínicos de Pseudomonas aeruginosa Multirresistente* (Vol. 1).

ANEXOS

Anexo 1 | Características demográficas de las cepas *P. aeruginosa* aisladas de pacientes pediátricos con FQ

Cepa	Fenotipo colonial	Tipo de muestra	Información del paciente			
			Registro INP	Género	Edad	Tratamiento
Pa01r	Rugoso	Espuito	494492	F	5 años	S/T
Pa02m	Mucoide	Espuito	419317	M	11 años	GM/CIP
Pa03m	Mucoide	Espuito	455149	F	N/D	S/T
Pa05r	Rugoso	Espuito	457698	M	7 años	CAZ/AN
Pa06r	Rugoso	Espuito	495206	M	10 años	CAZ/AN
Pa12r	Rugoso	ANF	495924	F	10 meses	CAZ/AN
Pa17ma	Mucoide	LBA	451319	M	8 años	S/T
Pa17mb	Mucoide	LBA	451319	M	8 años	S/T
Pa21ma	Mucoide	Espuito	457698	M	7 años	S/T
Pa21mb	Mucoide	Espuito	457698	M	7 años	S/T
Pa22r	Rugoso	Espuito	471468	M	5 años	CIP
Pa25r	Rugoso	NC	495206	M	10 años	S/T
Pa26r	Rugoso	Espuito	457698	M	7 años	CAZ/AN/DX
Pa27ma	Mucoide	Espuito	419317	M	15 años	S/T
Pa27mb	Mucoide	Espuito	419317	M	15 años	S/T
Pa27r	Rugoso	Espuito	419317	M	15 años	S/T
Pa28m	Mucoide	LBA	419317	M	15 años	CAZ/AN
Pa29ma	Mucoide	Espuito	419317	M	15 años	S/T
Pa29mb	Mucoide	Espuito	419317	M	15 años	S/T
Pa32r	Rugoso	LBA	469557	F	6 años	AZM
Pa33ra	Rugoso	LBA	454078	F	9 años	GM
Pa34m	Mucoide	Espuito	457698	M	7 años	CAZ/AN
Pa34r	Rugoso	Espuito	457698	M	7 años	CAZ/AN
Pa35ma	Mucoide	LBA	457698	M	7 años	S/T
Pa35mb	Mucoide	LBA	457698	M	7 años	S/T
Pa35r	Rugoso	LBA	457698	M	7 años	S/T
Pa36ma	Mucoide	Espuito	457698	M	7 años	CAZ/AN
Pa36mb	Mucoide	Espuito	457698	M	7 años	CAZ/AN
Pa36mc	Mucoide	Espuito	457698	M	7 años	CAZ/AN
Pa37ma	Mucoide	LBA	457698	M	7 años	S/T
Pa37mb	Mucoide	LBA	457698	M	7 años	S/T
Pa39m	Mucoide	Sec-bronq	457698	M	8 años	S/T
Pa39r	Rugoso	Sec-bronq	457698	M	8 años	S/T
Pa47r	Rugoso	ANF	501060	F	7 meses	CAZ/AN
Pa50ma	Mucoide	Espuito	451319	M	9 años	CAZ/AN
Pa50mb	Mucoide	Espuito	451319	M	9 años	CAZ/AN
Pa50mc	Mucoide	Espuito	451319	M	9 años	CAZ/AN
Pa51ma	Mucoide	LBA	451319	M	9 años	CAZ/AN
Pa51mb	Mucoide	LBA	451319	M	9 años	CAZ/AN
Pa53m	Mucoide	LBA	494302	F	1 año	S/T
Pa53ra	Rugoso	LBA	494302	F	1 año	S/T
Pa53rb	Rugoso	LBA	494302	F	1 año	S/T

Pa54ma	Mucoide	LBA	504411	F	8 años	S/T
Pa54mb	Mucoide	LBA	504411	F	8 años	S/T
Pa54ra	Rugoso	LBA	504411	F	8 años	S/T
Pa54rb	Rugoso	LBA	504411	F	8 años	S/T
Pa57r	Rugoso	Sec-bronq	504411	F	8 años	CAZ/AN
Pa58m	Mucoide	Sec-bronq	494302	F	2 años	CAZ
Pa58ra	Rugoso	Sec-bronq	494302	F	2 años	CAZ
Pa58rb	Rugoso	Sec-bronq	494302	F	2 años	CAZ
Pa59r	Rugoso	Sec-bronq	471468	M	2 años	CAZ/AN
Pa60m	Mucoide	Espuito	494302	F	2 años	DX/AN
Pa60r	Rugoso	Espuito	494302	F	2 años	DX/AN
Pa64m	Mucoide	Espuito	504682	M	4 años	CAZ/AN
Pa65r	Rugoso	Espuito	503048	M	7 meses	S/T
Pa70m	Mucoide	LBA	451767	M	12 años	CAZ/AN
Pa70r	Rugoso	LBA	451767	M	12 años	CAZ/AN
Pa73r	Rugoso	LBA	454012	M	13 años	S/T
Pa77ma	Mucoide	Expectoración	483845	M	7 años	CAZ/AN
Pa77mb	Mucoide	Expectoración	483845	M	7 años	CAZ/AN
Pa77r	Rugoso	Expectoración	483845	M	7 años	CAZ/AN
Pa78r	Rugoso	Espuito	455826	F	13 años	S/T
Pa82ma	Mucoide	Espuito	455826	M	12 años	CAZ/AN
Pa82mb	Mucoide	Espuito	455826	M	12 años	CAZ/AN
Pa82r	Rugoso	Espuito	455826	M	12 años	CAZ/AN
Pa83ma	Mucoide	Sec-bronq	455826	M	12 años	CAZ/AN
Pa83mb	Mucoide	Sec-bronq	455826	M	12 años	CAZ/AN
Pa83r	Rugoso	Sec-bronq	455826	M	12 años	CAZ/AN
Pa84ra	Rugoso	Espuito	457698	M	4 años	CAZ/AN
Pa84rb	Rugoso	Espuito	457698	M	4 años	CAZ/AN
Pa84rc	Rugoso	Espuito	457698	M	4 años	CAZ/AN
Pa88ma	Mucoide	LBA	459413	M	8 años	S/T
Pa88mb	Mucoide	LBA	459413	M	8 años	S/T
Pa88ra	Rugoso	LBA	459413	M	8 años	S/T
Pa88rb	Rugoso	LBA	459413	M	8 años	S/T
Pa90m	Mucoide	Sec-bronq	451319	M	10años	S/T
Pa91ra	Rugoso	Sec-bronq	457698	M	9 años	AZM
Pa91rb	Rugoso	Sec-bronq	457698	M	9 años	AZM
Pa91rc	Rugoso	Sec-bronq	457698	M	9 años	AZM
Pa94r	Rugoso	ANF	508993	F	6 años	CAZ/AN/DX
Pa98ra	Rugoso	LBA	504411	F	9 años	S/T
Pa98rb	Rugoso	LBA	504411	F	9 años	S/T
Pa99ra	Rugoso	LBA	439782	M	12 años	S/T
Pa99rb	Rugoso	LBA	439782	M	12 años	S/T
Pa100r	Rugoso	LBA	490272	M	3 años	S/T
Pa102m	Mucoide	LBA	465452	M	13 años	S/T
Pa102ra	Rugoso	LBA	465452	M	13 años	S/T
Pa102rb	Rugoso	LBA	465452	M	13 años	S/T
Pa102rc	Rugoso	LBA	465452	M	13 años	S/T
Pa102rd	Rugoso	LBA	465452	M	13 años	S/T
Pa102re	Rugoso	LBA	465452	M	13 años	S/T
Pa106ra	Rugoso	Expectoración	454078	F	12 años	CAZ/AN/DX
Pa106rb	Rugoso	Expectoración	454078	F	12 años	CAZ/AN/DX
Pa106rc	Rugoso	Expectoración	454078	F	12 años	CAZ/AN/DX
Pa107r	Rugoso	Expectoración	413151	F	17 años	S/T

