



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA ACOPLADAS AL
APTÁMERO F23 CON RECONOCIMIENTO ESPECÍFICO POR
Pseudomonas aeruginosa.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

P R E S E N T A

JUAN CARLOS GUTIÉRREZ SANTANA

COMITÉ TUTORAL

Dra Marisol López López (Codirector)

Dr. Victor Rafael Coria Jiménez (Codirector)

Dra. Julia Dolores Toscano Garibay (Asesora)

Ciudad de México, 21 de junio de 2023.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**Desarrollo de nanopartículas de plata acopladas al aptámero F23
con reconocimiento específico por *Pseudomonas aeruginosa*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

P R E S E N T A

M. en C. JUAN CARLOS GUTIÉRREZ SANTANA

COMITÉ TUTORAL:

Codirector interno: Dra. Marisol López López.

Laboratorio de Genética Molecular (N-103), Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco.

Codirector externo: Dr. Victor Rafael Coria Jiménez.

Laboratorio de Bacteriología Experimental, Torre de investigación "Joaquín Cravioto". Instituto Nacional de Pediatría.

Asesor externo: Dra. Julia Dolores Toscano Garibay.

Coordinación de Soluciones Diagnósticas, Unidad de Investigación, Dirección de Planeación, Enseñanza e Investigación, Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca.

Ciudad de México, a 21 de junio de 2023.



Instituto
Nacional
de Pediatría

El presente trabajo fue realizado en el “Laboratorio de Genética Molecular (N-103)” del Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad-Xochimilco y en el “Laboratorio de Bacteriología Experimental” de la Torre de investigación “Joaquín Cravioto” del Instituto Nacional de Pediatría, bajo la dirección de la Dra. Marisol López López y el Dr. Victor Rafael Coria Jiménez.

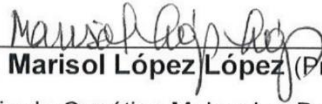
El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 2018-000068-02NACF-28106, que comprendió del periodo de 01 de septiembre de 2018 al 31 de agosto de 2022. El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACyT y cuenta con apoyo del mismo consejo, mediante el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó:

Juan Carlos Gutiérrez Santana

El día 21 de junio de 2023

JURADO:



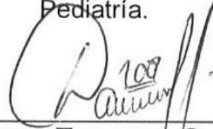
Dra. Marisol López López (Presidente).

Laboratorio de Genética Molecular, Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-Xochimilco.



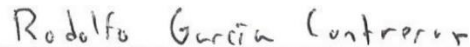
Dr. Victor Rafael Coria Jiménez (Secretario).

Laboratorio de Bacteriología Experimental, Torre de Investigación "Joaquín Cravioto", Instituto Nacional de Pediatría.



Dra. Julia Dolores Toscano Garibay (Vocal).

Coordinación de Soluciones Diagnósticas, Unidad de Investigación, Dirección de Planeación, Enseñanza e Investigación, Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca.



Dr. Rodolfo García Contreras (Vocal).

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.



Dr. Alberto Ortega Vázquez (Vocal).

Laboratorio de Genética Molecular, Departamento de Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-Xochimilco.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00141

Matrícula: 2183804919

Desarrollo de nanopartículas de plata acopladas al aptámero F23 con reconocimiento específico por Pseudomonas aeruginosa.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 21 del mes de junio del año 2023 en la Unidad Xochimilco de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARISOL LOPEZ LOPEZ
DR. ALBERTO ORTEGA VAZQUEZ
DRA. JULIA DOLORES TOSCANO GARIBAY
DR. RODOLFO GARCIA CONTRERAS
DR. VICTOR RAFAEL CORIA JIMENEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: JUAN CARLOS GUTIERREZ SANTANA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobado

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



JUAN CARLOS GUTIERREZ SANTANA
ALUMNO

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. LUIS AMADO AYALA PEREZ

PRESIDENTA

DRA. MARISOL LOPEZ LOPEZ

VOCAL

DR. ALBERTO ORTEGA VAZQUEZ

VOCAL

DRA. JULIA DOLORES TOSCANO GARIBAY

VOCAL

DR. RODOLFO GARCIA CONTRERAS

SECRETARIO

DR. VICTOR RAFAEL CORIA JIMENEZ

“Einstein se equivocaba cuando decía que ‘Dios no juega a los dados con el universo’. Considerando las hipótesis de los agujeros negros, Dios no solo juega a los dados con el universo: a veces los arroja donde no podemos verlos”.

Stephen Hawking.

“La innovación es lo que distingue a un líder de un seguidor”.

Steve Jobs.

¿Cómo que “si puedes”?

¡Todo es posible para el que cree!

Marcos 9:23 DHH.

AGRADECIMIENTOS.

En los numerales siguientes se reconoce textualmente el apoyo invaluable que organismos gubernamentales, laboratorios, personas, entre otros, brindaron al autor de esta tesis, para la realización y conclusión de este proyecto.

1. Reiterando su importancia, se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de Doctorado con el número de registro 2018-000068-02NACF-28106 otorgada al autor, la cual comprendió el periodo de 01 de septiembre de 2018 al 31 de agosto de 2022.
2. Al Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana por darme la oportunidad de formar parte de su matrícula de alumnos.
3. Al “Laboratorio de Genética Molecular (N-103)” del Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad-Xochimilco, expresamente a la Dra. Marisol López López por su tutoría, pero también por la amistad brindada.
4. A los integrantes del “Laboratorio de Bacteriología Experimental” de la Torre de investigación “Joaquín Cravioto” del Instituto Nacional de Pediatría, principalmente al Dr. Victor Rafael Coria Jiménez, por su tutoría y enseñanza microbiológica, su dedicación y apoyo a mi crecimiento profesional, así como por proporcionar un espacio físico para llevar a cabo la fase experimental de este trabajo.
5. A la Dra. Julia Dolores Toscano Garibay, por su asesoría en la aplicación de aptámeros en el área médica, así como a su apreciada amistad brindada a mi persona.
6. Al Dr. Armando Hernández García del “Laboratorio de Ingeniería Biomolecular y Bionanotecnología”, Instituto de Química-UNAM, por su consejería en la evaluación metodológica de la inmovilización de aptámeros sobre nanopartículas, así como su posible visualización por microscopía de fuerza atómica, el cual constituye una de las perspectivas de este estudio.
7. A la Dra. Bertha Molina Álvarez encargada del “Laboratorio de Citogenética” de la Torre de investigación “Joaquín Cravioto” del Instituto Nacional de Pediatría, por concederme el uso del microscopio de fluorescencia que fue imprescindible para el abordaje metodológico del aptámero fluorescente (*FAM~F23*).
8. A la Dra. Alejandra Aquino Andrade encargada del “Laboratorio de Microbiología Molecular” de la Torre de investigación “Joaquín Cravioto” del Instituto Nacional de

Pediatría, así como a la Dra. Jocelin Merida Vieyra, adscrita a ese laboratorio, por permitirme utilizar el equipo de espectrofotometría UV/Vis bajo resguardo suyo, por su asesoría en el manejo del equipo, así como en otros asuntos referentes a mi desarrollo profesional.

9. A cada uno de los miembros del jurado asignado por la Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud para la evaluación del Examen Predoctoral, por las aportaciones valiosas que enriquecieron este manuscrito (Dr. Rodolfo García Contreras, Dra. Julia Dolores Toscano Garibay, Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez, Dra. Margarita de la Luz Camorlinga Ponce y al Dr. Alberto Ortega Vázquez) y quienes tienen mi admiración de manera profesional, sirviendo de modelo para desarrollar en mi persona una carrera científica exitosa, tal y como ellos lo han logrado.
10. A la Dra. Elena Aréchaga Ocampo, miembro de la Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud asignada para mi Evaluación Predoctoral y Disertación Pública, por su amabilidad y oportuna respuesta en cada parte del proceso de obtención del grado de Doctor en Ciencias Biológicas y de la Salud.
11. A la Dra. Aida Hamdan Partida por su guía y consejería académica en el asesoramiento de alumnos, apoyando de esa manera a mi desarrollo académico y profesional que evidentemente se verán reflejados en el futuro próximo.
12. Al siempre eficiente Lic. Vicente Cuauhtonal Gallegos Meza por todo su apoyo en la resolución de dudas, inscripciones, reportes, entrega de documentos y muchos otros aspectos administrativos.
13. A cada uno de los alumnos que he tenido la oportunidad de asesorar directa o indirectamente, ya que ha existido un flujo de conocimiento bidireccional, aportando conocimiento inestimable a un servidor y entre los cuales cito a: QFB. Diana Gloria Contreras Valencia, QFB. Miguel Angel González Ortíz, QFB. Pau-Yo Melanie Hernández García, Biol. Mónica Berenice Martínez Corona, Técnico en Química Industrial Anayeli De la luz Primitivo, pasante de QFB. Cinthya Jomara Meza García y pasante de QFB. Esther Casiano García.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

- A mis hermanos Ricardo y Grecia, a quienes amo, admiro y considero mucho más capaces y talentosos que un servidor.
- A mis padres Vicenta y Porfirio, por su dedicación y dureza en sembrar en mí los hábitos de la educación y la superación académica, sin eximir sus consejos, regaños, correctivos, palabras de aliento, oraciones a Dios por mi vida y mi futuro, así como por ser los cimientos fundamentales de las cualidades morales de este que suscribe. Todo lo que soy y lo que pueda llegar a ser se lo debo a ustedes.
- A mi amada esposa Neli, por estar presente en los momentos encantadores, pero también en los instantes más ásperos de mi vida, tomando mi mano incondicionalmente y apoyándome en todos los retos a los que el destino y mis decisiones me han sometido.
- A Dios, porque sin la fe puesta en Él no habría soportado la hostilidad de la existencia humana, y creo fervientemente que es Él quien ha puesto en mi camino a cada una de las personas que cité anteriormente, quienes me han aportado no solo conocimientos teóricos o prácticos, sino que algunos me han brindado una amistad genuina. Muchas gracias Dios por todo y por todos.

Declaración de originalidad.

El que suscribe **Juan Carlos Gutiérrez Santana**, alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, **Unidad Xochimilco**, y autor de la tesis titulada: **“Desarrollo de nanopartículas de plata acopladas al aptámero F23 con reconocimiento específico por *Pseudomonas aeruginosa*”**.

Declaro que:

1. La tesis que presento ante el Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, para lo obtención del grado de Doctor es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y/o fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el **19 de abril de 2023**.

Atentamente

Juan Carlos Gutiérrez Santana



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIDAD CUAJIMALPA

Av. Vasco de Quiroga 4871
Col. Santa Fe,
Cuajimalpa de Morelos
C.P. 05300, Cd. México
55 5814 6500 ext. 6534

doctoradocbs@correo.uam.mx

UNIDAD IZTAPALAPA

Av. Ferrocarril San Rafael
Atlixco 186, Col. Leyes de
Reforma 1a Sección, Iztapalapa
C.P. 09310, Cd. México
55 5804 4600 ext. 3461

UNIDAD LERMA

Av. De las Garzas 10
Col. El Panteón,
Lerma de Villada
C.P. 52005, Edo. de México
72 8282 7002 ext. 2002

<http://posgradocbs.uam.mx>


UNIDAD XOCHIMILCO

Calz. del Hueso 1100,
Col. Villa Quietud,
Coyoacán
C.P. 04960, Cd. México
55 5483 7000 ext. 7504

Carta de Cesión de Derechos.

En la Ciudad de México, el día 19 de junio del año 2023, quien suscribe **Juan Carlos Gutiérrez Santana**, alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, manifiesta que es autor intelectual de la tesis titulada “**Desarrollo de nanopartículas de plata acopladas al aptámero F23 con reconocimiento específico por *Pseudomonas aeruginosa***”, bajo la dirección del Comité Tutoral conformado por la **Dra. Marisol López López**, el **Dr. Víctor Rafael Coria Jiménez** y la **Dra. Julia Dolores Toscano Garibay**, cede los derechos del trabajo de tesis a la Universidad Autónoma Metropolitana para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin permiso expreso del autor o del Comité Tutoral del trabajo. Con el fin de solicitar autorización, los usuarios podrán escribir al correo electrónico **biol.jcgutierrez@gmail.com**; si el permiso es otorgado, el usuario deberá dar el seguimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Juan Carlos Gutiérrez Santana.
2183804919.



DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIDAD CUAJIMALPA
Av. Vasco de Quiroga 4871
Col. Santa Fe,
Cuajimalpa de Morelos
C.P. 05300, Cd. México
55 5814 6500 ext. 6534

UNIDAD IZTAPALAPA
Av. Ferrocarril San Rafael
Atlixco 186, Col. Leyes de
Reforma 1a Sección, Iztapalapa
C.P. 09310, Cd. México
55 5804 4600 ext. 3461

UNIDAD LERMA
Av. De las Garzas 10
Col. El Panteón,
Lerma de Villada
C.P. 52005, Edo. de México
72 8282 7002 ext. 2002

UNIDAD XOCHIMILCO
Calz. del Hueso 1100,
Col. Villa Quietud,
Coyoacán
C.P. 04960, Cd. México
55 5483 7000 ext. 7504

doctoradocbs@correo.uam.mx

<http://posgradocbs.uam.mx>

ÍNDICE.

1. ABREVIATURAS.	1
2. RESUMEN.	4
3. ABSTRACT.	5
4. MARCO TEÓRICO.	6
○ CRISIS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS.	6
○ APTÁMEROS.	7
▪ <i>Comparación entre aptámeros y anticuerpos.</i>	7
▪ <i>Versatilidad de los aptámeros.</i>	8
▪ <i>Aptámeros dirigidos a bacterias.</i>	8
▪ <i>Aptámero F23 para Pseudomonas aeruginosa.</i>	10
○ <i>P. AERUGINOSA</i> Y FIBROSIS QUÍSTICA.	12
○ <i>AGNPs</i> CONTRA <i>P. AERUGINOSA</i> .	14
○ <i>AGNPs</i> ACOPLADAS A APTÁMEROS.	15
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	17
6. JUSTIFICACIÓN.	17
7. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	17
8. HIPÓTESIS.	17
9. OBJETIVO GENERAL.	18
○ OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	18
10. MATERIAL Y MÉTODOS.	18
○ POBLACIÓN OBJETIVO.	18
▪ <i>Criterios de inclusión.</i>	18
▪ <i>Criterios de exclusión.</i>	19
○ TIPO DE ESTUDIO.	19
○ CÁLCULO DE TAMAÑO DE MUESTRA.	19
○ DESCRIPCIÓN OPERATIVA DEL ESTUDIO.	19
1. Evaluación del reconocimiento específico de <i>FAM~F23</i> hacia cepas de referencia de <i>P. aeruginosa</i> .	19
2. Acoplamiento entre el aptámero F23 a <i>AgNPs</i> .	21
3. Evaluación de la especificidad de <i>F23~AgNPs</i> hacia cepas de referencia de <i>P. aeruginosa</i> .	22
4. Selección de cepas de origen clínico de <i>P. aeruginosa</i> .	23
5. Evaluación del reconocimiento de <i>FAM~F23</i> a cepas de <i>P. aeruginosa</i> aisladas de pacientes con FQ.	29
6. Evaluación del reconocimiento de <i>F23~AgNPs</i> contra cepas aisladas de pacientes con FQ.	29
11. RESULTADOS.	31
1. Reconocimiento de cepas de referencia de <i>P. aeruginosa</i> con <i>FAM~F23</i> .	31
2. Obtención de las <i>F23~AgNPs</i> .	33
3. Reconocimiento de <i>F23~AgNPs</i> hacia cepas de referencia de <i>P. aeruginosa</i> .	36
4. Selección de cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i> .	39
5. Identificación microscópica de cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i> con <i>FAM~F23</i> .	66
6. Reconocimiento de cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i> con el complejo <i>F23~AgNPs</i> .	75

12. DISCUSIÓN.....	89
13. CONCLUSIONES.	102
14. PERSPECTIVAS.	103
15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	104
16. ANEXOS.....	121
○ ANEXO 1. RECONOCIMIENTO DE CEPAS DE REFERENCIA DE <i>P. AERUGINOSA</i> CON F23~AgNPs (OD ₄₀₂).	121
○ ANEXO 2. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LAS CEPAS CLÍNICAS DE <i>P. AERUGINOSA</i>	122
○ ANEXO 3. VALORES DE PUREZA DE CADA DNAG BACTERIANO.	125
○ ANEXO 4. RESUMEN DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS CLÍNICAS DE <i>P. AERUGINOSA</i>	127
○ ANEXO 5. ANTIBIOGRAMA DE LAS CEPAS CLÍNICAS DE <i>P. AERUGINOSA</i>	129
○ ANEXO 6. CEPAS CLÍNICAS DE <i>P. AERUGINOSA</i> SELECCIONADAS PARA LA EVALUACIÓN DEL ESTABLECIMIENTO DE BIOPELÍCULAS. 133	
○ ANEXO 7. ESTABLECIMIENTO DE BIOPELÍCULAS DE CEPAS DE REFERENCIA DE <i>P. AERUGINOSA</i>	135
○ ANEXO 8. ESTABLECIMIENTO DE BIOPELÍCULAS DE CEPAS CLÍNICAS DE <i>P. AERUGINOSA</i> (24 H).	136
○ ANEXO 9. ESTABLECIMIENTO DE BIOPELÍCULAS DE CEPAS CLÍNICAS DE <i>P. AERUGINOSA</i> (48 H).	139
○ ANEXO 10. ESTABLECIMIENTO DE BIOPELÍCULAS DE CEPAS CLÍNICAS DE <i>P. AERUGINOSA</i> (72 H).	142
○ ANEXO 11. SIGNIFICANCIAS ESTADÍSTICAS DE LOS ANÁLISIS COMPARATIVOS DEL ESTABLECIMIENTO DE BIOPELÍCULAS DE LAS CEPAS CLÍNICAS DE <i>P. AERUGINOSA</i> Y LAS CEPAS DE REFERENCIA DE <i>P. AERUGINOSA</i>	145
○ ANEXO 12. CATEGORIZACIÓN DE LAS CEPAS CLÍNICAS DE <i>P. AERUGINOSA</i> BASADO EN EL ESTABLECIMIENTO DE BIOPELÍCULAS A LAS 24 H.	147
○ ANEXO 13. CATEGORIZACIÓN DE LAS CEPAS CLÍNICAS DE <i>P. AERUGINOSA</i> BASADO EN EL ESTABLECIMIENTO DE BIOPELÍCULAS A LAS 48 H.	148
○ ANEXO 14. CATEGORIZACIÓN DE LAS CEPAS CLÍNICAS DE <i>P. AERUGINOSA</i> CON BASE EN EL ESTABLECIMIENTO DE BIOPELÍCULAS A LAS 72 H.	149
○ ANEXO 15. INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA IDENTIFICADA EN LAS CEPAS CLÍNICAS DE <i>P. AERUGINOSA</i>	150
○ ANEXO 16. DETECCIÓN DE F23~AgNPs EN EL SOBRENADANTE 1 DE LOS ENSAYOS DE INTERACCIÓN CON CEPAS CLÍNICAS DE <i>P. AERUGINOSA</i>	152
○ ANEXO 17. DETECCIÓN DE F23~AgNPs EN EL SOBRENADANTE 2 DE LOS ENSAYOS DE INTERACCIÓN CON CEPAS CLÍNICAS DE <i>P. AERUGINOSA</i>	153
○ ANEXO 18. PUBLICACIÓN 1.....	154
○ ANEXO 19. PUBLICACIÓN 2.....	161

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Iniciadores especie-específicos para <i>P. aeruginosa</i> .	25
Tabla 2. Condiciones de amplificación para <i>RAPD-PCR</i> .	26
Tabla 3. Distribución de cepas clínicas en categorías de resistencia a los antibióticos.	47
Tabla 4. Historial infeccioso del paciente Px02.	48
Tabla 5. Historial infeccioso del paciente Px03.	49
Tabla 6. Historial infeccioso del paciente Px04.	50
Tabla 7. Historial infeccioso del paciente Px01.	51
Tabla 8. Historial infeccioso del paciente Px12.	52
Tabla 9. Historial infeccioso de los pacientes Px13 y Px23.	53
Tabla 10. Características de las cepas con establecimiento de biopelículas máximo a las 24 h.	61
Tabla 11. Características de las cepas con establecimiento de biopelículas máximo a las 48 h.	62
Tabla 12. Características de las cepas con establecimiento de biopelículas máximo a las 72 h.	63
Tabla 13. Características de las 30 cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i> seleccionadas.	64
Tabla 14. Medidas de tendencia central y significancia de la intensidad de fluorescencia, basada en comparaciones diversas.	72
Tabla 15. Medidas de tendencia central y significancia de la intensidad de fluorescencia, basada en la comparación por agrupación de <i>RAPD</i> y hospedero.	74
Tabla 16. Medidas de tendencia central y significancia de la absorbancia de las cepas clínicas agrupadas por fenotipo colonial, categoría de resistencia y tipo de muestra clínica.	76
Tabla 17. Medidas de tendencia central y significancia de la absorbancia de las cepas clínicas agrupadas por hospedero y agrupación de <i>RAPD</i> .	78
Tabla 18. Medidas de tendencia central y significancia de la absorbancia de las cepas clínicas agrupadas por tratamiento, establecimiento de biopelículas e intensidad de fluorescencia.	79
Tabla 19. Características de las cinco cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i> que mostraron menor reconocimiento por F23~ <i>AgNPs</i> .	83
Tabla 20. Medidas de tendencia central y significancia de las absorbancias detectadas, comparadas por tres variables diferentes.	85
Tabla 21. Medidas de tendencia central y significancia de la absorbancia detectada en sobrenadantes 2, comparadas por hospedero y agrupación de <i>RAPD</i> , así como contra ambos grupos de cepas control.	88

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Tinción de Gram de cepas control.	31
Figura 2. Microscopía de fluorescencia de cepas control.	32
Figura 3. Intensidad de fluorescencia de cepas control.	33
Figura 4. Coloración de las soluciones empleadas en los ensayos de acoplamiento.	34
Figura 5. Aspecto visual de las soluciones resultantes del proceso de acoplamiento.	34
Figura 6. Análisis electroforético y espectrofotométrico de los acoplados F23~ <i>AgNPs</i> .	35
Figura 7. Detección de ácidos nucleicos monocatenarios en <i>AgNPs</i> .	36
Figura 8. Reconocimiento de F23~ <i>AgNPs</i> hacia cepas no-inactivadas.	37
Figura 9. Reconocimiento de F23~ <i>AgNPs</i> hacia cepas inactivadas.	38
Figura 10. Integridad de DNAg extraído.	40
Figura 11. Verificación de <i>pPCR</i> específicos para <i>P. aeruginosa</i> .	40
Figura 12. Identificación de cepas clínicas no- <i>P. aeruginosa</i> mediante 16S-23S rDNA ITS.	41
Figura 13. Detección de cepas clínicas no- <i>P. aeruginosa</i> mediante el antígeno O de la acetilasa.	42

Figura 14. Previsualización de <i>pRAPD-PCR</i> en geles de agarosa.....	43
Figura 15. Huellas genéticas de cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i>	44
Figura 16. Dendrograma de cepas de <i>P. aeruginosa</i> aisladas de pacientes con FQ.....	45
Figura 17. Infección cruzada entre dos pacientes con FQ.	46
Figura 18. Dendrograma del paciente Px19.....	54
Figura 19. Establecimiento de biopelículas de cepas de referencia de <i>P. aeruginosa</i>	56
Figura 20. Establecimiento de biopelículas de cepas de referencia de <i>P. aeruginosa</i> y 76 cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i>	57
Figura 21. Establecimiento de biopelículas por fenotipo, origen clínico y tratamiento.	59
Figura 22. Establecimiento de biopelículas por genotipo y hospedero.	60
Figura 23. Tinción de Gram de 18 cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i>	66
Figura 24. Tinción de Gram de 12 cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i>	67
Figura 25. Heterogeneidad de la intensidad de fluorescencia exhibida en las cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i>	68
Figura 26. Cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i> con fluorescencias \geq a las cepas de referencia de <i>P. aeruginosa</i>	69
Figura 27. Cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i> con menor intensidad de fluorescencia que las identificadas en cepas de referencia de <i>P. aeruginosa</i>	70
Figura 28. Comparación de fluorescencia por fenotipo colonial y categoría de resistencia.....	71
Figura 29. Comparación de la intensidad de fluorescencia mediante su agrupación por establecimiento de biopelículas.	73
Figura 30. Comparación múltiple de la intensidad de fluorescencia de las cepas agrupadas bajo cuatro argumentos distintos.....	75
Figura 31. Absorbancias identificadas en el sobrenadante 1 de los ensayos de interacción.	76
Figura 32. Comparaciones por agrupación de la absorbancia detectada en el sobrenadante 1 de los ensayos de interacción.	80
Figura 33. Comparaciones basadas en el establecimiento de biopelículas y las absorbancias detectadas correspondientes a F23~AgNPs.	81
Figura 34. Comparación de absorbancias respecto a la intensidad de fluorescencia.	82
Figura 35. Absorbancias identificadas en el sobrenadante 2 de los ensayos de interacción.	82
Figura 36. Comparaciones de las absorbancias detectadas en cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i> , basadas en cuatro categorías.....	84
Figura 37. Absorbancias detectadas en cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i> comparadas por tratamiento del hospedero.	86
Figura 38. Comparación por hospedero y agrupación de <i>RAPD</i> de las absorbancias detectadas en cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i>	87
Figura 39. Estructura química de fluorocromos derivados de la fluoresceína.	98

1. ABREVIATURAS.

Abreviatura	Significado
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
ABA	Aspirado bronco-alveolar
Ag	Plata
Ag ⁺	Iones de plata
AgNPs	Símbolo global aceptado para referirse a las nanopartículas de plata
AMC	Agar Mac-Conkey
AMG	Aminoglucósidos
AMR	Acrónimo en inglés de: Resistencia antimicrobiana
AN	Amikacina
ANOVA	Análisis de varianzas
ANS	Aspirado nasofaríngeo
ASM	Acrónimo en inglés de: Sociedad Americana de Microbiología
Au	Oro
AuNPs	Símbolo global aceptado para referirse a las nanopartículas de oro
AZM	Aztreonam
<i>B. anthracis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
<i>B. cepacia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
BHI	Infusión cerebro-corazón
BSA	Acrónimo en inglés de: Albúmina de suero bovino
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CARB	Carbapenémicos
CAZ	Ceftazidime
cDNA	DNA complementario
CEF	Cefalosporinas
CFF	Acrónimo en inglés de: Fundación de Fibrosis Quística
CFTR	Símbolo genético aprobado para el Gen de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística
CIP	Ciprofloxacina
CL	Colistina
CLSI	Acrónimo en inglés de: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio de los Estados Unidos
CN	Gentamicina
CRB	Carbenicilina
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxime
DNAg	DNA genómico
DR1	No-susceptibilidad a al menos un agente de una familia de antibióticos
DR2	No-susceptibilidad a al menos un agente de dos familias de antibióticos
DX	Dicloxacilina

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EXP	Expectoración
FAM	Carboxifluoresceína
FEP	Cefepime
FISH	Acrónimo en inglés de: Hibridación <i>in situ</i> fluorescente
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLQ	Fluoroquinolonas
FQ	Fibrosis quística
INP	Instituto Nacional de Pediatría
IPM	Imipenem
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Kd	Constante de disociación
kDa	Kilodaltones
<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
LBA	Lavado bronco-alveolar
LBE-INP	Laboratorio de Bacteriología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría
LDD	Límite de detección
LSPR	Acrónimo de Resonancia de plasmones localizados en superficie
LVX	Levofloxacina
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDR	Acrónimo en inglés de: Multirresistencia a los antibióticos (No-susceptible a al menos un agente de tres o más familias de antibióticos)
MEM	Meropenem
MHA	Agar Muller Hinton
MNPs	Símbolo global aceptado para referirse a las nanopartículas magnéticas
MON	Monobactámicos
NET	Netilmicina
NOR	Norfloxacina
NPs	Símbolo global aceptado para referirse a las nanopartículas
OD	Acrónimo en inglés de: Densidad óptica
OFX	Ofloxacina
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. alcaligenes</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>P. stutzeri</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
PanS	Pan-susceptibles
PB	Polimixina B
PBS	Acrónimo en inglés de: Amortiguador salino de fosfatos
PCR	Acrónimo en inglés de: Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Acrónimo en inglés de: Polietilenglicol
PEN	Penicilinas

PIP	Piperacilina
POL	Polimixinas
pPCR	Producto de PCR
pRAPD-PCR	Productos de la amplificación aleatoria de DNA polimórfico
QS	Acrónimo en inglés de: <i>Quorum sensing</i>
RAPD-PCR	Acrónimo en inglés de: Amplificación aleatoria de DNA polimórfico
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. enteritidis</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>S. maltophilia</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
SAM	Acrónimo en inglés de: Monocapas autoensambladas
SB	Secreción bronquial
SELEX	Acrónimo en inglés de: Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial
SNCT-INP	Servicio de Neumología y Cirugía de Tórax del Instituto Nacional de Pediatría
SWNTs	Nanotubos de carbono de pared simple
TCEP	Tris-(2-carboxietil)-fosfina
UE	Unión Europea
UFC	Unidades formadoras de colonias
Urea PAGE	Acrónimo en inglés de: Electroforesis en Geles de Poliacrilamida desnaturizante con Urea
USA	Acrónimo en inglés de Estados Unidos
Welch-ANOVA	Análisis de varianzas con corrección de Welch
WHO	Acrónimo en inglés de: Organización Mundial de la Salud
XDR	Extensamente resistente a los antibióticos (No susceptible a al menos un agente de todas las familias de antibióticos recomendadas para <i>P. aeruginosa</i> menos dos familias)

2. Resumen.

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista considerado como elemento de riesgo adicional en individuos con fibrosis quística (FQ), capaz de causar exacerbaciones pulmonares y muerte de estos pacientes. El diagnóstico tardío de estas infecciones es uno de los problemas por resolver pese a las herramientas moleculares actuales, lo cual repercute en el abordaje terapéutico de los infectados, favoreciendo el surgimiento de cepas resistentes a los antimicrobianos y reduciendo las terapias de erradicación disponibles. Por lo anterior, este patógeno se integra en la categoría de prioridad crítica para el desarrollo e investigación de antimicrobianos emitida por la Organización Mundial de la Salud, enfocada al combate de la “crisis” de resistencia a los antimicrobianos (AMR). El propósito principal de este trabajo fue desarrollar un complejo constituido por el aptámero F23 y nanopartículas de plata (AgNPs) para reconocer variantes fenotípicas diversas de esta especie aisladas de pacientes con FQ. Un total de 30 cepas con características heterogéneas, fueron seleccionadas de 118 aislados de niños con FQ, identificando fenotipos celulares y coloniales diversos, capacidades distintas de establecimiento de biopelículas y resistencia a los antibióticos. Las cepas seleccionadas exhibieron fluorescencias más intensas que las cepas no-*Pseudomonas aeruginosa* (Dunnett $p=0.0005$ a <0.0001), obtenido con el aptámero F23 marcado con carboxifluoresceína (FAM-F23) y microscopía de fluorescencia. La inmovilización de F23 sobre la superficie de las AgNPs (F23-AgNPs) fue corroborado por métodos espectrofotométricos y electroforéticos. El conjugado demostró reconocer a *Pseudomonas aeruginosa* entre otras tres especies filogenéticamente cercanas, mostrando falta de reconocimiento únicamente en cepas aisladas de pacientes bajo tratamiento con dicloxacilina (DX). Los resultados denotan el heterogéneo estrés selectivo y la enorme diversidad de interacciones bacterianas presentes en el ambiente pulmonar de los pacientes a partir de quienes se aislaron las cepas de estudio. La frecuencia de XDR es semejante a la reportada por centros de FQ que atienden a infantes y adultos, por lo que expresa una señal de precaución para el uso cuidadoso y consciente de los antibióticos disponibles, enfocado a reducir la progresión de la crisis de AMR. Además, el reconocimiento de FAM-F23 por esta especie podría sentar las bases para una herramienta diagnóstica rápida y barata, mientras que lo descrito para F23-AgNPs sugiere un área de oportunidad para desarrollar una terapéutica especie y sitio específica, aunque para ambas metas es necesario realizar más investigación.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, Fibrosis quística, resistencia a los antimicrobianos, aptámeros, nanopartículas.

3. Abstract.

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen considered as additional risk in patients with cystic fibrosis (CF) because it causes pulmonary exacerbations and death in these patients. Late diagnosis of infections is one of the problems to be solved despite current molecular tools, which hampers the treatment of infected patients favouring the emergence of antimicrobial resistant strains that progressively reduce the available eradication therapies. Thus, this pathogen has been included into the critical priority category for research and development of new antimicrobials published by the World Health Organisation, focused on combating the antimicrobial resistance (AMR) "crisis". The objective of this work was to develop a conjugated between F23 aptamer and silver nanoparticles (AgNPs) to recognise different phenotypic variants of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from CF patients. A total of 30 *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains with heterogeneous characteristics were selected from 118 bacterial isolates from children with CF, considering diverse cellular and colonial phenotypes, as well as different biofilm establishments and antibiotic resistance. Selected strains showed more intense fluorescence than non-*Pseudomonas aeruginosa* strains (Dunnett $p=0.0005$ to <0.0001), obtained with carboxyfluorescein-labelled F23 aptamer (FAM~F23) and fluorescence microscopy. The immobilisation of F23 aptamer onto the surface of AgNPs (F23~AgNPs) was corroborated by spectrophotometric and electrophoretic methods. The conjugate demonstrated to recognise to *Pseudomonas aeruginosa* among other phylogenetically close species, showing just lack of recognition in isolated from patients under dicloxacillin (DX) treatment. The results denote the heterogeneous selective stress and the great diversity of bacterial interactions found in the pulmonary environment of the patients from whom the strains were isolated. The frequency of XDR is similar to that reported in CF centres which provide medical care to infants and adults, exhibiting a cautionary signal for a careful and conscious use of available antibiotics to reduce the progression of AMR "crisis". In addition, the recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by FAM~F23 could lay the groundwork for developing a rapid and inexpensive diagnostic tool, while the results concerning to F23~AgNPs suggests an opportunity area for developing specific therapies for this pathogen, although both objectives require further research.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Cystic Fibrosis, Antimicrobial resistance, aptamers, nanoparticles.

4. Marco teórico.

○ Crisis de resistencia a los antibióticos.

Actualmente la morbilidad y mortalidad causada por infecciones bacterianas se han incrementado, debido a que especies bacterianas diversas han adquirido resistencia alarmante a distintos elementos antimicrobianos, aislando con mayor frecuencia cepas multirresistentes a los antibióticos (*MDR*, por su acrónimo en inglés), complicando los esquemas de tratamiento al reducir las opciones terapéuticas disponibles [1–13]. En países desarrollados, como los Estados Unidos (*USA*), más de dos millones de personas son infectadas con bacterias *MDR* al año, de las cuales cerca de 23,000 personas mueren como resultado de esas infecciones [8, 14]. Similarmente, en países de la Unión Europea (*UE*), las infecciones por microorganismos *MDR* ocasionan alrededor de 25,000 muertes anuales [15]. En 2017 eran reportados cerca de 700,000 decesos al año causados por estos patógenos y se estimaban hasta 10 millones de muertes para el año 2050 [15]. Sin embargo, en 2019 previo a la pandemia de COVID-19, la cifra ya había alcanzado los 4.95 millones de muertes asociadas a esas variantes bacterianas [16].