Pa111m	Mucoide	LBA	469557	F	8 años	S/T
Pa112ma	Mucoide	LBA	48681	M	4 años	S/T
Pa112mb	Mucoide	LBA	48681	M	4 años	S/T
Pa112r	Rugoso	LBA	48681	M	4 años	S/T
Pa114ra	Rugoso	LBA	514175	M	1 año	CAZ/AN
Pa114rb	Rugoso	LBA	514175	M	1 año	CAZ/AN
Pa115m	Mucoide	Espuito	457698	F	10 años	CAZ/AN
Pa115ra	Rugoso	Espuito	457698	F	10 años	CAZ/AN
Pa115rb	Rugoso	Espuito	457698	F	10 años	CAZ/AN
Pa115rc	Rugoso	Espuito	457698	F	10 años	CAZ/AN
Pa116m	Mucoide	LBA	494492	F	7 años	S/T
Pa116ra	Rugoso	LBA	494492	F	7 años	S/T
Pa116rb	Rugoso	LBA	494492	F	7 años	S/T
Pa116rc	Rugoso	LBA	494492	F	7 años	S/T
Pa117ma	Mucoide	Espuito	457698	M	10 años	CAZ/AN
Pa117mb	Mucoide	Espuito	457698	M	10 años	CAZ/AN
Pa117mc	Mucoide	Espuito	457698	M	10 años	CAZ/AN
Pa117ra	Rugoso	Espuito	457698	M	10 años	CAZ/AN
Pa117rb	Rugoso	Espuito	457698	M	10 años	CAZ/AN
Pa117rc	Rugoso	Espuito	457698	M	10 años	CAZ/AN
Pa118ma	Mucoide	Espuito	457698	M	10 años	CAZ/AN/SXT/AZM
Pa118mb	Mucoide	Espuito	457698	M	10 años	CAZ/AN/SXT/AZM
Pa118mc	Mucoide	Espuito	457698	M	10 años	CAZ/AN/SXT/AZM
Pa119r	Rugoso	Espuito	454078	F	12 años	CAZ/AN
Pa120ma	Mucoide	Espuito	457698	M	10 años	MEM
Pa120mb	Mucoide	Espuito	457698	M	10 años	MEM
Pa120ra	Rugoso	Espuito	457698	M	10 años	MEM
Pa120rb	Rugoso	Espuito	457698	M	10 años	MEM
Pa120rc	Rugoso	Espuito	457698	M	10 años	MEM
Pa122r	Rugoso	Espuito	457698	M	8 años	CAZ/DX
Pa124ra	Rugoso	LBA	457698	M	11 años	S/T
Pa124rb	Rugoso	LBA	457698	M	11 años	S/T
Pa124rc	Rugoso	LBA	457698	M	11 años	S/T
Pa125r	Rugoso	Espuito	427864	M	17 años	S/T

ANF= Aspirado nasofaríngeo; ABA= Aspirado broncoalveolar; LBA = Lavado broncoalveolar; Sec-bronq= Secreción bronquial; NC= No conocido; F= Femenino; M= Masculino; S/T= Sin tratamiento; AN= Amikacina CAZ= Ceftazidima; GM= Gentamicina; CIP= Ciprofloxacina; MEM= Meropenem; DX= Dicloxacilina; AZM=Azitromicina; SXT= Trimetroprima/Sulfametoxazol.