Este hecho, también conocido como “crisis” de resistencia a los antimicrobianos (*AMR*, por su acrónimo en inglés) [6, 8, 17], es un problema de salud importante con repercusiones económicas y sociales severas [1, 12, 14, 17–21]. Solamente en *USA*, el costo generado por antibióticos para el tratamiento de infecciones por microorganismos *MDR* es de aproximadamente 20,000 millones de dólares anuales [8], gasto socioeconómico que puede alcanzar los 150,000 millones de dólares anuales, al considerar las estancias prolongadas de los pacientes en las unidades hospitalarias, mientras que para los países miembros de *UE* la cifra podría ascender hasta los 1500 millones de euros al año [14, 15].

Esta “crisis” se ha generado por diversos factores, como el uso extenso e inadecuado de antibióticos en áreas diversas, permitiendo que las bacterias se adapten a los antimicrobianos existentes al exponerlas a dosis no-letales de los mismos [1, 20], adicionalmente algunos antibióticos poseen solubilidad escasa, biodisponibilidad baja, dificultad de alcanzar el sitio apropiado para llevar a cabo su acción y algunos pueden ser tóxicos para el ser humano a dosis elevadas [20]. Otro factor importante es el diagnóstico tardío, donde el estándar de oro (diagnóstico por cultivo y pruebas bioquímicas) permite la detección de patógenos después de varios días [14, 21, 22], lo que hace evidente la necesidad de contar con herramientas diagnósticas rápidas para la identificación bacteriana [14, 21], así como estrategias terapéuticas nuevas con mecanismos de acción diferentes a los conocidos

[1, 21], o bien, mejorar la acción de los antimicrobianos existentes a través de estrategias distintas, como el uso de aptámeros, con la finalidad de optimizar las propiedades farmacocinéticas de algunos de esos compuestos [14, 20].

- **Aptámeros.**

Los aptámeros son ácidos nucleicos monocatenarios cortos, seleccionados *in vitro* a partir de una biblioteca combinatoria grande de ácidos nucleicos mediante un proceso conocido como Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (*SELEX*, por su acrónimo en inglés) para reconocer con afinidades y especificidades altas a blancos específicos (moléculas pequeñas, macromoléculas, células completas, patógenos bacterianos e incluso tejidos) [23–26]. Son sintetizados con longitudes de 40-180 nucleótidos (n), con pesos moleculares de 6-50 kilodaltones (kDa) [27] y están constituidos por una región aleatoria central (20-60n) delimitada en cada extremo por regiones constantes (18-20n), utilizadas para amplificar las secuencias por *PCR* [25, 27–29].

Estas moléculas poseen la capacidad de plegarse en estructuras tridimensionales únicas para reconocer al blanco de interés [23, 24, 27, 28, 30, 31]. Así, el reconocimiento aptámero-blanco es logrado por compatibilidad estructural y combinaciones diversas de interacciones no-covalentes (fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas y electrostáticas) [27], en un proceso similar al reconocimiento antígeno-anticuerpo, por lo que son conocidos como "anticuerpos químicos" [28] o "anticuerpos sintéticos" [26], que establecen constantes de disociación (K_d) usualmente en el rango picomolar a nanomolar cuando el blanco es de peso molecular alto y en el rango nanomolar a micromolar para moléculas de peso molecular bajo [26–28].

- **Comparación entre aptámeros y anticuerpos.**

La afinidad y especificidad de los aptámeros es similar a la de los anticuerpos monoclonales [24–26, 30] y son capaces de discriminar entre enantiómeros y moléculas estructuralmente muy similares que difieren únicamente en un grupo funcional [24, 30].

Los aptámeros presentan ventajas extras sobre los anticuerpos. Por ejemplo, su tamaño y peso molecular pequeño les permiten internalizar en los tejidos y localizar la molécula de interés más rápidamente que los anticuerpos [28]. Además su síntesis *in vitro* constituye un argumento ético favorable, en contraste a las inmunizaciones en animales o cultivos celulares empleadas para la producción de anticuerpos [23, 24, 29, 30], permitiendo la producción de aptámeros con un costo mínimo, una variación menor en cada lote [25, 29, 30, 32] y la

posibilidad de seleccionar aptámeros dirigidos a moléculas tóxicas o no-inmunogénicas [23–25, 30, 32].

La vida útil de los aptámeros es superior a la de los anticuerpos, siendo estables en un rango amplio de condiciones como la desnaturalización química o térmica, la cual es un proceso irreversible en los anticuerpos mientras que los aptámeros recuperan rápidamente su estructura funcional [24, 25, 27, 28, 30, 32]. Adicionalmente, los aptámeros han mostrado *in vivo* ser no-tóxicos [27, 31] y tener inmunogenicidad nula o baja dependiente de su formulación, en contraste a la inmunogenicidad elevada mostrada con el uso de anticuerpos [27–29, 31, 32]. Es importante señalar que algunos aptámeros pueden bloquear las funciones de las moléculas blanco [25, 31, 33], por lo que recientemente han ganado gran interés para el desarrollo de estrategias terapéuticas nuevas para agentes infecciosos [24, 25, 27–33].

- **Versatilidad de los aptámeros.**

Entre las características desfavorables de los aptámeros se encuentra su carga generalmente negativa que podría impedir el reconocimiento de moléculas con la misma carga, causar repulsión electrostática con aptámeros vecinos estimulando reestructuraciones que imposibiliten el reconocimiento a la molécula blanco o bien presentar interacción inespecífica hacia diversas moléculas con carga positiva [23, 27, 30]. Adicionalmente, la sensibilidad de los aptámeros a las nucleasas presentes en los ambientes biológicos ocasiona su degradación rápida [21, 27, 28, 30, 32], aunada a la filtración renal expedita debida a su tamaño pequeño [27, 32, 33].

Dichas características perniciosas pueden ser evadidas gracias a que los aptámeros son modificables fácilmente para mejorar su bioestabilidad frente a nucleasas [25–30, 32], incrementar su biodisponibilidad, optimizar sus propiedades farmacocinéticas [27, 29, 32, 33], acrecentar su afinidad [27], evadir la respuesta inmune [27, 33], inactivar su acción a través del diseño de secuencias antisentido (generación de moléculas antídoto) [26] e incluso acoplarlas con moléculas reporteras, grupos funcionales o nanopartículas (NPs) para incrementar su aplicabilidad [23, 31–33].

- **Aptámeros dirigidos a bacterias.**

Desde el establecimiento del método de *SELEX* (1990) [34, 35] se han aislado numerosos aptámeros orientados a la detección de especies bacterianas diversas [23, 25, 26, 30]; principalmente usados como fase estacionaria de captura de moléculas, capaces de

identificar bacterias en muestras ambientales y clínicas con sensibilidades equivalentes o mayores a los cultivos convencionales [36, 37].

Estos aptámeros pueden ser dirigidos a epítopes específicos de la superficie de los patógenos bacterianos, proteínas, toxinas e incluso esporas secretadas por microorganismos diversos [14, 22, 26, 38, 39]. Por ejemplo, Bruno J. G. y Kiel L. (1999) seleccionaron aptámeros con afinidad elevada para detectar y unir a esporas de *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*), permitiendo la detección del patógeno por quimioluminiscencia mediante el reconocimiento de las esporas con aptámeros biotinilados y su interacción natural con avidina [26, 38].

Entre los aptámeros que reconocen motivos de la superficie bacteriana, se encuentra el aptámero ONS23 marcado con carboxifluoresceína (*FAM*), que ha demostrado selectividad por *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) a través de la visualización de la marca fluorescente del aptámero por microscopía de fluorescencia y confirmación mediante *PCR* [40]. En 2013, Duan N. y cols. seleccionaron el aptámero ST2P para reconocer a *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) con K_d de 6.33 ± 0.58 nM y fue evaluado mediante ensayos de fluorescencia utilizando aptámeros marcados con *FAM*, permitiendo límites de detección (LDD) de 25 unidades formadoras de colonias (UFC)·mL⁻¹ [41]. También para *S. typhimurium* los aptámeros SAL 28, SAL 11 y SAL 21 han sido seleccionados y utilizados para diseñar un sistema de detección colorimétrica para dicha bacteria, logrando detectar desde 10² UFC·mL⁻¹ [42].

Similarmente, Friedman A. y cols. (2015), seleccionaron aptámeros de RNA contra la proteína A de *Staphylococcus aureus* (SpA) utilizando una biblioteca de RNA modificada con 2'-F-dG, 2'-OMe-dA/dC/dU (fGmH), generando aptámeros resistentes a la hidrólisis alcalina y a muchas de las nucleasas presentes en suero, lo cual podría mejorar la farmacocinética de aptámeros utilizados en sistemas *in vivo*. Los aptámeros anti-SpA fueron conjugados con *NPs* de plata (*AgNPs*), las cuales tienen propiedades antibacterianas *per se*, por lo que los aptámeros permitieron una acción antibacteriana dependiente de SpA [43]. Hallazgo que sugiere que la combinación de las propiedades de los aptámeros y las *NPs* puede constituir una herramienta prometedora para futuras aplicaciones *in vivo*.

Adicionalmente, los aptámeros E1, E2, E10 y E12 marcados con *FAM* y dirigidos a *Escherichia coli* (*E. coli*), evidenciaron una K_d de 12.4 a 25.2 nM con la capacidad de reconocer otras clonas de *E. coli* sin ligar a bacterias de otras especies [44], aspecto similar a lo reportado para los aptámeros RAB10 y RAB35 dirigidos a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), los cuales poseen afinidad disminuida para reconocer a otras especies bacterianas mientras permiten LDD de 10² UFC·mL⁻¹ de *S. aureus* [45].

Entre los aptámeros que reconocen proteínas bacterianas, se encuentra el aptámero CSIR 2.11 seleccionado por Rotherham L. y cols. (2012), el cual demostró valores de sensibilidad y especificidad resaltables para reconocer y unir a un heterodímero formado por las proteínas CFP-10 y ESAT-6, mismas que son producidas y secretadas por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), lo cual fue evaluado en muestras de esputo de pacientes con tuberculosis [46]. Similarmente, la proteína MPT64 secretada por *M. tuberculosis* fue el blanco utilizado para seleccionar aptámeros anti-*M. tuberculosis*, los cuales mostraron valores de afinidad y especificidad elevados, que adicionalmente reducen la probabilidad de obtener resultados falsos-positivos [39].

Existen aptámeros con la capacidad de bloquear las funciones de microorganismos a través de mecanismos completamente diferentes a los utilizados por los antibióticos tradicionales, como el bloqueo de los antígenos de superficie de los patógenos mediante una neutralización pasiva, misma que inhibe el crecimiento bacteriano [47]. Algunos ejemplos de aptámeros antimicrobianos son los aptámeros SE-6 y SE-20 selectivos para *Salmonella enteritidis* (*S. enteritidis*) y los aptámeros ST-12 y ST-33 dirigidos a *S. typhimurium*, los cuales inducen la despolarización de la membrana celular bacteriana, inhibiendo el crecimiento bacteriano [48, 49]. Por otro lado, el aptámero NK2 específico para *M. tuberculosis* ha demostrado reducir la cantidad de bacterias presentes en ratones previamente infectados y mejoró las manifestaciones patológicas de la infección [25, 49–51]. Actualmente hay pocos reportes de aptámeros desarrollados con actividades antimicrobianas [49], pero es evidente la gran oportunidad del uso de estas biomoléculas como una alternativa a los enfoques tradicionales para la terapia de enfermedades infecciosas [25, 37].

- **Aptámero F23 para *Pseudomonas aeruginosa*.**

En el año 2011, Wang y cols. reportaron la primera selección de aptámeros de DNA para reconocer y unir específicamente a *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) [37, 49, 52] donde el aptámero F23 presentó la mayor afinidad (17.27 ± 5.00 nM) [37, 49]. El aptámero F23 marcado con isotiocianato de fluoresceína (*FITC*) se utilizó para desarrollar una prueba de hibridación *in situ* fluorescente (*FISH*, por su acrónimo en inglés) para la detección específica de *P. aeruginosa*, sin mostrar actividad para cepas de otros géneros y especies como *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *E. coli*, *S. aureus*, ni especies cercanamente relacionadas como *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*), *Pseudomonas putida* (*P. putida*) o *Pseudomonas stutzeri* (*P. stutzeri*) [37, 52].

Kim y cols. (2013) utilizaron el aptámero F23 marcado con *FITC* para desarrollar un método de detección de *P. aeruginosa* (ATCC® 10145™) en agua potable. El aptámero F23 fue utilizado bajo dos modificaciones: un aptámero biotinilado en el extremo 5' y un aptámero conjugado a un espaciador biotinilado, ambas modificaciones permitieron el acoplamiento de los aptámeros a *Quantum Dots* (QDs). Se evaluaron los límites de detección de los tres sistemas (*FITC*-aptámero F23; QD-aptámeroF23; QD-espaciador-aptámero F23) utilizando cultivos en fase estacionaria [37, 52], donde el sistema *FITC*-aptámero F23 fue el único que mostró fluorescencia con LDD de 5.07 células·mL⁻¹ en 30 min [52], demostrando que la nanotecnología también puede presentar sucesos desfavorables para moléculas de reconocimiento promisorias.

Posteriormente, Yoo S. y cols. (2015) utilizaron tres aptámeros para generar un sensor multiplex para *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*), *S. typhimurium* y *P. aeruginosa* basado en NP de sílica cubiertas con oro, utilizando el aptámero F23 para la identificación específica de *P. aeruginosa*. Este sistema utilizó la capacidad de detección de los aptámeros aunado a las propiedades estructurales, electrónicas, catalíticas y ópticas de la resonancia de plasmones localizados en superficie (*LSPR*, por sus acrónimo en inglés) exhibida por NPs metálicas y cuyas características son consideradas promisorias para la detección sensible de biomoléculas [21, 22, 53]. El sistema no mostró variaciones en los picos de intensidad de *LSPR* en controles negativos (*E. coli* y solución sin bacterias), pero fue capaz de detectar los cambios de *LSPR* de las NPs ocasionados por los cambios estructurales de los aptámeros inmovilizados al reconocer a *P. aeruginosa* con LDD de 30 UFC por ensayo [21, 30, 53].

En 2018, el aptámero F23, renombrado como PA-ap1 por Wang S y cols. [22], fue utilizado para formar dos complejos con nanotubos de carbono de pared simple (*SWNTs*, por su acrónimo en inglés). El aptámero F23 se conjugó directamente a *SWNTs* (Apt-*SWNTs*) y similarmente el aptámero F23 se acopló a ciprofloxacina (CIP) y *SWNTs* (Apt-CIP-*SWNTs*). Ambos complejos fueron utilizados como agentes anti-biopelícula contra *P. aeruginosa*, donde apt-*SWNTs* disminuyó en ~36% el establecimiento de biopelículas formadas por *P. aeruginosa* (ATCC® 27853™) mientras el complejo apt-CIP-*SWNTs* redujo hasta ~90% en comparación a la actividad anti-biopelícula mostrada por cada elemento en solitario (*SWNTs*, CIP y aptámero), demostrando la utilidad del aptámero F23 para ser usado como agente acarreador de compuestos anti-biopelícula contra *P. aeruginosa* [22].

Adicionalmente, el aptámero F23 ha sido utilizado para la elaboración de una plataforma de detección de *P. aeruginosa* basado en *LSPR*, donde a partir de aptámeros biotinilados unidos a neutravidina y a su vez fijados mediante polietilenglicol biotinilado (Bt-PEG) a una

superficie con arreglos hexagonales de nanotriángulos de oro, fue posible capturar a *P. aeruginosa* PAO1 (ATCC® 15692™), con LDD de una célula en ~3h, demostrando que tanto los aptámeros como la *LSPR* son elementos promisorios para desarrollar estrategias diagnósticas potenciales [21].

Recientemente se han descrito dos sistemas de detección de *P. aeruginosa* mediante fluorescencia con el uso del aptámero F23 y moléculas magnéticas [54]. En 2017, el aptámero fue unido covalentemente a *NPs* superparamagnéticas de óxido de hierro (*SPIO*) que permanecen monodispersas en solución, pero en presencia de *P. aeruginosa* (ATCC® 27853™) se forman agrupaciones de *SPIO*, ocasionando que los tiempos de relajación de spin de las *SPIO* se incrementen, permitiendo incluso la cuantificación bacteriana con un límite de detección de 50 UFC·mL⁻¹ [55]. Otra estrategia metodológica utilizó al aptámero F23 inmovilizado a *NPs* magnéticas (*MNPs*) y DNA complementario a la secuencia del aptámero marcado con *FAM* (*FAM*-cDNA), que en soluciones sin *P. aeruginosa* establecen agrupaciones de *MNPs*~F23~cDNA-*FAM*. Sin embargo, la presencia de la bacteria (ATCC® 15442™) desplazó a cDNA-*FAM* formando un complejo nuevo constituido por *MNPs*~F23~*P. aeruginosa*, que fueron separados por magnetismo para detectar al agente reportero (*FAM*-cDNA) libre en la solución con LDD de una UFC·mL⁻¹ [54].

○ *P. aeruginosa* y fibrosis quística.

El bacilo Gram negativo *P. aeruginosa* tiene una distribución ubicua en el ambiente [56–59], considerado un patógeno oportunista versátil y amenazante [60], capaz de causar infecciones nosocomiales primordialmente en pacientes que presentan condiciones predisponentes, como son: inmunodeficiencias, quemaduras o fibrosis quística (FQ) [56–59, 61, 62]. Esta última es una enfermedad monogénica [63–66] rara y hasta el momento incurable [63], causada por variantes patogénicas del gen regulador de la conductancia transmembranal de la FQ (*CFTR*), el cual bajo condiciones normales, traduce a una glicoproteína transmembranal que funciona como canal aniónico epitelial [64, 66, 67] para el transporte de cloruro y bicarbonato [66] desde el espacio intracelular hacia el espacio extracelular [67–69], expresándose en órganos diversos [68–70].

A pesar de los distintos órganos afectados por las variantes de *CFTR*, las causas principales de morbilidad y mortalidad en los individuos con FQ, son los daños ocasionados en sus vías aéreas [71, 72], donde el descenso de volumen de fluidos paraciliares [73], afectan la viscosidad del moco [68], tornándose espeso, deshidratado [68, 74, 75] y pegajoso [74, 75],

favoreciendo la colonización microbiana temprana [76–79] primordialmente por *P. aeruginosa* [80–82].

Las infecciones agudas orquestadas por esta bacteria pueden resultar en sepsis y muerte del huésped [56], pero las infecciones crónicas que están asociadas con el incremento de la morbilidad y mortalidad en pacientes con FQ [56, 83–85] requieren de terapias prolongadas con antibióticos [56, 59], complicando progresivamente los esquemas de tratamiento al inducir la selección de cepas *MDR* [56–58, 61, 86].

Los pacientes con FQ son sometidos a terapias tempranas y prolongadas con antibióticos incluso antes de la primera infección con *P. aeruginosa* [87, 88], con la finalidad de retardar o impedir el establecimiento o progresión de infecciones crónicas [56, 59]. Los antibióticos clínicamente efectivos contra las infecciones causadas por este patógeno son los aminoglucósidos, fluoroquinolonas y β -lactámicos, mientras que los carbapenémicos son usados como la última opción previo a las polimixinas (colistina) [89].

La gran capacidad adaptativa de *P. aeruginosa* [57, 58, 88], se debe a varios factores, como su genoma grande (5-7 millones de pares de bases), que alberga una proporción substancial de genes que codifican para proteínas reguladoras [90], permitiéndole adecuarse al ambiente hostil de los pulmones de dichos pacientes [59, 62], seleccionando cepas con fenotipo mucoide que disminuyen su virulencia innata [56, 58, 59], su pigmentación y su movilidad [62], adicionalmente hacen uso de vías metabólicas alternativas e incrementan el rango de mutaciones [62] permitiéndole encauzarse a la producción de biopelículas [56, 58], mismas que fortalecen la comunicación bacteriana y la evolución clonal en rasgos diversos [58, 59], como la resistencia a compuestos antimicrobianos [57–59, 61, 62, 86], estableciendo infecciones difíciles de erradicar, que persisten a pesar de la respuesta inmune robusta [56, 58, 86] y la terapia agresiva con antibióticos [56, 86, 91].

Está documentado que la resistencia a los antibióticos tiende a ser mayor en las cepas de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes con FQ, en contraste a las aisladas de pacientes inmunocomprometidos, quemados o ulcerados [56, 58], la frecuencia de cepas *MDR* en dichos pacientes se ha incrementado pasando del 15.7% de cepas *MDR* registradas en el reporte del 2013 de la Fundación de FQ (*CFF*, por su acrónimo en inglés) alcanzando el 45% para 2019 [62, 92]. Por esa causa, los regímenes de antibióticos contra *P. aeruginosa* están comenzando a ser inefectivos, por lo que actualmente se llevan a cabo estudios multicéntricos para comparar nuevas combinaciones de antibióticos y otras estrategias de erradicación de cepas *MDR*, como el uso de inhibidores de *Quorum sensing* (QS), fagos y *NPs* [56, 86].

○ **AgNPs contra *P. aeruginosa*.**

Las *NPs* son partículas con al menos una dimensión menor a 100 nm, cuyas propiedades dependen de su forma y tamaño [93, 94]. Su relación superficie-volumen alta les confiere reactividad elevada e interacciones únicas con sistemas biológicos [86, 93–95]. Las *AgNPs* han llamado la atención para combatir a *P. aeruginosa* debido a su reactividad natural alta a células bacterianas y su liberación constante de iones plata (Ag^+) [86, 95–99].

Es conocido que la carga positiva de las *AgNPs* favorece su adhesión y acumulación en la membrana externa bacteriana y dependiendo de su tamaño pueden internalizar en las bacterias [98]. Ahí las *AgNPs* inducen la muerte bacteriana mediante la formación de huecos en su membrana externa [86, 95, 96, 98, 100], acción potencializada por los iones Ag^+ que interactúan con componentes de la pared celular que contienen azufre o fósforo, creando poros membranales que ocasionan la salida del contenido citoplásmico y la eliminación del gradiente de protones [98]. Adicionalmente, los Ag^+ internalizados en la bacteria inhiben la replicación del DNA, la producción de ATP e inactivan enzimas debido a su interacción con proteínas y ácidos nucleicos cargados negativamente [86, 96, 98].

Se ha demostrado que las *AgNPs* esféricas y ≤ 10 nm son las que poseen las mejores cualidades antibacterianas contra *P. aeruginosa* [86, 94, 101, 102], mostrando acción bacteriostática y bactericida dependientes de la dosis y el tiempo de contacto, a 2 $\mu\text{g/mL}$ se detiene el crecimiento bacteriano de cepas sensibles y a 300 $\mu\text{g/mL}$ el crecimiento de cepas *MDR*, mientras que a concentraciones mayores se logra la muerte bacteriana [94, 101–104]. La inhibición del 98-100% del crecimiento se alcanza dentro de las primeras 24h de tratamiento con *AgNPs* [101]. Está documentado que las *AgNPs* inhiben el establecimiento de biopelículas de este patógeno y promueven su degradación de manera dosis y tiempo-dependiente [94, 95, 101, 103].

Recientemente, las *AgNPs* se han utilizado incorporadas en hidrogeles aplicados en catéteres [86, 105] y combinadas con antibióticos diversos (CIP, vancomicina, gentamicina, estreptomicina, ampicilina, kanamicina, imipenem, trimetoprim, aztreonam y polimixina B) obteniendo propiedades antibacterianas y antibiopelículas mejoradas [22, 86, 95, 99, 101, 106]. El éxito en dichas pruebas indica que estas *NPs*, pese a ser consideradas un riesgo potencial al ambiente [93], podrían ofrecer oportunidades para combatir las infecciones causadas por cepas *MDR* de *P. aeruginosa* [86].

○ **AgNPs acopladas a aptámeros.**

Actualmente el interés por el uso combinado de las *NPs* con aptámeros se ha incrementado debido a que sinérgicamente otorgan aplicaciones potenciales en biomedicina [107–109]. El área de superficie grande de las *NPs* permite una densidad elevada del aptámero sobre su superficie, incrementando el reconocimiento del aptámero a su blanco por acción cooperativa [23, 107, 108], misma que puede amplificar la afinidad de unión de la molécula conjugada así como proteger a los ácidos nucleicos de la digestión por nucleasas en sistemas vivos [108]. Sin embargo, es crucial que la estructura tridimensional de un aptámero no sea afectada por el acoplamiento [23, 27].

El proceso de inmovilización de aptámeros sobre *NPs* metálicas ha sido descrito ampliamente, enfocado en la generación de biosensores basados en *AuNPs* [23, 33, 108, 110], pero debido a que las *AgNPs* poseen propiedades similares a las *AuNPs* [33, 108] se han realizado acoplamientos exitosos bajo las mismas estrategias metodológicas [108–111].

Se ha descrito que los aptámeros *per se* son atraídos a la superficie de *NPs* metálicas a través de fuerzas electrostáticas que actúan entre las cargas de ambos elementos [108, 110] y pueden actuar como estabilizadores, evitando la agregación de *NPs* mediante repulsión electrostática [23]. Sin embargo esas interacciones electrostáticas pueden inhibir el plegamiento funcional de los aptámeros, lo que puede ser evitado con la modificación de la superficie de las *NPs* con fosfinas o tioles [23, 110].

La estrategia más utilizada para el acoplamiento exitoso es la introducción de un grupo funcional –tiol en la secuencia del aptámero [23, 108] que debido a su afinidad elevada a superficies de metales nobles como el oro (*Au*) y la plata (*Ag*) [110] es absorbido en la superficie de *NPs* metálicas formando monocapas auto-ensambladas (*SAM*, por su acrónimo en inglés) mediante un proceso denominado quimisorción [23, 109, 110], donde el azufre (S) del grupo –tiol funge como donador de electrones a la superficie cargada positivamente de dichas *NPs*, estableciendo un enlace covalente fuerte que protege el núcleo de las *NPs*, evitando su agregación y promoviendo el acoplamiento ordenado [23, 108, 110].

Se ha demostrado que la localización del grupo –tiol en uno de los extremos terminales de un aptámero reduce su riesgo de afectar su plegamiento al ser inmovilizado sobre *AuNPs*, sin embargo, es recomendable diseñar aptámeros con localizaciones diversas del grupo acoplador para seleccionar la modificación con el mejor desempeño (extremo 5' o 3') [23, 112]. Además, la cercanía entre el aptámero y la superficie de la *NP* así como la densidad de aptámero sobre ella puede interferir con su plegamiento funcional, por lo que el uso de

moléculas espaciadoras, que otorguen un espacio adicional y así permitir el plegamiento correcto [23, 112, 113], es una estrategia común, como la adición de varios nucleótidos de timina [23], aunque dichas adiciones, así como el ajuste de la densidad del aptámero deben ser evaluados experimentalmente [23, 112, 113].

5. Planteamiento del problema.

P. aeruginosa es el microorganismo más frecuentemente aislado de secreciones respiratorias de pacientes con FQ, donde se ha adaptado al ambiente pulmonar de dichos pacientes y a la terapia extensa con antibióticos, seleccionando cepas eficientes en la colonización pulmonar, formación de biopelículas y *MDR*, a tal grado que las cepas aisladas de estos pacientes presentan una *MDR* mayor comparada a las de cepas aisladas de pacientes con otras patologías. En años recientes la frecuencia de cepas *MDR* se ha incrementado en los pacientes con FQ, ocasionado que los regímenes de antibióticos estén comenzando a ser inefectivos, acentuando la necesidad de establecer nuevas bases de estrategias diagnósticas y terapéuticas que evadan los mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa*.

6. Justificación.

El aptámero F23 tiene afinidad y especificidad elevada hacia *P. aeruginosa* y ha demostrado ser funcional bajo modificaciones diversas, como su inmovilización en superficies de *Au*, por lo que podría ser acoplado a *AgNPs* dirigiendo sus propiedades bactericidas y antibiopelículas específicamente contra *P. aeruginosa*, estableciendo las bases para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas y/o diagnósticas contra este patógeno, pero es crucial evaluar su funcionamiento bajo dicha modificación.

7. Pregunta de investigación.

¿Cómo es el reconocimiento de aptámero F23 acoplado con *AgNPs* cuando se expone a cepas clínicas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes pediátricos con FQ?

8. Hipótesis.

El aptámero F23 acoplado a *AgNPs* es capaz de unirse específicamente a cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes pediátricos con FQ atendidos en el SNCT-INP.

9. Objetivo general.

Desarrollar *AgNPs* acopladas al aptámero F23 con interacción específica a cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes pediátricos con FQ atendidos en el SNCT-INP.

○ **Objetivos específicos.**

1. Evaluar el reconocimiento específico del aptámero F23 marcado con *FAM* (*FAM*-F23) hacia cepas de referencia de *P. aeruginosa*.
2. Acoplar el aptámero F23 sobre la superficie de *AgNPs*.
3. Evaluar el reconocimiento específico del aptámero F23 acoplado a *AgNPs* (*F23*~*AgNPs*) hacia cepas de referencia de *P. aeruginosa*.
4. Seleccionar cepas de *P. aeruginosa* aisladas de secreciones respiratorias de pacientes pediátricos con FQ.
 - 4.1. Identificar genótipicamente cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes pediátricos con FQ.
 - 4.2. Realizar la tipificación molecular de las cepas aisladas.
 - 4.3. Determinar el patrón de resistencia a antibióticos.
 - 4.4. Definir la velocidad de síntesis de biopelículas.
5. Evaluar el reconocimiento de *FAM*-F23 hacia cepas de *P. aeruginosa* aisladas de secreciones respiratorias de pacientes pediátricos con FQ
6. Evaluar el reconocimiento de las *F23*~*AgNPs* hacia cepas de *P. aeruginosa* aisladas de secreciones respiratorias de pacientes pediátricos con FQ.

10. Material y métodos.

○ **Población objetivo.**

Cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras de secreciones respiratorias (expectoración, aspirado nasofaríngeo o lavado bronco-alveolar), genética y fenotípicamente heterogéneas, obtenidas de pacientes con FQ atendidos en el SNCT-INP.

▪ **Criterios de inclusión.**

- Cepas bacterianas identificadas bioquímica y molecularmente como *P. aeruginosa*, aisladas de secreciones respiratorias (esputo, aspirado nasofaríngeo [ANS], aspirado bronco-alveolar [ABA], lavado bronco-alveolar [LBA],

secreción bronquial [SB] o expectoración [EXP]) de pacientes pediátricos con FQ atendidos en el SNCT-INP y mantenidas a 4°C en viales de gelosa especial en el cepario del Laboratorio de Bacteriología Experimental del INP (LBE-INP).

- Cepas con características genotípicas y fenotípicas diferentes (genéticamente, pertenecientes a grupos de similitud diferentes, aisladas de pacientes distintos, así como expresión de fenotipos coloniales, categorías de resistencia y establecimiento de biopelículas diversas).

▪ **Criterios de exclusión.**

- Cepas con resultados bioquímicos negativos para *P. aeruginosa*.
- Cepas con resultados moleculares negativos para al menos una prueba de *PCR* especie-específica para *P. aeruginosa*.
- Cepas de *P. aeruginosa* que no puedan ser recuperadas de los viales de gelosa especial.

○ **Tipo de estudio.**

Prospectivo, transversal, descriptivo y experimental.

○ **Cálculo de tamaño de muestra.**

Se utilizaron 30 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes pediátricos atendidos en el SNCT-INP. Este cálculo se basó en las consideraciones de García García J. A. (2013) [114] y estudios similares de aptámeros modificados para la identificación específica de patógenos bacterianos [36, 37, 49, 52, 53].

○ **Descripción operativa del estudio.**

1. Evaluación del reconocimiento específico de FAM-F23 hacia cepas de referencia de *P. aeruginosa*.

Tres cepas de referencia de *P. aeruginosa* (ATCC® 27853™, ATCC® 27855™ y ATCC® 15692™) utilizadas ampliamente como cepas de control de calidad para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y en la investigación de patógenos oportunistas. Tres cepas no-*P. aeruginosa* (*P. alcaligenes*, *Burkholderia cepacia* [*B. cepacia*] y *S. maltophilia*) almacenadas

en el cepario del LBE-INP, fueron inoculadas en caldo de infusión cerebro-corazón (BHI) (BBL, Becton Dickinson, USA) e incubadas a 37 °C por 24 h. El cultivo líquido se estrió en agar MacConkey (AMC) (BBL, Becton Dickinson, USA) e incubó a 37 °C durante 24 h para obtener colonias aisladas.

Colonias únicas de cada cepa fueron picadas e inoculadas en caldo BHI, incubadas a 37 °C durante 14-18 h, para ser recuperadas por centrifugación a 1,301 g (Eppendorf® *Centrifuge* 5417C, USA) durante 5 min en su fase de crecimiento exponencial [21, 37]. Los botones celulares fueron lavados en dos ocasiones con solución salina 0.9% [21, 115], resuspendidos en 1 mL de etanol al 80% por 5 min [37], seguido de un lavado adicional y su resuspensión en 1 mL de solución salina.

Las soluciones bacterianas fueron ajustadas en turbidez a valores de absorbancia equivalentes al 0.5 de la escala de McFarland (Absorbancias de 0.08-0.09 a una densidad óptica de 625 nm [OD_{625}]) [115], en un espectrofotómetro UV-vis (DU 640, Beckman, USA), cuya absorbancia equivale a $\sim 1.5 \cdot 10^8$ UFC·mL⁻¹. Una alícuota de 10 µL de cada cultivo ajustado, fue depositada en dos portaobjetos individuales ($\sim 1.5 \cdot 10^6$ UFC·mL⁻¹), mismos que fueron secados y fijados por calor. Posteriormente, las bacterias fueron bloqueadas con 10 µL de albúmina de suero bovino (BSA, por su acrónimo en inglés) al 0.1% en amortiguador salino de fosfatos (PBS, por su acrónimo en inglés), más 10 µL de solución salina, seguido de una incubación a 37 °C durante una hora [37], tres lavados suaves con 3 mL de agua destilada estéril (H₂O_{DE}) y su secado al aire en condiciones astringentes.