Anexo 2 | Cuantificación y pureza del ADN genómico extraído

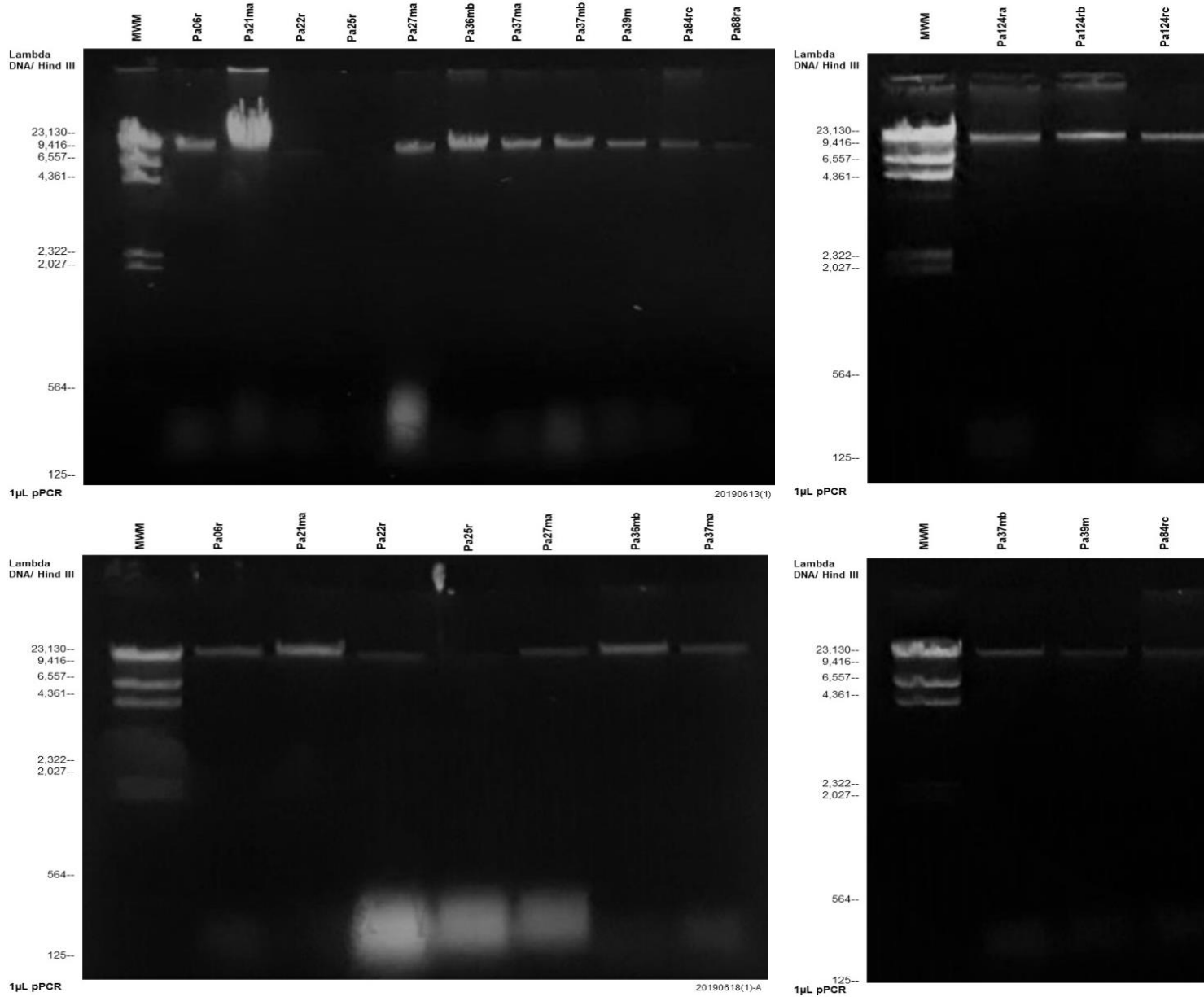
CEPA	[DNA] (ng/µl)	Relación 260/280	Relación 260/230
ATCC 27853	527	2.0	2.2
ATCC 27855	1764	2.1	2.4
PAO1	403	2.0	2.3
<i>P. alcaligenes</i>	1105	2.0	2.5
<i>B. cepacia</i>	4322	2.2	2.2
<i>S. maltophilia</i>	7118	2.2	2.2
Pa01r	1550	2.1	2.3
Pa02m	1292	2.1	2.4
Pa03m	315	2.0	2.4
Pa05r	1035	2.1	2.3
Pa06r	2462	2.1	1.8
Pa12r	1094	2.1	2.3
Pa17ma	1967	2.1	2.3
Pa17mb	363	2.0	2.2
Pa21ma	3573	2.1	1.8
Pa21mb	2640	2.1	2.3
Pa22r	3134	2.1	2.4
Pa25r	1628	2.0	2.4
Pa26r	3997	2.2	2.0
Pa27ma	3042	2.1	2.1
Pa27mb	2014	2.1	2.4
Pa27r	670	2.1	2.3
Pa28m	615	2.1	2.4
Pa29ma	2380	2.1	2.4
Pa29mb	1163	1.9	1.9
Pa32r	1902	2.2	2.4
Pa33ra	656	2.0	2.4
Pa33rb	844	1.9	2.0
Pa34m	704	2.0	2.4
Pa34r	866	2.0	2.4
Pa35ma	922	2.1	2.3
Pa35mb	5133	2.1	2.2
Pa35r	1434	2.1	2.3
Pa36ma	1335	2.1	2.3
Pa36mb	3800	2.1	2.0
Pa36mc	962	2.1	2.4
Pa37ma	2451	2.1	2.1
Pa37mb	4196	2.1	2.2
Pa39m	2558	2.1	1.9
Pa39r	516	2.1	2.4
Pa47r	3082	2.1	2.4
Pa50ma	1005	2.1	2.3
Pa50mb	6151	2.1	2.1
Pa50mc	2028	2.1	2.4
Pa51ma	1654	2.1	2.5
Pa51mb	1655	2.1	2.3
Pa53m	2338	2.2	2.4
Pa53ra	8075	2.1	2.2

Pa53rb	2127	2.1	2.4
Pa54ma	1156	2.1	2.2
Pa54mb	2107	2.1	2.5
Pa54ra	2580	2.0	2.2
Pa54rb	3694	2.1	1.9
Pa57r	1089	2.1	2.3
Pa58m	1179	2.1	2.3
Pa58ra	1510	2.1	2.3
Pa58rb	3733	2.2	2.3
Pa59r	2794	2.1	2.3
Pa60m	1207	2.1	2.3
Pa60r	2570	2.1	2.4
Pa64m	3238	2.1	2.4
Pa65r	1788	2.1	2.4
Pa70m	160	1.7	2.2
Pa70r	1105	2.0	2.1
Pa73r	3934	2.1	2.4
Pa77ma	2085	2.1	2.4
Pa77mb	2185	2.1	2.3
Pa77r	3005	2.1	2.4
Pa78r	3976	2.1	2.5
Pa82ma	791	2.1	2.6
Pa82mb	2765	2.2	2.3
Pa82r	567	2.0	2.2
Pa83ma	1366	2.1	2.5
Pa83mb	915	2.1	2.6
Pa83r	2299	2.1	2.5
Pa84ra	623	2.1	2.5
Pa84rb	1144	2.1	2.6
Pa84rc	711	2.0	2.4
Pa88ma	5050	2.2	2.3
Pa88mb	1033	2.1	1.9
Pa88ra	5958	2.0	1.8
Pa88rb	781	2.0	2.4
Pa90m	1243	2.1	2.3
Pa91ra	710	2.0	2.2
Pa91rb	2551	2.1	2.3
Pa91rc	523	2.0	2.1
Pa94r	1106	2.0	2.4
Pa98ra	5097	2.1	2.1
Pa98rb	402	2.0	2.3
Pa99ra	631	2.0	2.1
Pa99rb	9123	2.1	2.1
Pa100r	697	2.0	2.0
Pa102m	1017	2.1	2.3
Pa102ra	1156	2.0	1.9
Pa102rb	1095	2.0	2.0
Pa102rc	2553	2.1	1.8
Pa102rd	1730	2.1	2.2
Pa102re	728	1.9	2.3