Uno de los portaobjetos fue teñido mediante la técnica de Gram y visualizado a 100X en un microscopio óptico (ZEISS, Germany), mientras el segundo portaobjetos fue tratado con 30 µL de solución 0.05 µM del aptámero F23 [37] marcado con FAM en el extremo 5' (FAM~F23), adquirido de la casa comercial T4 oligo® (ADN Artificial S. de R.L. de C.V., Irapuato, México), el cual fue previamente desnaturalizado (95 °C durante 10 min) y enfriado a 4 °C durante 10 min [37]. Posteriormente, las bacterias con solución de FAM~F23 fueron incubadas a 37 °C durante 30 min, en cámara oscura. Finalmente, y procurando evitar el foto-blanqueo, el portaobjetos se lavó con 3 mL de H₂O_{DE} por quintuplicado, se secó al aire, se montó en un microscopio de fluorescencia (Axio Imager Z1, ZEISS, Germany), y mediante el filtro para FITC se visualizaron los bacilos de *P. aeruginosa* con fluorescencia verde por medio del objetivo 100X, concluyendo con su foto-documentación con el software Laser Optic System (Jenoptik, Germany) y procesamiento con el programa Isis® (Fluorescence Imaging Platform, Meta Systems, USA). Cada cepa fue evaluada por triplicado.

Las imágenes obtenidas fueron evaluadas con el analizador de imágenes Fiji® (<https://fiji.sc/>) [116], para distinguir la capacidad de unión entre *FAM-F23* y cada cepa de referencia de *P. aeruginosa* y las cepas no-*P. aeruginosa*, mediante la medición de la intensidad de fluorescencia. El procesamiento consistió en la duplicación de la imagen original y su conversión a 8-bits, seguido de un auto-threshold “Yen Dark”, ajuste a modo blanco y negro para finalizar con el análisis de partículas con medidas entre 10-1500 píxeles, sustrayendo un valor de 15-20 unidades, concerniente a la fluorescencia de fondo.

El análisis estadístico fue realizado con Microsoft Excel 2019 y JMP® versión 14.0.0 (Instituto SAS, USA). La presentación de los datos es resumida con la media y desviación estándar, mientras que la significancia estadística se estableció en valores de $p < 0.5$. Los datos obtenidos exhibieron tendencia a la normalidad y ausencia de homogeneidad de varianza, por lo que la comparación múltiple de la media de la intensidad de fluorescencia detectada en las cepas y en su agrupación por especie, fue evaluada mediante el análisis de varianzas (ANOVA) con corrección de Welch (*Welch*-ANOVA), seguido de las pruebas *post-hoc* Tukey-Kramer para las comparaciones par a par entre cada cepa de referencia, así como la prueba de Dunnett para los contrastes contra cepas en particular y el conjunto de cepas no-*P. aeruginosa*.

2. Acoplamiento entre el aptámero F23 a *AgNPs*.

El aptámero F23 tiolado (Thiol C2) en el extremo 3' (T4 oligo®; ADN Artificial S. de R.L. de C.V., Irapuato, México) (F23-Tiol) fue utilizado para su conjugación con *AgNPs*, en conjunto con dos controles negativos, uno de ellos utilizó únicamente H_2O_{LN} (Control 1) y el otro (Control 2) se basó en un iniciador no-tiolado (Primer OPY-2, descrito en el apartado metodológico 4.2). El acoplamiento comenzó con 10 μ L de H_2O_{LN} , iniciador no-tiolado o F23-Tiol, mezclados con 5 μ L de buffer de acetatos 500 mM a pH 5.2 (0.47 M de acetato de sodio, 0.03 M de ácido acético) [117] en microtubos de 1.5 mL, seguido de un tratamiento con 10 μ L de tris-(2-carboxietil)-fosfina (*TCEP*) (Sigma-Aldrich®, USA) 10 mM [117] y su posterior incubación a 70 °C durante 3 min, proseguido por una incubación adicional a 37 °C durante 1 h [29], con la finalidad de reducir los enlaces disulfuro del grupo tiol de F23-Tiol.

Alícuotas de 3 mL de *AgNPs* esféricas ≤ 10 nm (Sigma-Aldrich®, USA) fueron depositadas en tubos cónicos de 15 mL y atemperados durante 30 min a 37 °C en ausencia de luz. Los 25 μ L de las soluciones tratadas con *TCEP* (H_2O_{LN} , iniciador no-tiolado y F23-Tiol) fueron depositados en tubos independientes con *AgNPs* ajustadas a 37 °C para ser incubadas bajo agitación constante a 37 °C durante 18-24 h.

Posteriormente, se agregaron 366 μL de *PBS* 1X a cada tubo cónico, se incubaron en agitación constante a 37 °C durante 3 h, seguido de dos adiciones de 63 μL de NaCl 2 M con una incubación de 1 h después de cada adición. Inmediatamente se añadieron 78 μL de NaCl 2 M, seguido de una incubación a 37 °C durante 1 h [118], finalizando una última adición de 156 μL de NaCl 2 M, manteniendo la mezcla bajo las mismas condiciones de incubación durante 18-24 h [117].

Los conjugados del aptámero F23 y *AgNPs* (F23~*AgNPs*) fueron recuperados por centrifugación a 20,817 g durante 35 min, el sedimento resultante se lavó con 300 μL de agua libre de nucleasas ($\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$, Promega®, USA) y se resuspendió en 100 μL de *PBS* 0.1X [118].

La evaluación de la formación de conjugados se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa 1%, cargando en pozos independientes 10 μL de la solución obtenida de los ensayos de acoplamiento ($\text{H}_2\text{O}_{\text{LN}}$, iniciador no-tiolado y F23-Tiol), mezclados con 4 μL de glicerol 10%. Los geles fueron sometidos a 85 V durante 10 min, para identificar cambios en la distancia de migración de F23~*AgNPs* respecto a *AgNPs* en solitario [119]. Adicionalmente, los conjugados fueron analizados por espectrofotometría UV-Vis, para la detección de variaciones tan pequeñas como 4 nm en los picos de absorbancia de F23~*AgNPs* respecto a la de *AgNPs* no-acopladas [118].

3. Evaluación de la especificidad de F23~*AgNPs* hacia cepas de referencia de *P. aeruginosa*.

Colonias únicas de cada cepa de referencia de *P. aeruginosa* y no-*P. aeruginosa* fueron inoculadas por duplicado en caldo BHI e incubadas a 37 °C durante 18-24 h. Los cultivos resultantes fueron centrifugados a 1,301 g durante 10 min [120], lavados con *PBS* 1X en una ocasión y con *PBS* 0.1X en dos ocasiones.

El primer duplicado fue ajustado a una absorbancia de 0.185 ± 0.005 a una $OD_{625\text{nm}}$ con un espectrofotómetro UV-Vis (DU 640, Beckman, USA), en un volumen de 400 μL y concentrado por centrifugación (1,301 g durante 10 min) en microtubos de 1.5 mL a un volumen final de 200 μL de *PBS* 0.1X, con el objetivo de evaluar el reconocimiento de F23~*AgNPs* hacia cepas silvestres.

Por otro lado, el segundo duplicado fue incubado a temperatura ambiente (TA) con 500 μL de etanol 80% durante 5 min, el botón celular fue recuperado por centrifugación (1,301 g durante 10 min) y lavado en dos ocasiones con *PBS* 0.1X. Finalmente las células bacterianas fueron ajustadas como el primer duplicado ($OD_{625\text{nm}}$ 0.185 ± 0.005 en 400 μL) y concentrado en

microtubos de 1.5 mL a un volumen final de 200 μ L de *PBS* 0.1X (1,301 g durante 10 min), con el objetivo de analizar el reconocimiento de F23~*AgNPs* hacia cepas inactivadas.

Un total de 40 μ L de los conjugados F23~*AgNPs* fueron ajustados a valores de absorbancia de 0.5 ± 0.05 a una longitud de onda de 402 nm (OD_{402}). Ese volumen fue desnaturalizado a 95 °C durante 5 min, inmediatamente pasados a hielo durante 5 min e incubados a 37 °C durante 18 h, con los 200 μ L de los cultivos bacterianos ajustados previamente.

Dos mediciones de absorbancias a OD_{402} fueron realizadas empleando microplacas de 96 pozos y un espectrofotómetro UV-Vis (Epoch™, BioTek®, Alemania), empleando tres controles negativos conformados por 100 μ L de *PBS* 0.1X, 100 μ L de *PBS* 0.1X sometido a todo el proceso experimental descrito con etanol 80% y 100 μ L de *PBS* 0.1X sometido a todo el proceso experimental sin etanol.

La primera medición de absorbancia (sobrenadante 1) denotó la cantidad de F23~*AgNPs* incapaz de unirse a la cepa analizada y resultó del análisis espectrofotométrico de 100 μ L del sobrenadante, obtenido de la centrifugación de los complejos bacteria-F23~*AgNPs* a 4,487 g durante 10 min. El sedimento recuperado fue lavado con 200 μ L de *PBS* 0.1X, resuspendido en 200 μ L de *PBS* 0.1X, desnaturalizado a 95 °C durante 10 min e inmediatamente sometido a 1 min de centrifugación a 4,487 g para obtener 100 μ L del sobrenadante (sobrenadante 2), el que indicó la cantidad de F23~*AgNPs* ligada a la bacteria evaluada y conseguida por la desnaturalización de la estructura funcional de F23.

La evaluación estadística se realizó primeramente con Microsoft Excel 2019, proseguido del paquete estadístico JMP® versión 14.0.0. La normalidad de los datos de las absorbancias (OD_{402}) fue evaluada con la prueba de Shapiro-Wilk, mientras que la homogeneidad de varianzas fue analizada mediante la prueba de Levene, continuada por la comparación múltiple de las medias de las absorbancias detectadas con la prueba de *Welch*-ANOVA, seguida de las comparaciones par a par por medio de la prueba de Tukey-Kramer y el contraste contra ciertas cepas o contra el grupo de cepas no-*P. aeruginosa* con la prueba de Dunnett.

4. Selección de cepas de origen clínico de *P. aeruginosa*.

Un total de 30 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes pediátricos con FQ atendidos en el SNCT-INP fueron seleccionadas, las características consideradas para su selección fueron las siguientes: cepas que expresaran durante el primo-aislamiento, morfologías coloniales diferentes (mucoides, no-mucoides), que pertenecieran a grupos de similitud genética distintos (caracterización molecular), que mostraran perfiles diferentes de

resistencia a los antibióticos y que fueran agrupadas en categorías distintas del establecimiento de biopelículas, con el objetivo de evaluar el reconocimiento específico de FAM-F23 y del complejo F23-AgNPs hacia cepas con características genotípicas y fenotípicas diversas.

4.1. Identificación molecular de *P. aeruginosa*.

Las cepas aisladas de pacientes con FQ, identificadas bioquímicamente como *P. aeruginosa* conforme a las recomendaciones de la *American Society for Microbiology* (ASM, por su acrónimo en inglés) [121], fueron sometidas al proceso de extracción de DNA genómico (DNAg) utilizando tiocianato de guanidina (GES) (Sigma-Aldrich®, USA), siguiendo la estrategia metodológica reportada previamente [122–124] con algunas modificaciones.

4.1.1. Extracción de DNAg bacteriano.

Las cepas fueron inoculadas en caldo BHI e incubadas durante 24 h a 37 °C. El cultivo líquido se estrió en AMC y se incubó a las mismas condiciones para obtener colonias aisladas, mismas que fueron picadas, inoculadas en caldo BHI e incubadas nuevamente [122, 123]. La biomasa de *P. aeruginosa* se recuperó por centrifugación [122, 123] y fue resuspendida en amortiguador TE [122, 124–126]. La lisis celular se logró con la adición de GES [122–124] y proteinasa K [126] incubados a 65 °C durante 1 h [126, 127]. Posteriormente se agregó solución de acetato de amonio 7.5 M [122–124, 127], seguido de solución fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma-Aldrich®, USA). La mezcla se agitó vigorosamente, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante resultante, al cual se agregó cloroformo ≥ 99.5 % (Sigma-Aldrich®, USA), se homogeneizó la mezcla y se centrifugó para recuperar el sobrenadante, después se adicionó isopropanol ≥ 99.5 % (Sigma-Aldrich®, USA) para precipitar el DNAg y recuperarlo por centrifugación [122–125, 127]. Finalmente el DNAg se lavó con etanol (BAKER® ACS, USA) y se disolvió en 50 μ L de H₂O_{LN} [122–125, 127].

4.1.2. Evaluación de la pureza e integridad del DNAg extraído.

La pureza y concentración de cada DNAg extraído fue evaluada espectrofotométricamente, considerando como muestras puras aquéllas con valores de absorbancia ≥ 1.8 para la relación de 260/280 nm y valores de absorbancia cercanos a 2.0-2.2 para la relación 260/230 nm, detectados con un espectrofotómetro

(NanoDrop2000, Thermo Fisher Scientific, USA) conforme a las recomendaciones del fabricante. Asimismo, la integridad del material genético bacteriano extraído fue analizada mediante electroforesis en geles de agarosa 0.7% (UltraPure™ Agarose, Invitrogen, USA), teñidos con bromuro de etidio (*BrEth*) (Sigma-Aldrich®) y visualizados en un transiluminador de luz UV (White/Ultraviolet Transilluminator, Ultra-Violet Products), definiendo la integridad del DNAg como bandas de peso molecular elevado, nítidas y sin evidencia de degradación.

4.1.3. PCRs especie-específicos para *P. aeruginosa*.

Dos pares de iniciadores especie-específicos distintos fueron empleados en la identificación molecular de *P. aeruginosa*. El par de iniciadores PA1/PA2 (Applied Biosystems®, USA) flanquean una región del espacio intergénico del gen 16S-23S (16S-23S rDNA ITS) [128], mientras el par de iniciadores PA431C-F/PA431C-R (Applied Biosystems®, USA) amplifican una región del gen del antígeno O de la acetilasa [129].

Tabla 1. Iniciadores especie-específicos para *P. aeruginosa*.

Blanco	Iniciador	Secuencia (5´-3´)	Amplicón (pb)	Condiciones de amplificación	
16S-23S rDNA ITS	PA1	TCCAAACAATCGTCGAAAGC	181	1 ciclo	Desnaturalización inicial: 95 °C/ 5 min
	PA2	CCGAAAATTCGCGCTTGAAC		30 ciclos	Desnaturalización: 94 °C/ 30 s Alineación: 58 °C/ 30 s Extensión: 72 °C/ 1 min
				1 ciclo	Extensión final: 72 °C/ 10 min 4 °C/ ∞
Antígeno O de la acetilasa	PA431C-F	CTGGGTCGAAAGGTGGTTGT TATC	232	1 ciclo	Desnaturalización inicial: 95 °C/ 3 min
	PA431C-R	GCGGCTGGTGCGGCTGAGTC		33 ciclos	Desnaturalización: 95 °C/ 60 s Alineación: 63 °C/ 30 s Extensión: 72 °C/ 60 s
				1 ciclo	Extensión final: 72 °C/ 10 min 4 °C/ ∞

Las reacciones de PCR para 16S-23S rDNA ITS se realizaron en un volumen final de 25 µL; constituidos por 12.5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation®, Madison USA), 0.1 µM de cada iniciador y 20 ng de DNAg. Por otro lado, la composición de la mezcla de reacción para el antígeno O de la acetilasa fue similar, difiriendo únicamente en la concentración de cada iniciador (0.04 µM) [128, 129]. Las condiciones de amplificación están detalladas en la Tabla 1.

Los productos de PCR (*pPCR*) fueron cargados en geles de agarosa 2%, teñidos con bromuro de etidio (*BrEth*) y visualizados con luz UV, considerando como cepas de *P. aeruginosa* aquéllas con resultados positivos para todos los elementos de identificación empleados (pruebas bioquímicas, amplicón para 16S-23S rDNA ITS y amplicón para el antígeno O de la acetilasa).

4.2. **RAPD-PCR de cepas de *P. aeruginosa*.**

Los iniciadores OPY-2 (CATCGCCGCA) [130] (T4 oligo®; ADN Artificial S. de R.L. de C.V., Irapuato, México) y Primer 272 (AGCGGGCCAA) [131–135] (T4 oligo®; ADN Artificial S. de R.L. de C.V., Irapuato, México) se utilizaron para genotipificar las cepas de *P. aeruginosa* por amplificación aleatoria de DNA polimórfico (*RAPD-PCR*).

La mezcla de reacción para OPY-2 [130] se constituyó por 12.5 µL de GoTaq® Green Master Mix, 3 µM de iniciador y 80 ng de DNAg, mientras que la mezcla para Primer 272 [131–135] fue similar, excepto por 1.5 µM de iniciador. Ambas reacciones fueron sometidas a las mismas condiciones de amplificación descritas en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de amplificación para *RAPD-PCR*.

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Referencias
1	Desnaturalización inicial: 96 °C	2 min	[130, 133, 135]
1	Desnaturalización: 95 °C	5 min	
	Alineación: 36 °C	5 min	
	Extensión: 72 °C	5 min	
38	Desnaturalización: 95 °C	30 s	
	Alineación: 36 °C	30 s	
	Extensión: 72 °C	30 s	
1	Extensión final: 72 °C	5 min	
1	4 °C	∞	

4.2.1. **Visualización de productos de *RAPD-PCR* en geles de poliacrilamida, tinción con nitrato de plata y agrupación por coeficientes de similitud.**

Los productos de *RAPD-PCR* (*pRAPD-PCR*) fueron cargados en geles de poliacrilamida desnaturalizante para ácidos nucleicos 10% (Acrilamida:Bisacrilamida 19:1), preparados con amortiguador de tris base, ácido bórico y EDTA (TBE) 1X, adicionado con urea 6 M (Promega®, USA) como agente desnaturalizante (*Urea PAGE*, por su acrónimo en inglés) [136] y corridos a 150 V durante 2:45 h.

Los geles fueron teñidos con nitrato de plata (AgNO₃) siguiendo las recomendaciones de Bassam B. y cols. (2007) [137], con el objetivo de incrementar la

visualización de los patrones de bandeo y obtener un poder discriminatorio mayor. El peso molecular de cada amplicón fue calculado de acuerdo a los criterios de Hames [138] y la combinación de las huellas genéticas de cada cepa, obtenidas con ambos iniciadores, fueron usados para construir una base de datos basada en la presencia/ausencia de amplicones, misma que fue analizada con el programa bioinformático PAST versión 3.12 (Hammer., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. 2001), mediante el método de agrupación basado en el coeficiente de similitud de Jaccard, bajo el método de grupos de pares no ponderados con media aritmética [131, 133, 139], para determinar la distancia genética entre cada cepa y considerando como la misma cepa a aquellas con un porcentaje de similitud $\geq 80\%$ [133].

4.3. Determinación de la resistencia a los antibióticos.

Caldos de cultivo de colonias únicas de cada cepa clínica de *P. aeruginosa*, fueron ajustados a valores de absorbancia de 0.08-0.09 (OD_{625}), equivalentes al 0.5 de la escala de McFarland y fueron utilizados para evaluar la susceptibilidad a 14 antibióticos sugeridos por el CLSI [140]: Piperacilina (PIP), Ceftazidime (CAZ), Cefepime (FEP), Aztreonam (AZM), Imipenem (IPM), Meropenem (MEM), Amikacina (AN), Gentamicina (CN), Netilmicina (NET), Levofloxacina (LVX), Ciprofloxacina (CIP), Ofloxacina (OFX), Colistina (CL) y Polimixina B (PB). Aunado a cuatro antibióticos adicionales: Carbenicilina (CRB), Cefotaxime (CTX), Ceftriaxona (CRO) y Norfloxacina (NOR). Los antibióticos pertenecieron a cinco familias de antibióticos: Penicilinas (PEN), Cefalosporinas (CEF), Monobactámicos (MON), Carbapenémicos (CARB), Aminoglucósidos (AMG), Fluoroquinolonas (FLQ) y Polimixinas (POL).

Los antibiogramas fueron obtenidos por el método de difusión en agar (método de Kirby-Bauer), conforme a las recomendaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios de los USA (CLSI) [141], procediendo de cultivos ajustados que fueron inoculados masivamente con hisopo en placas de agar-Muller Hinton (MHA, BBL, Becton Dickinson, USA), colocando un máximo de seis sensi-discos de antibiótico por placa e incubados a 37 °C durante 18-24 h [141]. La medición de los halos de inhibición de los antibióticos se realizó considerando los valores de corte actualizados y reportados en la edición 29 del documento M-100 del CLSI [140].

Los perfiles de resistencia a los antibióticos fueron utilizados para categorizar a las cepas como: pan-susceptibles (*PanS*) o susceptibles a todos los antibióticos recomendados por el CLSI para *P. aeruginosa* [140]; no-susceptibles a al menos un agente de un grupo de

antibióticos (*DR1*); no-susceptibles a al menos un agente de dos grupos de antibióticos (*DR2*); no-susceptibles a al menos un agente de tres o más grupos de antibióticos *MDR* y extensamente resistentes a los antibióticos (*XDR*), como aquellas no-susceptibles a al menos un agente de todos los grupos establecidos para *P. aeruginosa* menos dos grupos [92, 142–144].

4.4. Evaluación del establecimiento de biopelículas.

Un mL de diluciones 1:5 de caldos de cultivo de colonias únicas de cada cepa fueron ajustados con solución salina estéril a valores de absorbancia de 0.07-0.08 (OD_{625}) y utilizadas para inocular pozos individuales de microplacas de 96 pozos, con 5 μ L de dilución ($150,000 \text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$), aforados a un volumen final de 200 μ L con caldo mínimo M63 1X fresco (15g de KH_2PO_4 , 35g de K_2HPO_4 and 10g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 1 L de agua destilada; equivalente a un *stock* M63 5X), suplementado con MgSO_4 y arginina [145], e incubados a 37 °C durante 24, 48 y 72 h. Cada cepa fue analizada por tetraplicado, a la vez que cada prueba fue evaluada por tres ensayos independientes.

Al concluir el tiempo de incubación (24, 48 o 72 h), el cultivo fue decantado y lavado por sumergimiento en dos ocasiones, las microplacas se secaron durante 20 min a 37 °C y en cada pozo se depositaron 230 μ L de cristal violeta (CV) 0.1%, seguido de su incubación durante 15 min a 37 °C. Posteriormente, el colorante fue decantado y la microplaca fue lavada por sumergimiento en tres ocasiones, se secó durante 20 min a 37 °C y se añadieron 230 μ L de ácido acético 30% a cada pozo continuando con la incubación de la microplaca a 37 °C durante 15 min. Finalmente, 200 μ L de la solución de cada pozo fueron transferidos a los pozos de una microplaca nueva y analizados en un lector de Elisa (EL800, BioTek instruments, USA) a una longitud de onda de 540 nm (OD_{540}).

Los datos de las absorbancias exhibidos por cada cepa clínica de *P. aeruginosa* en los tres tiempos evaluados, fueron analizados con Microsoft Excel 2019 y JMP® versión 14.0. Los contrastes entre el establecimiento de biopelículas de las cepas clínicas y su fenotipo colonial, categoría de resistencia, tipo de secreción respiratoria del que fue aislada, agrupación de *RAPD*, hospedero y tratamiento sometido al paciente durante la toma de su muestra clínica, fueron realizados con pruebas no-paramétricas debido a la falta de normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas. La prueba de Kruskal-Wallis fue utilizada para el análisis múltiple de las medianas de las cepas, seguido de las pruebas *post-hoc* U Mann-Whitney para las comparaciones par a par, mientras que el *test* de Dunn

fue empleado para el contraste con cepas en específico o con las cepas de referencia de *P. aeruginosa*.

Adicionalmente, se creó una tabla dinámica de agrupación en Microsoft Excel 2019, basada en la media de los valores de OD_{540} detectados en cada cepa y que representaron su establecimiento de biopelículas. Con el objetivo de aumentar las variables de selección que permitieran distinguir la mayor heterogeneidad fenotípica posible en las cepas analizadas, cuatro categorías fueron establecidas (I, II, III y IV) de acuerdo a la cantidad de biopelícula formada por cada cepa a los tres tiempos evaluados, siendo las cepas integradas en la categoría I las que formaron menos biopelícula, mientras que las cepas pertenecientes a la categoría IV, fueron las que exhibieron las absorbancias mayores.

5. Evaluación del reconocimiento de FAM~F23 a cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con FQ.

Las condiciones descritas en el apartado metodológico 1 fueron replicadas con las 30 cepas de *P. aeruginosa* seleccionadas (Tabla 13). El análisis múltiple de la media de la intensidad de fluorescencia exhibida por las cepas clínicas de *P. aeruginosa*, cepas de referencia de *P. aeruginosa* y cepas no-*P. aeruginosa*, fue similar al detallado en el apartado metodológico 1, sustentado con la prueba de *Welch*-ANOVA para las comparaciones múltiples, seguido de la comparación par a par con la prueba de Tukey-Kramer, así como la prueba de Dunnett para la comparación contra ciertas cepas o contra el conjunto de cepas no-*P. aeruginosa*. Estos análisis fueron realizados con el paquete estadístico JMP® versión 14.0.0.

6. Evaluación del reconocimiento de F23~AgNPs contra cepas aisladas de pacientes con FQ.

El protocolo de interacción basado en etanol (descrito en el apartado metodológico 3), fue utilizado para evaluar el reconocimiento del conjugado F23~AgNPs hacia las 30 cepas clínicas de *P. aeruginosa*. La identificación de diferencias significativas se realizó con el paquete estadístico JMP® versión 14.0.0, empleando la prueba de *Welch*-ANOVA para la comparación múltiple de la media de OD_{402} detectadas en ambos sobrenadantes (sobrenadante 1 y sobrenadante 2).

Subrayando que las absorbancias detectadas en el sobrenadante 1 expresaron la cantidad de F23~AgNPs incapaz de unirse a las cepas examinadas, esperando absorbancias pequeñas en los ensayos conformados por cepas de *P. aeruginosa*, y valores grandes de absorbancias en los análisis espectrofotométricos del sobrenadante 2, que representó la

cantidad de F23-*AgNPs* ligada a la bacteria evaluada y conseguida por desnaturalización de la estructura funcional de F23.

La estadística fue proseguida con la prueba de Tukey-Kramer para las comparaciones par a par entre cada cepa, mientras que la prueba de Dunnett fue utilizada para los contrastes con ciertas cepas o con el grupo control de cepas no-*P. aeruginosa*.

11. Resultados.

1. Reconocimiento de cepas de referencia de *P. aeruginosa* con FAM-F23.

La morfología y tamaño bacilar visualizado por tinción de Gram y microscopía óptica, fue similar para las cepas ATCC® 27853™, ATCC® 15692™, *B. cepacia* y *S. maltophilia* observándose bacilos Gram negativos en todos los casos. En contraste, la cepa ATCC® 27853™ fue identificada como coco-bacilos, mientras que *P. alcaligenes* se distinguió como bacilos largos. La densidad bacteriana visualizada por campo fue similar en cinco de las cepas estudiadas (145.27 ± 33.29), excepto para *P. alcaligenes* (31.33 ± 6.11) (Figura 1).

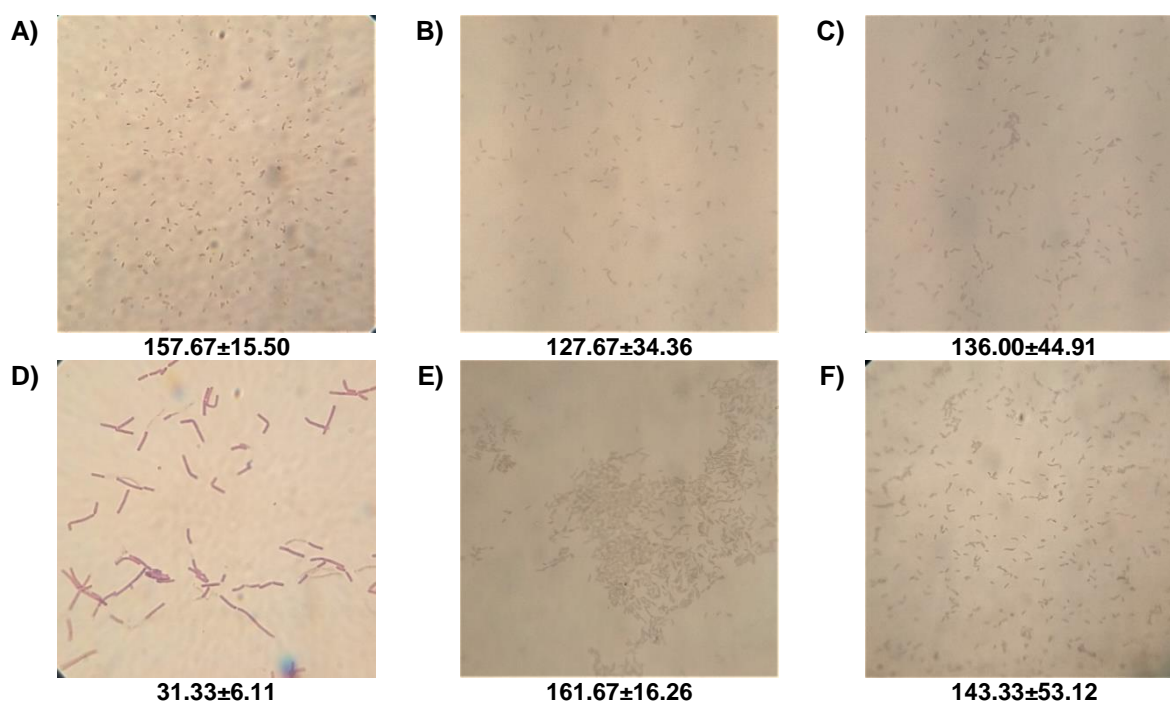


Figura 1. Tinción de Gram de cepas control.

Micrografías a 100X de bacilos Gram negativos y determinación de células bacterianas contabilizadas por campo, correspondientes a A) ATCC® 27853™, B) ATCC® 27855™, C) ATCC® 15692™, D) *P. alcaligenes*, E) *B. cepacia* y F) *S. maltophilia*.

La fluorescencia verde exhibida por FAM-F23, fue visualizada por microscopía de fluorescencia en las seis cepas analizadas, distinguiendo fluorescencias más intensas en las cepas de *P. aeruginosa* y su disminución gradual en *P. alcaligenes*, *B. cepacia*, hasta *S. maltophilia* (Figura 2).

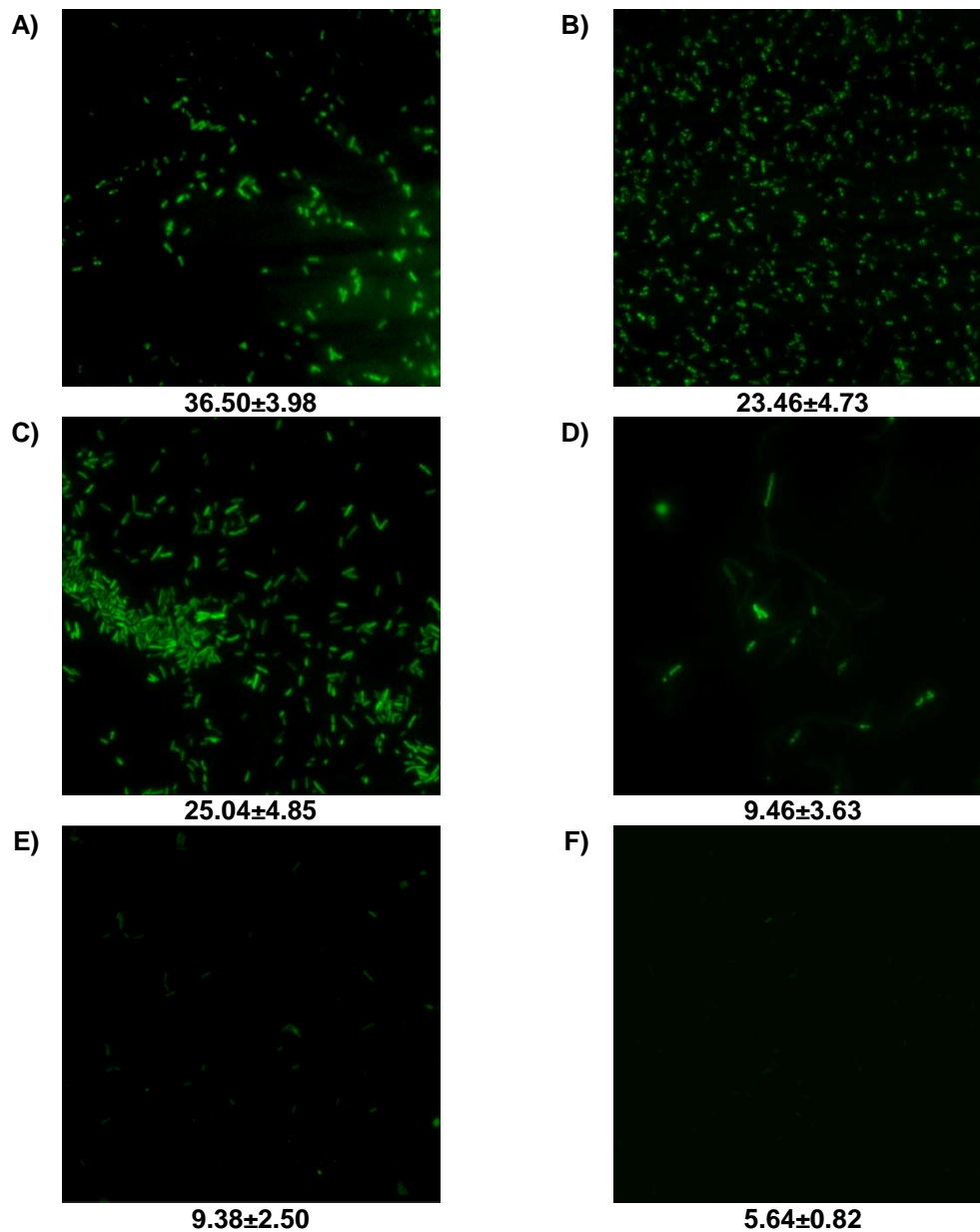


Figura 2. Microscopía de fluorescencia de cepas control.

Micrografías de fluorescencia que muestran la morfología celular de las cepas de referencia de *P. aeruginosa* A) ATCC® 27853™, B) ATCC® 27855™ y C) ATCC® 15692™, mediante la identificación por FAM-F23, así como la detección de fluorescencias bajas en el grupo de cepas no-*P. aeruginosa*: D) *P. alcaligenes*, E) *B. cepacia* y F) *S. maltophilia*. Las micrografías integran la media y desviación estándar de la intensidad de fluorescencia detectada en cada cepa.

La cepa de *P. aeruginosa* ATCC® 27853™ mostró la mayor intensidad de fluorescencia entre el grupo de cepas de referencia de su especie (Dunnett $p < 0.0001$), mientras que *S. maltophilia* fue la que exhibió menor fluorescencia entre todas las cepas control utilizadas (Dunnett $p < 0.0001$) (Figura 3-A). La agrupación de los datos por especie (*P. aeruginosa* y no-

P. aeruginosa) demostró intensidades de fluorescencia significativamente mayores (Tukey-Kramer $p < 0.0001$) para *P. aeruginosa*, en contraste a la detectada en cepas no-*P. aeruginosa* (Figura 3-B), correspondiendo al 28.79% de la fluorescencia identificada en la especie objetivo.