Pa106ra	1801	2.1	2.4
Pa106rb	2037	2.1	2.3
Pa106rc	612	2.0	1.8
Pa107r	598	2.0	2.1
Pa111m	2320	2.1	1.8
Pa112ma	1722	2.1	2.1
Pa112mb	768	2.0	2.1
Pa112r	534	2.0	2.1
Pa114ra	2662	2.1	2.4
Pa114rb	1333	2.0	2.1
Pa115m	1175	2.0	2.1
Pa115ra	206	1.8	2.3
Pa115rb	3725	2.2	2.4
Pa115rc	1676	2.2	2.3
Pa116m	1578	2.0	2.1
Pa116ra	1256	2.0	2.5
Pa116rb	381	1.9	2.2
Pa116rc	612	2.0	2.0
Pa117ma	1935	2.0	2.4

Pa117mb	1161	1.9	1.9
Pa117mc	1525	2.0	2.4
Pa117ra	1022	2.0	2.4
Pa117rb	946	2.0	2.3
Pa117rc	4130	2.1	1.8
Pa118ma	894	2.0	2.4
Pa118mb	3845	2.0	2.0
Pa118mc	3386	2.1	2.0
Pa119r	532	1.8	2.3
Pa120ma	284	1.8	2.4
Pa120mb	1541	2.1	2.1
Pa120ra	1071	2.1	2.4
Pa120rb	725	2.0	2.3
Pa120rc	997	2.1	2.2
Pa122r	3470	2.1	2.1
Pa124ra	1185	2.0	2.3
Pa124rb	2897	2.0	2.1
Pa124rc	2571	2.1	2.3
Pa125r	480	1.9	2.1

Anexo 3 | Visualización de la integridad de ADN genómico extraído de las cepas de *P. aeruginosa*



Geles de agarosa al 1.5% corridos a 90V/1hr, con visualización de bandas de peso molecular elevado, que se traducen como e incluso con la visualización de ARN definido por la presencia de bandas borrosas de peso molecular bajo

Anexo 4 | Identificación molecular de *P. aeruginosa*

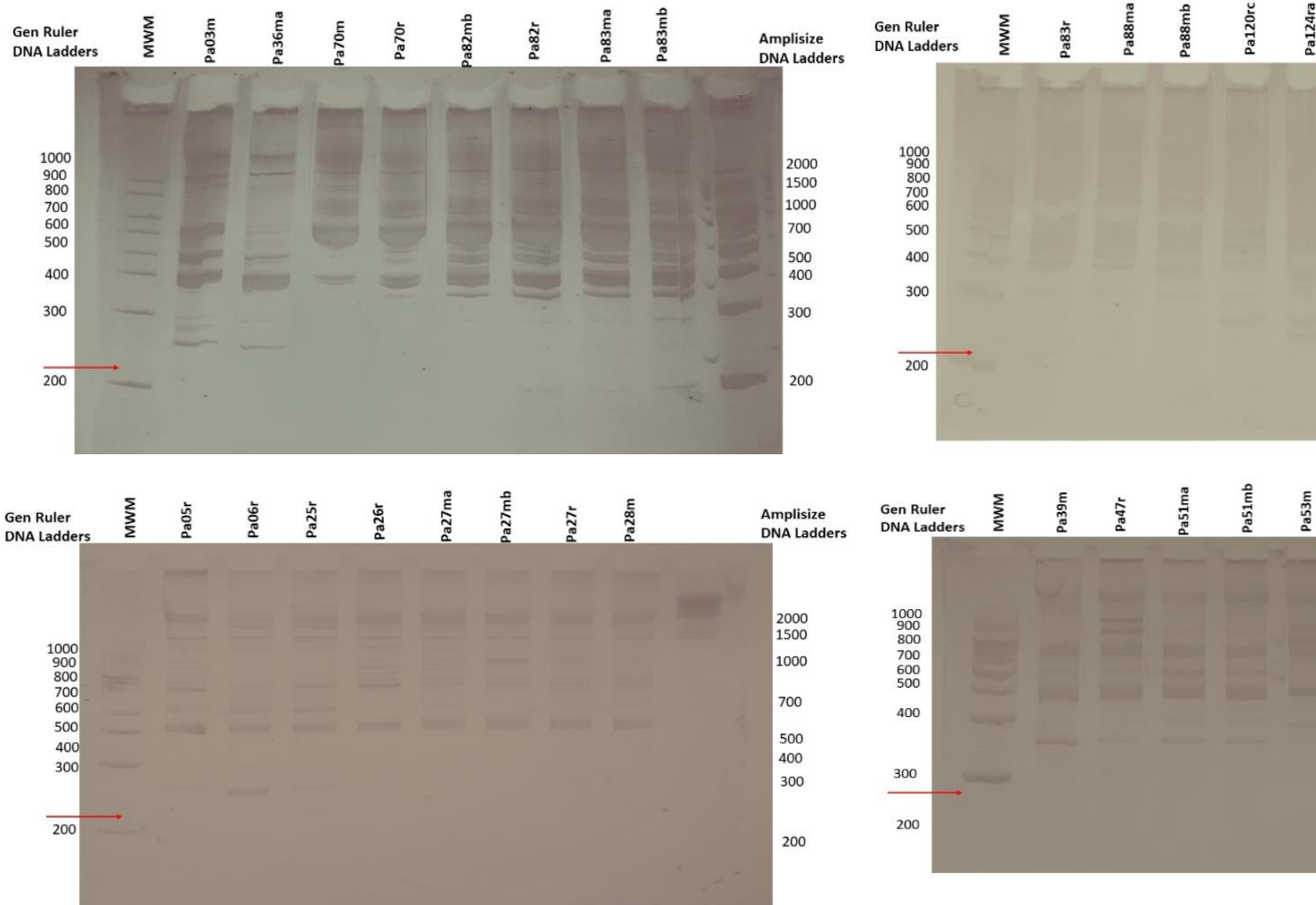
CEPA	16S-23S rDNA ITS
ATCC® 27853™	+
ATCC® 27855™	+
PAO1™	+
<i>P. alcaligenes</i>	Negativo
<i>B. cepacia</i>	Negativo
<i>S. malthophilia</i>	Negativo
Pa01r	+
Pa02m	+
Pa03m	+
Pa05r	+
Pa06r	+
Pa12r	+
Pa17ma	+
Pa17mb	+
Pa21ma	+
Pa21mb	+
Pa22r	+
Pa25r	+
Pa26r	+
Pa27ma	+
Pa27mb	+
Pa27r	+
Pa28m	+
Pa29ma	+
Pa29mb	+
Pa32r	+
Pa33ra	+
Pa33rb	Negativo
Pa34m	+
Pa34r	+
Pa35ma	+
Pa35mb	+
Pa35r	+
Pa36mb	+
Pa36mc	+
Pa37ma	+
Pa37mb	+
Pa39m	+

Pa39r	+
Pa47r	+
Pa50ma	+
Pa50mb	+
Pa50mc	+
Pa51ma	+
Pa51mb	+
Pa53m	+
Pa53ra	+
Pa53rb	+
Pa54ma	+
Pa54mb	+
Pa54ra	+
Pa54rb	+
Pa57r	+
Pa58m	+
Pa58ra	+
Pa58rb	Negativo
Pa59r	+
Pa60m	+
Pa60r	+
Pa64m	+
Pa65r	+
Pa70m	+
Pa70r	+
Pa73r	Negativo
Pa77ma	+
Pa77mb	+
Pa77r	+
Pa78r	+
Pa82ma	+
Pa82mb	+
Pa82r	+
Pa83ma	+
Pa83mb	+
Pa83r	+
Pa84ra	+
Pa84rb	+
Pa84rc	+

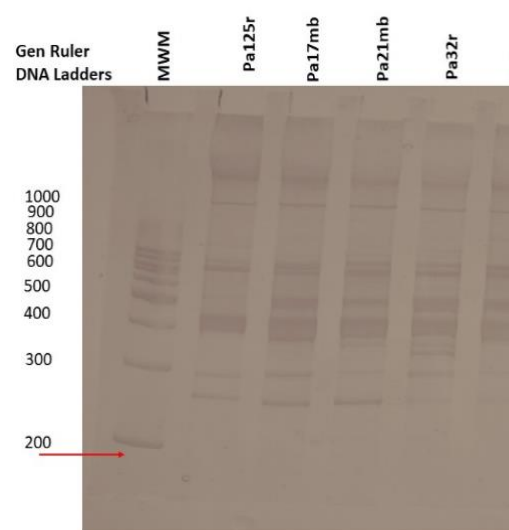
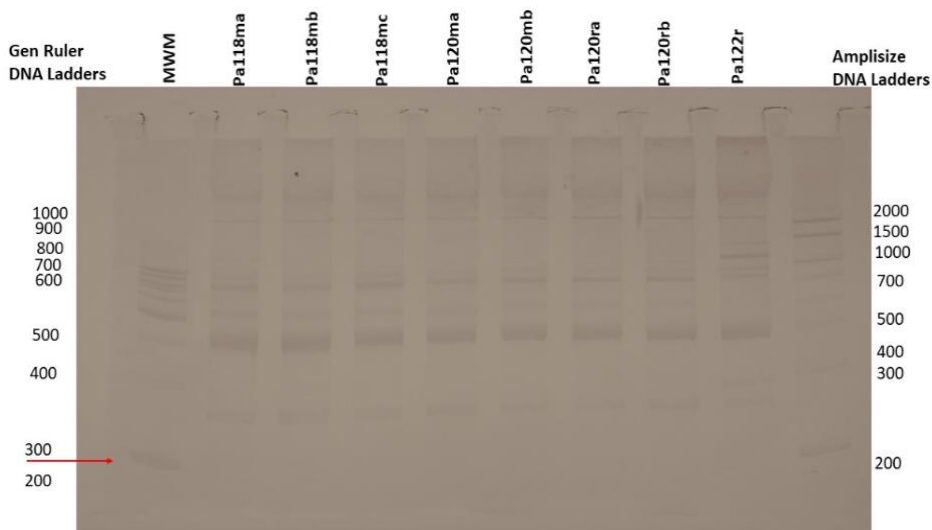
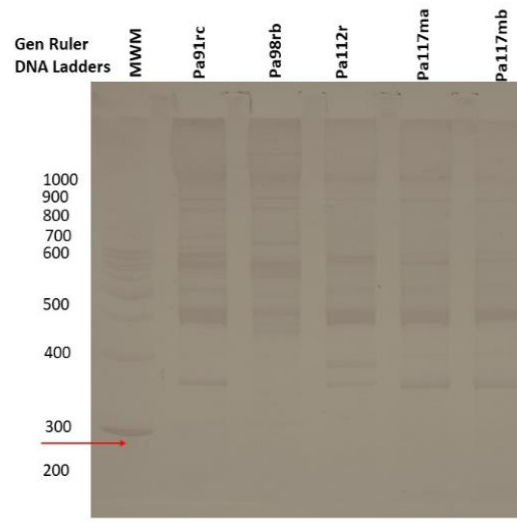
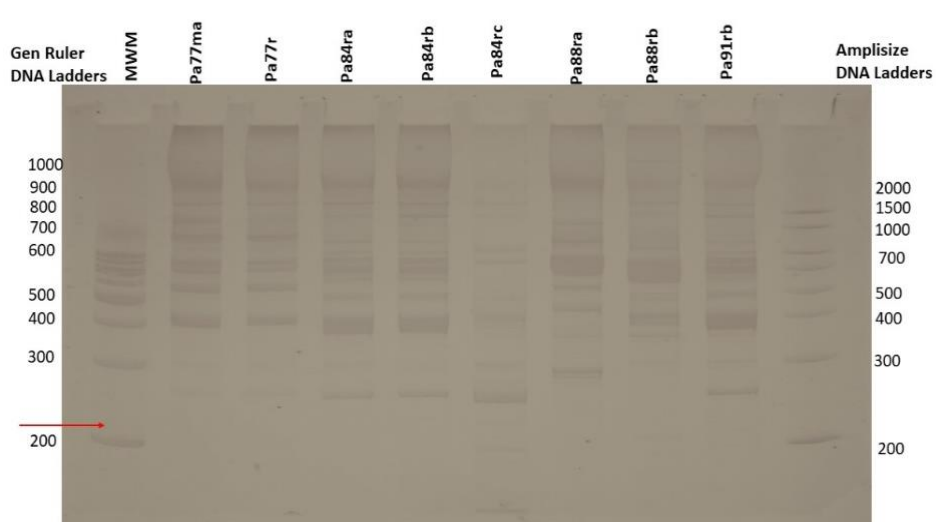
Pa88ma	+
Pa88mb	+
Pa88ra	+
Pa88rb	+
Pa90m	+
Pa91ra	+
Pa91rb	+
Pa91rc	+
Pa94r	+
Pa98ra	+
Pa98rb	+
Pa99ra	+
Pa99rb	+
Pa100r	+
Pa102m	+
Pa102ra	+
Pa102rb	+
Pa102rc	Negativo
Pa102rd	+
Pa102re	+
Pa106ra	Negativo
Pa106rb	Negativo
Pa106rc	Negativo
Pa107r	Negativo
Pa111m	+
Pa112ma	+
Pa112mb	+
Pa112r	+
Pa114ra	Negativo
Pa114rb	Negativo