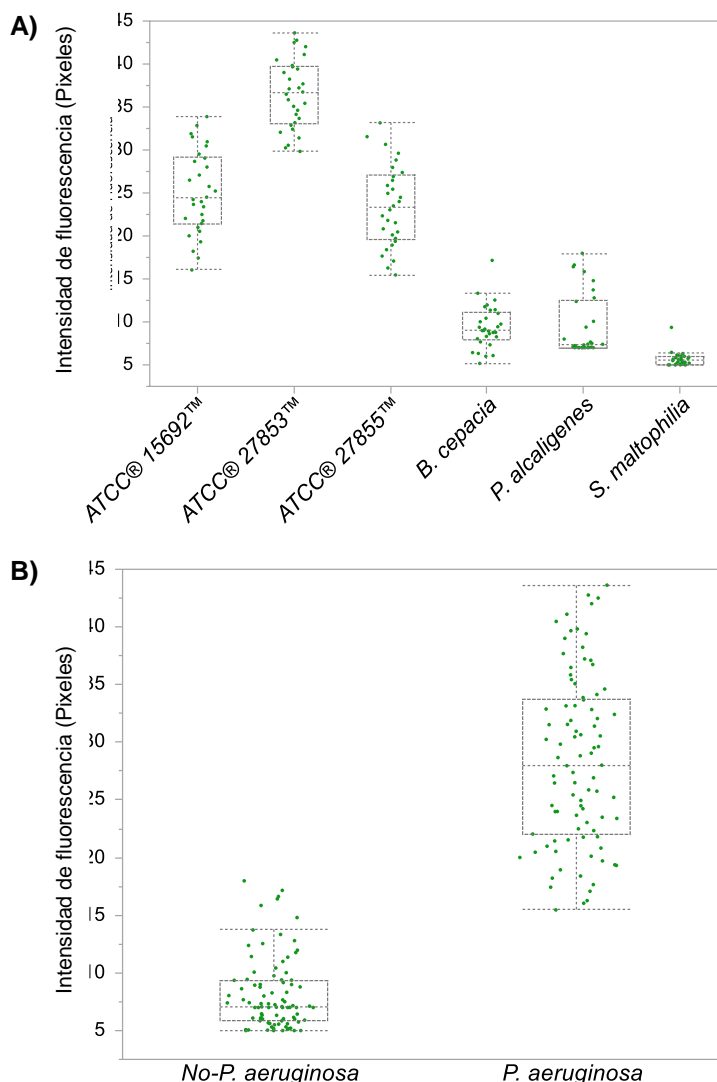


Figura 3. Intensidad de fluorescencia de cepas control.

Diagramas de caja de la intensidad de fluorescencia (Eje de las ordenadas) que muestran la media de los valores detectados en A) cada cepa control y B) su agrupación especie (Valores de fluorescencia de 8.16 ± 3.12 para el grupo no-*P. aeruginosa* y 28.34 ± 7.37 para el conjunto de cepas de referencia de *P. aeruginosa*), combinado con diagrama de puntos que exhibe la distribución de fluorescencias.

2. Obtención de las F23~AgNPs.

El método de acoplamiento exhibió soluciones incoloras en cada una de las variantes señaladas como controles. En cuanto al control 1 (ensayo en ausencia de ácidos nucleicos),

la solución no adquirió coloración amarilla a pesar de la adición de *AgNPs*, mientras que el control 2 (ensayo con iniciador no-tiolado), adquirió tonalidad amarillenta al agregar *AgNPs*, aunque después de su incubación a 37 °C durante 18-24 h, la solución se tornó incolora. En contraste, la solución basada en F23-Tiol mostró color amarillo inmediatamente a la adición de *AgNPs* y solo una disminución sutil de la coloración después del proceso de incubación (Figura 4).

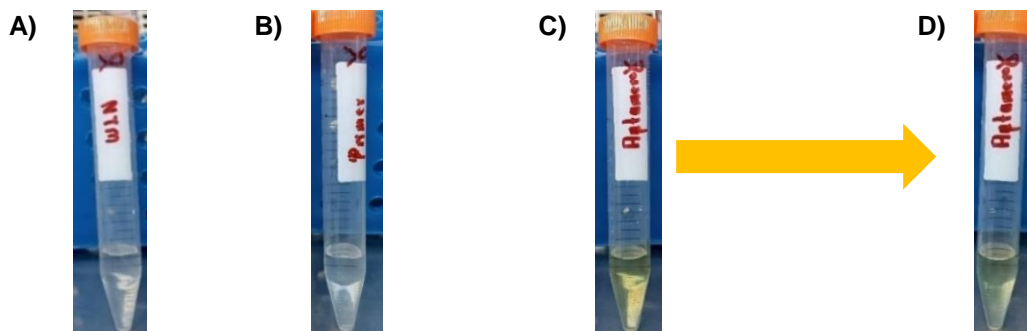


Figura 4. Coloración de las soluciones empleadas en los ensayos de acoplamiento.

Tubos cónicos de 15 mL con A) Solución conformada por H_2O_{LN} y *AgNPs*; B) Iniciador no-tiolado después del periodo de incubación con *AgNPs*; C) F23-Tiol después de la adición de *AgNPs* y D) posterior a su periodo de incubación.

Las soluciones obtenidas de todo el proceso de acoplamiento mostraron soluciones incoloras para ambos controles, mientras que las resultantes de F23-Tiol se distinguieron con un amarillo intenso (Figura 5).

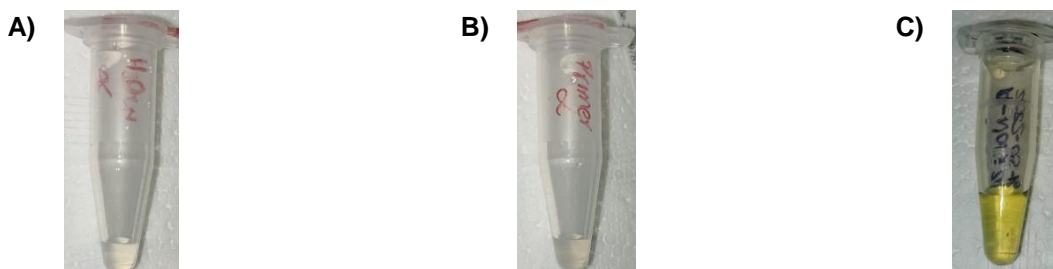


Figura 5. Aspecto visual de las soluciones resultantes del proceso de acoplamiento.

Características visuales de las soluciones recuperadas por centrifugación del método de acoplamiento utilizado, correspondientes al A) ensayo con H_2O_{LN} , B) ensayo con iniciador no-tiolado y C) ensayo con F23-Tiol.

El análisis electroforético exhibió la ausencia de bandas en los pozos correspondientes al ensayo en ausencia de ácidos nucleicos y al ensayo con el iniciador no-tiolado, mientras que la solución resultante de la variante con F23-Tiol evidenció migración contrastante respecto a la ausencia de migración de las *AgNPs* en solitario (Figura 6-A). El escaneo espectrofotométrico confirmó la ausencia de absorbancias características de las *AgNPs* (OD_{396}) en las soluciones obtenidas en ausencia de ácidos nucleicos y con el iniciador no-tiolado, mientras que las conseguidas con F23-Tiol exhibieron el desplazamiento hacia la derecha (OD_{402}) del pico máximo de absorción (Figura 6-B).

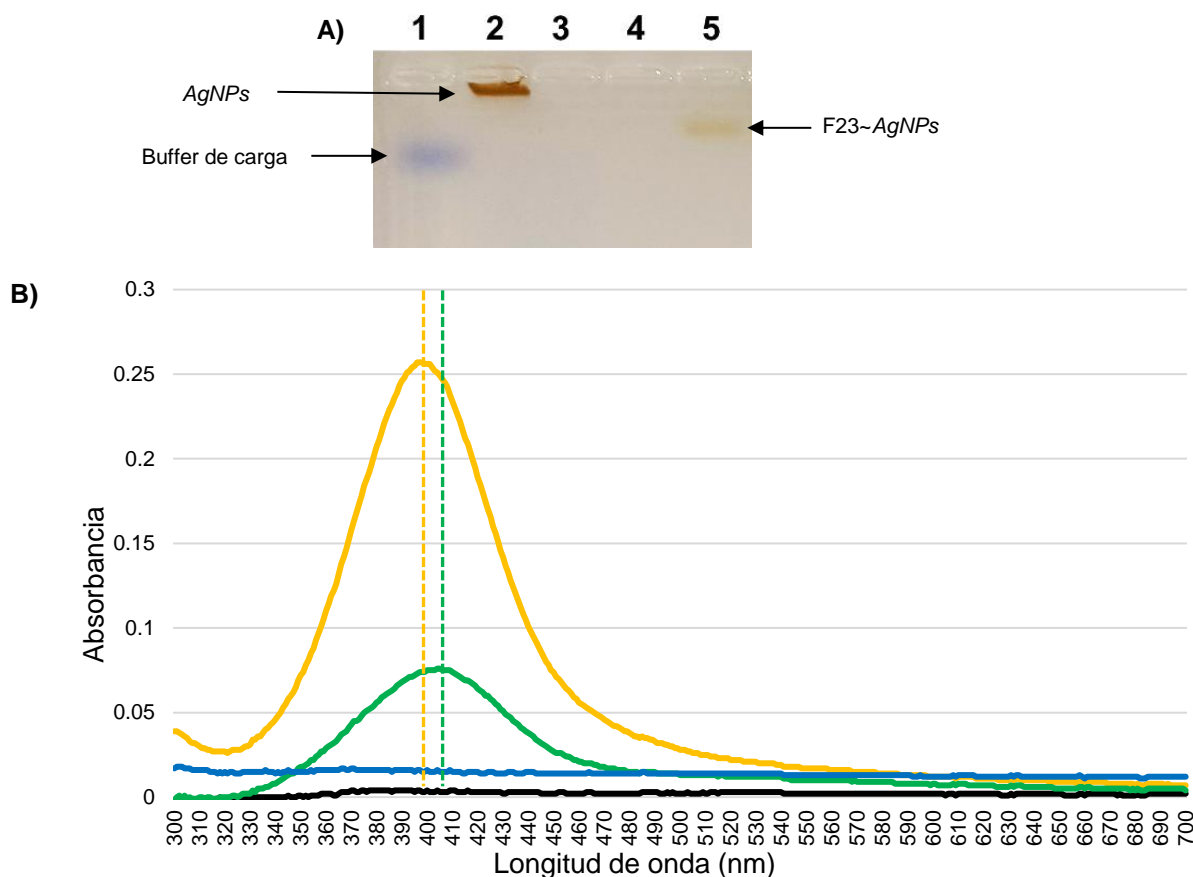


Figura 6. Análisis electroforético y espectrofotométrico de los acoplados F23-*AgNPs*.

A) Gel de agarosa al 1% visualizado en luz visible y cargado con 10 μ L de volumen final de: Pozo 1= Buffer de carga, Pozo 2= *AgNPs*, Pozo 3= acoplamiento basado solo en H_2O_{LN} , Pozo 4= acoplamiento basado en iniciador no-tiolado y Pozo 5= Acoplamiento basado en F23-Tiol. B) Escaneo espectrofotométrico de las *AgNPs* en solitario (Línea amarilla) que exhibe su pico máximo de emisión a una OD_{396} (Línea vertical amarilla), en conjunto con el escaneo de las soluciones resultantes del método de acoplamiento únicamente con H_2O_{LN} (Línea negra) y su variante con iniciador no-tiolado (Línea azul), mientras que el acoplado (F23-*AgNPs*) representado con una línea continua verde, mostró su pico máximo de emisión a una OD_{402} (Línea vertical verde).

Finalmente, la cuantificación de DNA monocatenario presente en las soluciones reafirmó la ausencia de nucleótidos para el método sin ácidos nucleicos y en el método con iniciador no-tiolado, observando concentraciones detectables en el método con F23-Tiol (Figura 7), sugiriendo la formación de complejos F23~AgNPs adecuados para evaluar su interacción con *P. aeruginosa*.

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	H2OLN-AgNPs-A	INP	15/09/2022 09:47:03 a. m.	-0.2	ng/μl	-0.006	0.001	-7.43	-0.04	ssDNA	33.00
3	F23-AgNPs-A	INP	15/09/2022 09:48:55 a. m.	17.7	ng/μl	0.537	0.327	1.64	0.64	ssDNA	33.00
5	Primer-AgNPs-A	INP	15/09/2022 09:51:34 a. m.	0.8	ng/μl	0.023	-0.001	-33.24	0.07	ssDNA	33.00

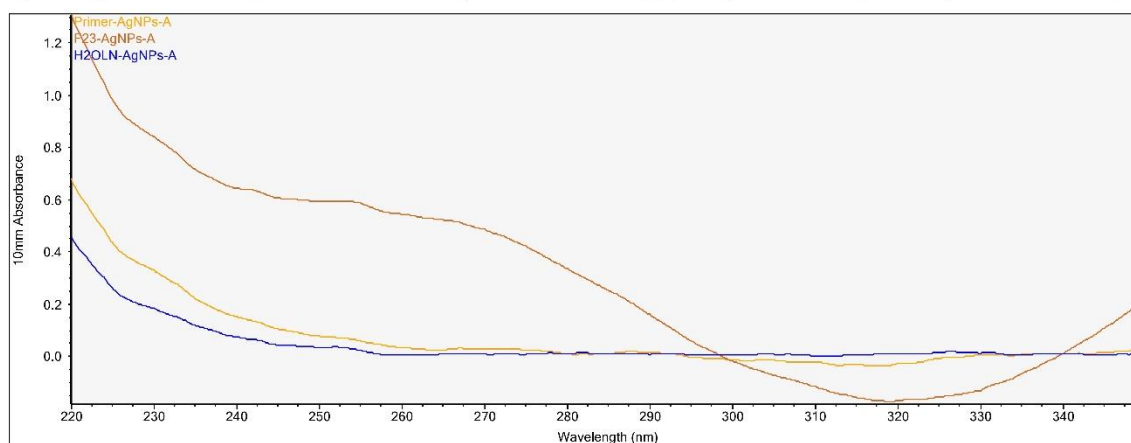


Figura 7. Detección de ácidos nucleicos monocatenarios en AgNPs.

Escaneo espectral a OD de 260 nm y 280 nm, así como su relación 260/280; 260/230, para la cuantificación de ácidos nucleicos en las soluciones correspondientes al método de acoplamiento con H₂O_{LN} (Espectro azul), su variante con el iniciador no-tiolado (Espectro amarillo) y con F23-Tiol (Espectro anaranjado).

3. Reconocimiento de F23~AgNPs hacia cepas de referencia de *P. aeruginosa*.

Dos versiones de un mismo esquema de interacción fueron empleados para evaluar el reconocimiento de F23~AgNPs hacia cepas de referencia de *P. aeruginosa*. El primero se enfocó en identificar la interacción del complejo hacia cepas silvestres (no-inactivadas), mientras que el segundo se dirigió a cepas inactivadas.

Los análisis consistieron en la medición de absorbancias (OD_{402}) provenientes de un primer sobrenadante, que mostró la cantidad de F23~AgNPs incapaz de unirse a una cepa analizada (Sobrenadante 1), aunado a la medición de absorbancias (OD_{402}) correspondientes a un segundo sobrenadante recuperado por desnaturalización térmica de la estructura funcional de F23, indicando la cantidad de F23~AgNPs ligada a la bacteria.

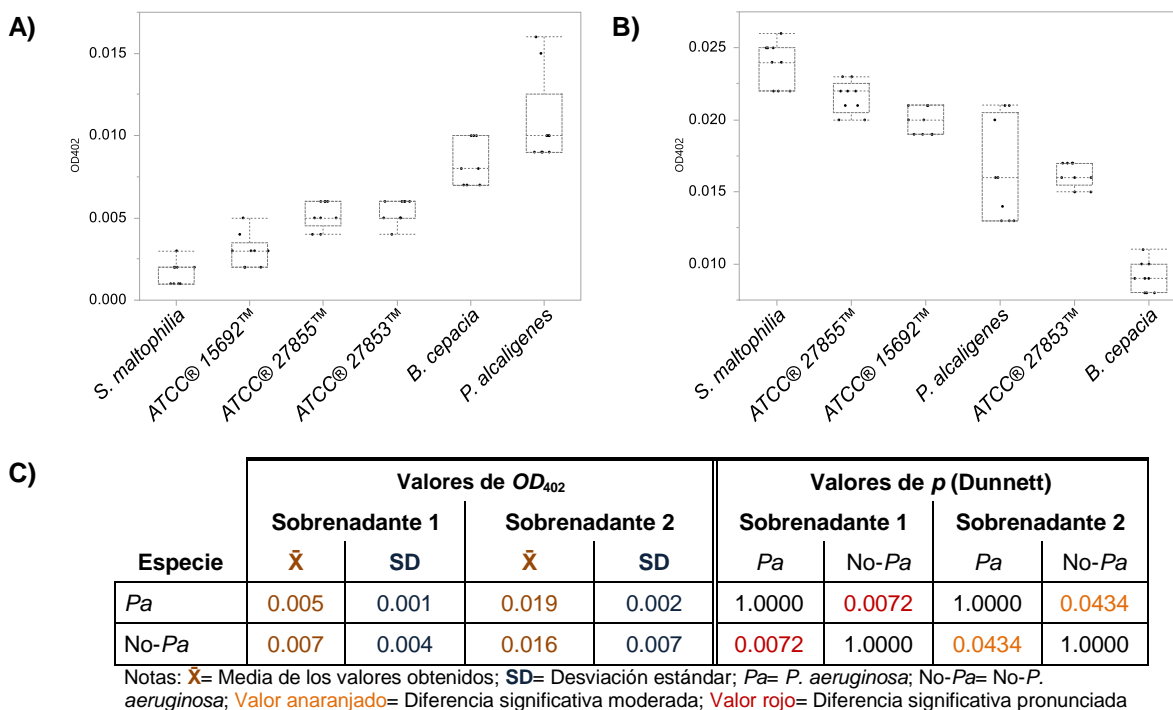


Figura 8. Reconocimiento de F23~AgNPs hacia cepas no-inactivadas.