Pa115m	+
Pa115ra	+
Pa115rb	+
Pa115rc	+
Pa116m	+
Pa116ra	+
Pa116rb	+
Pa116rc	+
Pa117ma	+
Pa117mb	+
Pa117mc	+
Pa117ra	+
Pa117rb	+
Pa117rc	+
Pa118ma	+
Pa118mb	+
Pa118mc	+
Pa119r	+
Pa120ma	+
Pa120mb	+
Pa120ra	+
Pa120rb	+
Pa120rc	+
Pa122r	+
Pa124ra	+
Pa124rb	+
Pa124rc	+
Pa125r	+

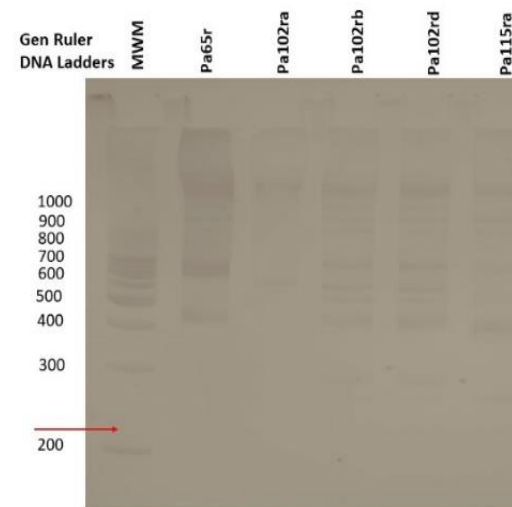
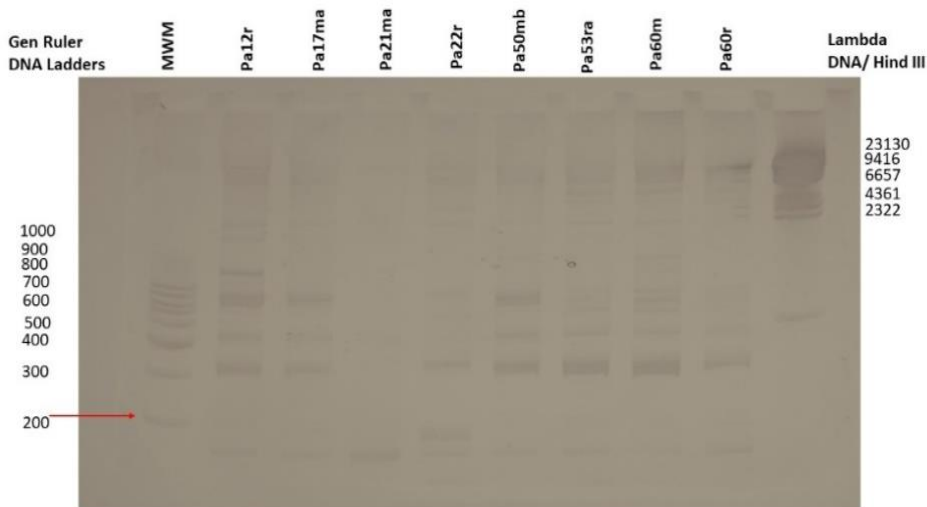
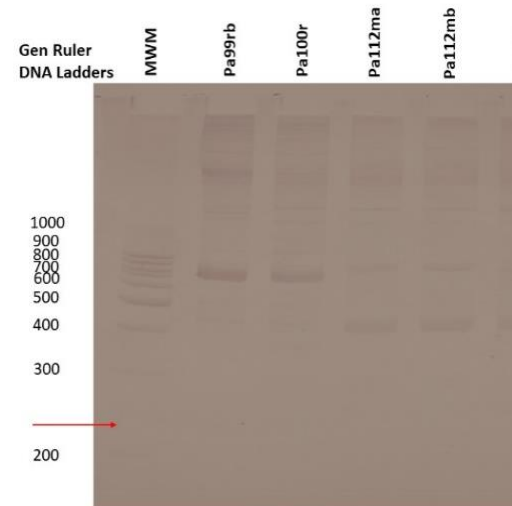
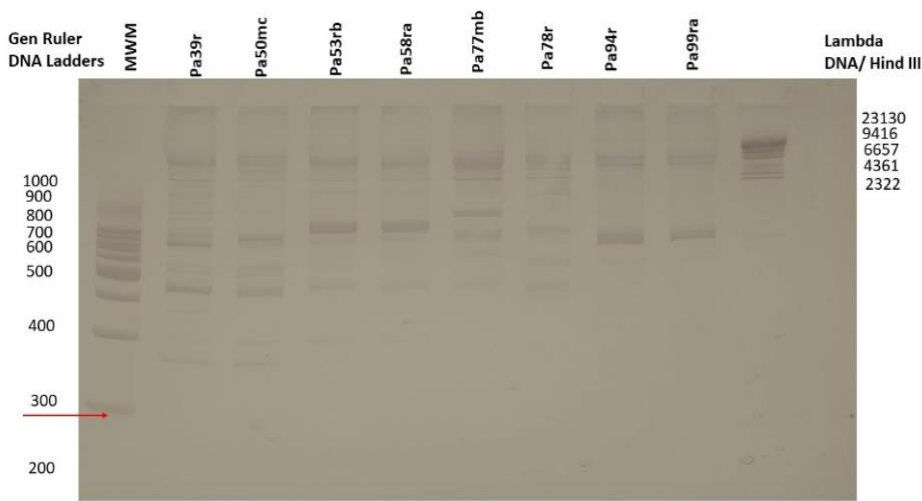
Anexo 5 | Huellas génicas de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes pediátricos con



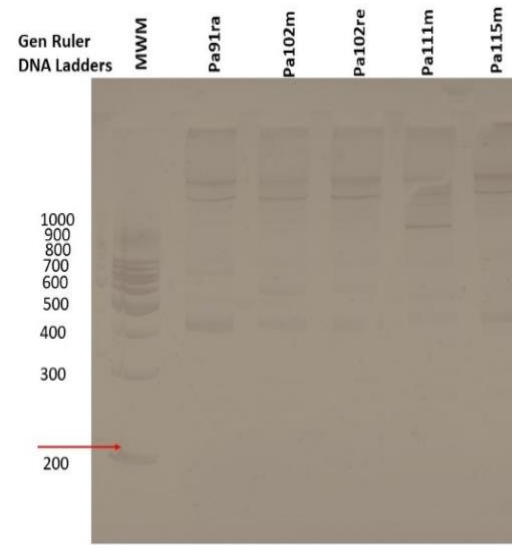
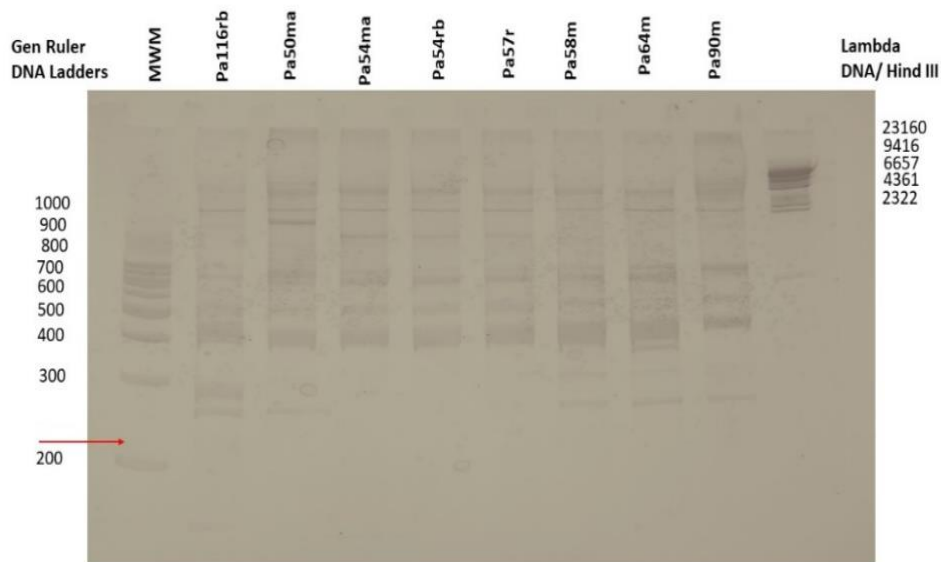
Huellas génicas de 32 cepas de *P. aeruginosa* visualizadas en los carriles de geles de poliacrilamida al 10% 6M Urea teñidos 10 corresponden a dos marcadores de pesos diferentes (Gen Ruler y Amplisize, respectivamente).



Huellas génicas de las siguientes 32 cepas de *P. aeruginosa* visualizadas en los carriles de geles de poliacrilamida al 10% 6x. los carriles 1 y 10 corresponden a dos marcadores de pesos diferentes (Gen Ruler y Amplisize, respectivamente).



Huellas g3nicas de las siguientes 32 cepas de *P. aeruginosa* visualizadas en los carriles de geles de poliacrilamida al 10% 6f los carriles 1 y 10 corresponden a dos marcadores de pesos diferentes (Gen Ruler y Lambda DNA/Hind III, respectivamente)



Huellas génicas de 14 cepas de *P. aeruginosa* visualizadas en los carriles de geles de poliacrilamida al 10% 6M Urea teñidos. 10 corresponden a dos marcadores de pesos diferentes (Gen Ruler y Lambda DNA/Hind III, respectivamente).

Anexo 6 | Grupos de similitud integrados por una sola cepa de *P. aeruginosa*

Paciente (Px)	Cepa	Fecha de aislamiento	Fenotipo colonial	Grupo de similitud
Px04	Pa53m	28/10/2016	Mucoide	36
Px06	Pa47r	14/09/2016	No mucoide	21
Px07	Pa12r	21/08/2015	No mucoide	33
Px08	Pa94r	08/08/2017	No mucoide	01
Px09	Pa77mb	01/02/2017	Mucoide	26
Px13	Pa116rc	10/08/2018	No mucoide	14
Px15	Pa32r	20/04/2016	No mucoide	16
Px15	Pa111m	05/06/2018	Mucoide	17
Px16	Pa100r	28/11/2017	No mucoide	07
Px17	Pa125r	08/07/2019	No mucoide	19
Px18	Pa03m	08/05/2015	Mucoide	23
Px21	Pa65r	17/11/2016	No mucoide	37
Px22	Pa05r	22/05/2015	No mucoide	08
Px22	Pa26r	25/01/2016	No mucoide	34
Px23	Pa64m	16/11/2016	Mucoide	31
Px24	Pa78r	09/02/2017	No mucoide	03
Px25	Pa33ra	06/05/2016	No mucoide	02
Px25	Pa119r	03/09/2018	No mucoide	04
Px27	Pa06r	28/05/2015	No mucoide	27
Px27	Pa25r	10/01/2016	No mucoide	28

Anexo 7 | Grupos de similitud integrados por más de una cepa de *P. aeruginosa*

Px	Cepa	Fecha de aislamiento	Fenotipo colonial	Grupo
Px01	Pa99ra	28/11/2017	No mucoide	6
	Pa99rb	28/11/2017	No mucoide	6
Px02	Pa02m	08/05/2015	Mucoide	40
	Pa27ma	19/02/2016	Mucoide	39
	Pa27mb	19/02/2016	Mucoide	39
	Pa27r	19/02/2016	No mucoide	39
	Pa28m	23/02/2016	Mucoide	39
	Pa29mb	04/03/2016	Mucoide	40
	Pa29ma	04/03/2016	Mucoide	40
	Px04	Pa53ra	28/10/2016	No mucoide
Pa53rb		28/10/2016	No mucoide	35
Pa58m		11/11/2016	Mucoide	35
Pa58ra		11/11/2016	No mucoide	35
Pa60m		15/11/2016	Mucoide	35
Pa60r		15/11/2016	No mucoide	35
Px05	Pa54ma	01/11/2016	Mucoide	24
	Pa54mb	01/11/2016	Mucoide	24
	Pa54ra	01/11/2016	No mucoide	24
	Pa54rb	01/11/2016	No mucoide	24
	Pa57r	10/11/2016	No mucoide	24
	Pa98rb	28/11/2017	No mucoide	30
Px09	Pa77ma	01/02/2017	Mucoide	25
	Pa77r	01/02/2017	No mucoide	25
Px10	Pa88ma	07/07/2017	Mucoide	22
	Pa88mb	07/07/2017	Mucoide	22
	Pa88ra	07/07/2017	No mucoide	22
	Pa88rb	07/07/2017	No mucoide	30
Px12	Pa70m	18/11/2016	Mucoide	29
	Pa70r	18/11/2016	No mucoide	29
	Pa82mb	31/03/2017	Mucoide	32
	Pa82r	31/03/2017	No mucoide	32
	Pa83ma	17/04/2017	Mucoide	32
	Pa83mb	17/04/2017	Mucoide	32
	Pa83r	17/04/2017	No mucoide	32
Px13	Pa01r	22/04/2015	No mucoide	13
	Pa116m	10/08/2018	Mucoide	13
	Pa116ra	10/08/2018	No mucoide	13
	Pa116rb	10/08/2018	No mucoide	13
Px14	Pa22r	21/12/2015	No mucoide	15
	Pa59r	11/11/2016	No mucoide	05
	Pa122r	05/03/2019	No mucoide	05
Px19	Pa112ma	05/06/2018	Mucoide	38
	Pa112mb	05/06/2018	Mucoide	38
	Pa112r	05/06/2018	No mucoide	38
Px22	Pa21ma	01/11/2015	Mucoide	11
	Pa21mb	01/11/2015	Mucoide	11
	Pa34m	01/06/2016	Mucoide	20
	Pa34r	01/06/2016	No mucoide	20
Px26	Pa35ma	08/06/2016	Mucoide	20
	Pa35mb	08/06/2016	Mucoide	20
	Pa35r	08/06/2016	No mucoide	20
	Pa36ma	15/06/2016	Mucoide	20
	Pa36mb	15/06/2016	Mucoide	20
	Pa36mc	15/06/2016	Mucoide	20
	Pa37ma	17/06/2016	Mucoide	20
	Pa37mb	17/06/2016	Mucoide	20
	Pa39r	22/06/2016	No mucoide	15
	Pa39m	22/06/2016	Mucoide	20
	Pa91ra	20/07/2017	No mucoide	20
	Pa91rb	20/07/2017	No mucoide	20
	Pa91rc	20/07/2017	No mucoide	20
	Pa84ra	23/06/2017	No mucoide	20
	Pa84rb	23/06/2017	No mucoide	20
	Pa84rc	23/06/2017	No mucoide	20
	Pa115ra	27/07/2018	No mucoide	12
	Pa115rb	27/07/2018	No mucoide	12
	Pa115rc	27/07/2018	No mucoide	12
	Pa115m	27/07/2018	Mucoide	12
	Pa117ma	29/08/2018	Mucoide	12
	Pa117mb	29/08/2018	Mucoide	12
	Pa117mc	29/08/2018	Mucoide	12
	Pa117ra	29/08/2018	No mucoide	12
	Pa117rb	29/08/2018	No mucoide	12
	Pa117rc	29/08/2018	No mucoide	12
	Pa118ma	03/09/2018	No mucoide	12
	Pa118mb	03/09/2018	Mucoide	12
Pa118mc	03/09/2018	Mucoide	12	
Pa120ma	26/09/2018	Mucoide	12	
Pa120mb	26/09/2018	Mucoide	12	
Pa120ra	26/09/2018	No mucoide	12	
Pa120rb	26/09/2018	No mucoide	12	
Pa120rc	26/09/2018	No mucoide	12	
Pa124ra	16/04/2019	No mucoide	12	
Pa124rb	16/04/2019	No mucoide	12	
Pa124rc	16/04/2019	No mucoide	12	
Px28	Pa102m	28/11/2017	Mucoide	18
	Pa102ra	28/11/2017	No mucoide	18
	Pa102rb	28/11/2017	No mucoide	18
	Pa102rd	28/11/2017	No mucoide	18
	Pa102re	28/11/2017	No mucoide	18
Px28	Pa17ma	23/09/2015	Mucoide	09
	Pa17mb	23/09/2015	Mucoide	09
	Pa50mb	07/10/2016	Mucoide	09
	Pa50ma	07/10/2016	Mucoide	10
	Pa50mc	07/10/2016	Mucoide	10
	Pa51ma	10/10/2016	Mucoide	10
	Pa51mb	10/10/2016	Mucoide	10
Pa90m	18/07/2017	Mucoide	10	