Gráficos de caja que ilustran la OD_{402} media (Eje de las ordenadas) detectada en cepas control (Eje de las abscisas), correspondientes a la presencia de F23~AgNPs en el A) Sobrenadante 1 y B) Sobrenadante 2. C) Indica la media y desviación estándar de las absorbancias detectadas, aunado a la significancia estadística examinada por especie.

Las cepas no-inactivadas mostraron en el sobrenadante 1 (Figura 8-A), los valores menores de absorbancia en *S. maltophilia* (OD_{402} 0.002±0.001), seguida por las cepas ATCC® 15692™ (OD_{402} 0.003±0.001), ATCC® 27855™ (OD_{402} 0.005±0.001) y ATCC® 27853™ (OD_{402} 0.005±0.001), mientras que las absorbancias más elevadas fueron detectadas en *P. alcaligenes* (OD_{402} 0.011±0.003) y *B. cepacia* (OD_{402} 0.009±0.001), las que mostraron significancia estadística contra ATCC® 27853™ (Tukey-Kramer $p < 0.0001$ y $p = 0.0004$, respectivamente). Confirmando lo anterior, en el sobrenadante 2 (Figura 8-B) se encontraron los valores mayores de absorbancia en *S. maltophilia* (OD_{402} 0.024±0.002), seguida de ATCC® 27855™ (OD_{402} 0.022±0.001) y ATCC® 15692™ (OD_{402} 0.019±0.001), ésta última exhibió significancia estadística (Tukey-Kramer $p = 0.0011$) contra *P. alcaligenes*, que fue una de las cepas con menor absorbancia (OD_{402} 0.016±0.003), entre las cuales *B. cepacia* fue la que mostró la absorbancia (OD_{402} 0.009±0.001) significativamente menor (Dunnett $p < 0.0001$) entre todas las cepas control analizadas.

La agrupación por especie de las absorbancias detectadas en los ensayos de interacción con cepas no-inactivadas (Figura 8-C), demostraron significancias suficientes para discriminar entre cepas de *P. aeruginosa* y cepas no-*P. aeruginosa* filogenéticamente cercanas. Los datos totales de las absorbancias detectadas se encuentran detalladas en el Anexo 1.

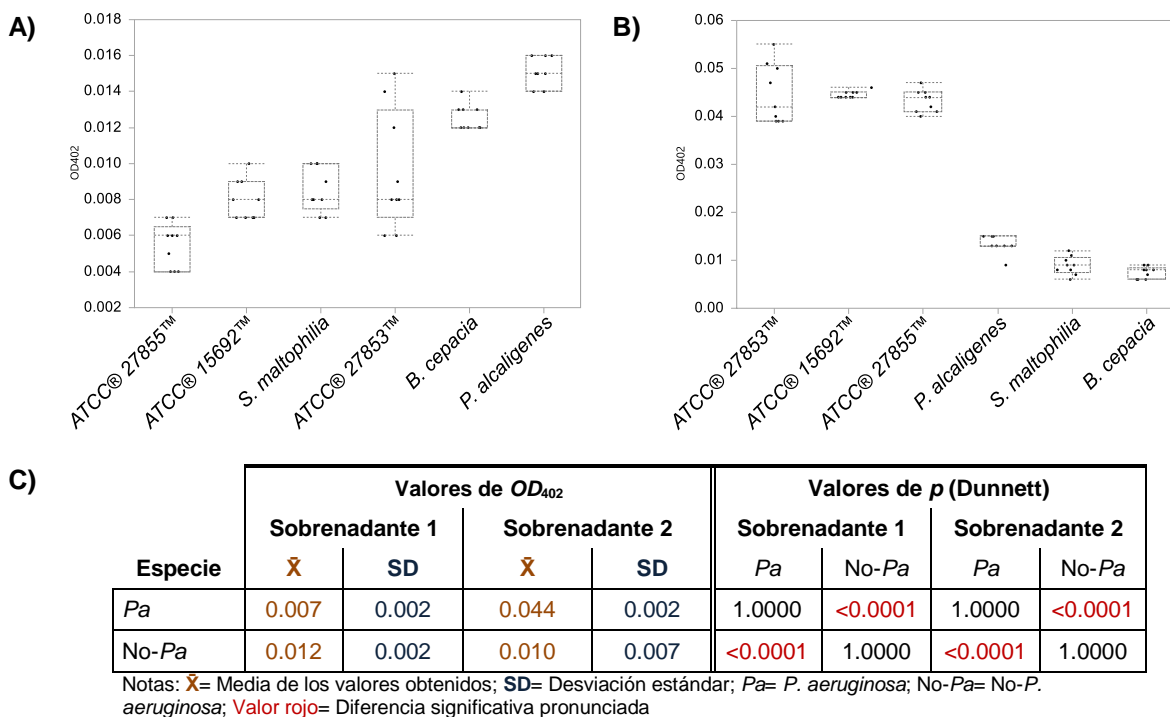


Figura 9. Reconocimiento de F23~AgNPs hacia cepas inactivadas.

Gráficos de caja que ilustran la OD_{402} media (Eje de las ordenadas) detectada en cepas control (Eje de las abscisas), correspondientes a la presencia de F23~AgNPs en el A) Sobrenadante 1 y B) Sobrenadante 2. C) Indica la media y desviación estándar de las absorbancias detectadas, aunado a la significancia estadística examinada por especie.

En cuanto a las absorbancias detectadas en los ensayos de interacción con cepas inactivadas, los valores menores identificados en el sobrenadante 1 (Figura 9-A) correspondieron a ATCC® 27855™ (OD_{402} 0.005±0.001), ATCC® 15692™ (OD_{402} 0.008±0.001), *S. maltophilia* (OD_{402} 0.009±0.001) y ATCC® 27853™ (OD_{402} 0.010±0.003), mientras que *B. cepacia* (OD_{402} 0.013±0.001) y *P. alcaligenes* (OD_{402} 0.015±0.001) fueron las cepas con mayores absorbancias, demostrando diferencias significativas contra ATCC® 27853™ (Tukey-Kramer $p=0.0048$ y $p<0.0001$, respectivamente y $p=0.0004$) y concordando con lo visualizado en el sobrenadante 1 de los ensayos realizados con cepas no-desactivadas. Por último, en el sobrenadante 2 (Figura 9-B) se encontraron diferencias evidentes entre las

cepas con absorbancias más intensas (ATCC® 27853™, OD_{402} 0.045±0.006; ATCC® 15692™, OD_{402} 0.045±0.001 y ATCC® 27855™; OD_{402} 0.043±0.002) y las cepas con absorbancias pequeñas (*P. alcaligenes*, OD_{402} 0.013±0.002; *S. maltophilia*, OD_{402} 0.009±0.002 y *B. cepacia*, OD_{402} 0.007±0.001), exhibiendo diferencias estadísticas (Tukey-Kramer $p < 0.0001$) entre la cepa de *P. aeruginosa* con menor absorbancia detectada (ATCC® 27855™) y la cepa no-*P. aeruginosa* que la mayor absorbancia (*P. alcaligenes*).

La agrupación por especie de las absorbancias detectadas en los ensayos de interacción con cepas inactivadas (Figura 9-C), demostraron medias, desviaciones estándar y significancias pronunciadas que permiten distinguir fácilmente a *P. aeruginosa* entre cepas no-*P. aeruginosa* filogenéticamente cercanas, por lo que esta variante fue seleccionada para evaluar el reconocimiento de F23~AgNPs hacia cepas clínicas de *P. aeruginosa*. Los datos totales de las absorbancias detectadas se encuentran detalladas en el Anexo 1.

4. Selección de cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

Un total de 130 cepas bacterianas fueron aisladas de secreciones respiratorias de 28 pacientes pediátricos con FQ, abarcando un rango de edades entre 7 meses y 17 años. De esas cepas, 95 fueron aisladas de 16 niños mientras que 35 cepas corresponden a 12 niñas. Además, el 56.15% del total de las cepas (73/130) fueron obtenidas de pacientes que se encontraban bajo terapia con antibióticos.

Cada cepa bacteriana fue identificada bioquímicamente mediante los criterios sugeridos por la ASM para *P. aeruginosa*, entre los cuales se distinguió un 57.70 % (75/130) de cepas con fenotipo no-mucoide, mientras que el restante 42.30 % (55/130) exhibió una morfología colonial mucoide visualizada en el primo-aislamiento. El 83.63 % de esas cepas mucoides (46/55) fueron aisladas de pacientes con infecciones recurrentes, donde el 95.65 % de ellas (44/46) correspondieron a pacientes con infecciones crónicas. Las características demográficas de las cepas y de los huéspedes se encuentran descritas en el Anexo 2.

4.1. Identificación molecular de *P. aeruginosa*.

El DNAg extraído de las 136 cepas estudiadas (tres cepas de referencia de *P. aeruginosa*, tres cepas no-*P. aeruginosa* y 130 cepas clínicas) exhibió alto peso molecular, integridad (Figura 10), pureza y concentración adecuada (Anexo 3) para los estudios moleculares posteriores.

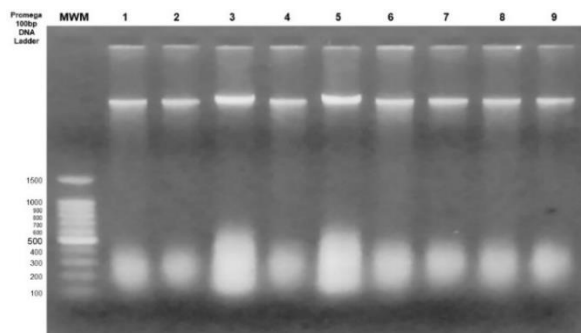


Figura 10. Integridad de DNAg extraído.

Gel de agarosa al 0.7% teñido con BrEth, que muestra bandas de DNAg íntegro de alto peso molecular de las cepas: 1. ATCC® 27853™, 2. ATCC® 27855™ y 3. ATCC® 15692™, 4-6. Cepas clínicas identificadas bioquímicamente como *P. aeruginosa*, 7. *P. alcaligenes*, 8. *B. cepacia* y 9. *S. maltophilia*. Las bandas inferiores corresponden a RNA de cada cepa analizada.

Los iniciadores utilizados para amplificar las regiones 16S-23S rDNA ITS y el antígeno O de la acetilasa (Tabla 1), mostraron amplicones específicos (181pb y 232pb, respectivamente) para las cepas de referencia de *P. aeruginosa* y su ausencia en las cepas no-*P. aeruginosa* utilizadas (Figura 11).

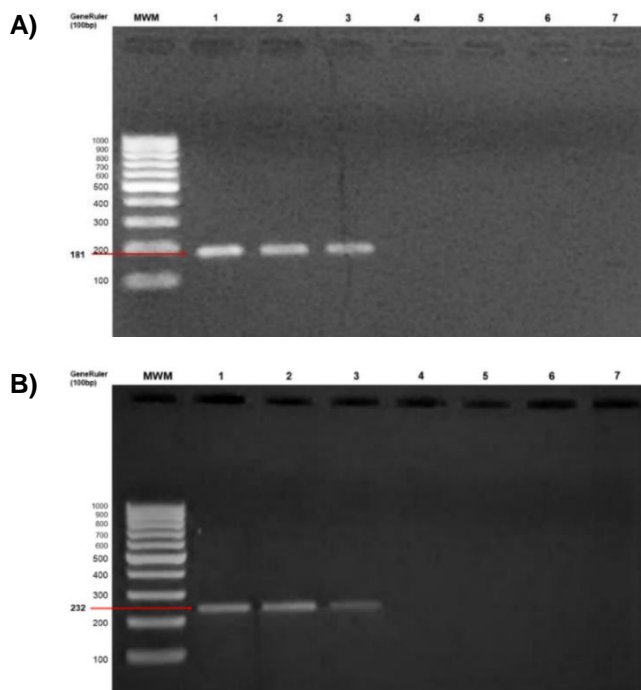


Figura 11. Verificación de pPCR específicos para *P. aeruginosa*.

Geles de agarosa al 0.7% teñidos con BrEth, que exhiben los fragmentos genéticos A) 16S-23S rDNA ITS y B) antígeno O de la acetilasa. Los carriles corresponden a los pPCR de 1. ATCC® 27853™, 2. ATCC® 27855™, 3. ATCC® 15692™, 4. *P. alcaligenes*, 5. *B. cepacia*, 6. *S. maltophilia* y 7. Control sin DNA.

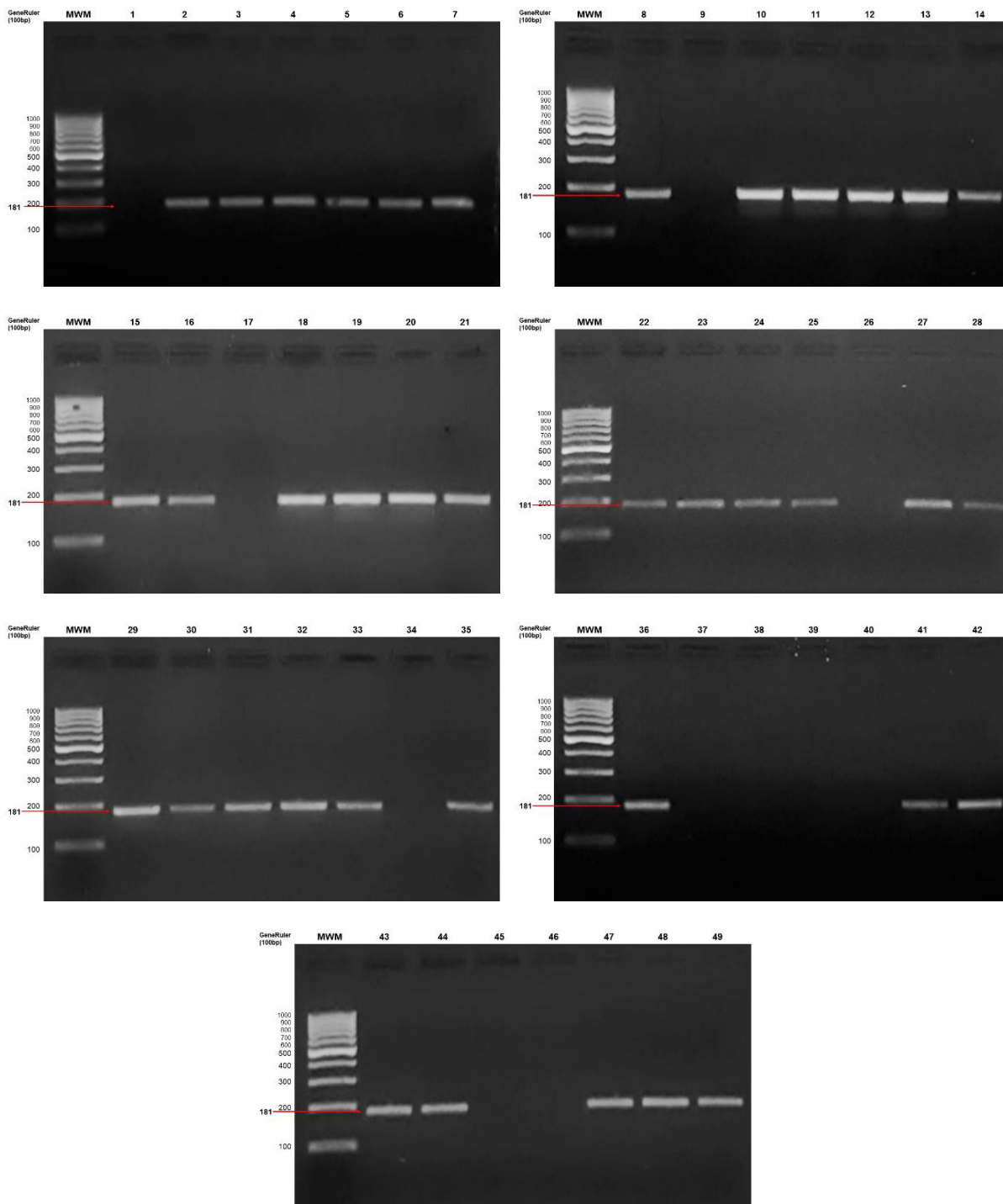


Figura 12. Identificación de cepas clínicas no-*P. aeruginosa* mediante 16S-23S rDNA ITS

Geles de agarosa al 2% teñidos con BrEth donde se distinguen carriles con ausencia de amplicón en las cepas clínicas: 1. Pa33rb, 9. Pa58rb, 17. Pa73r, 26. Pa98ra, 34. Pa102rc, 37. Pa106ra, 38. Pa106rb, 39. Pa106rc, 40. Pa107r, 45. Pa114ra y 46. Pa114rb.

Un total de 12 cepas de origen clínico fueron excluidas del estudio por presentar resultados negativos para al menos un iniciador especie-específico utilizado. En detalle, el análisis de la región 16S-23S rDNA ITS mostró resultados negativos para 11 cepas clínicas (Figura 12), mientras que 10 cepas fueron negativas para la región del antígeno O de la acetilasa (Figura 13).

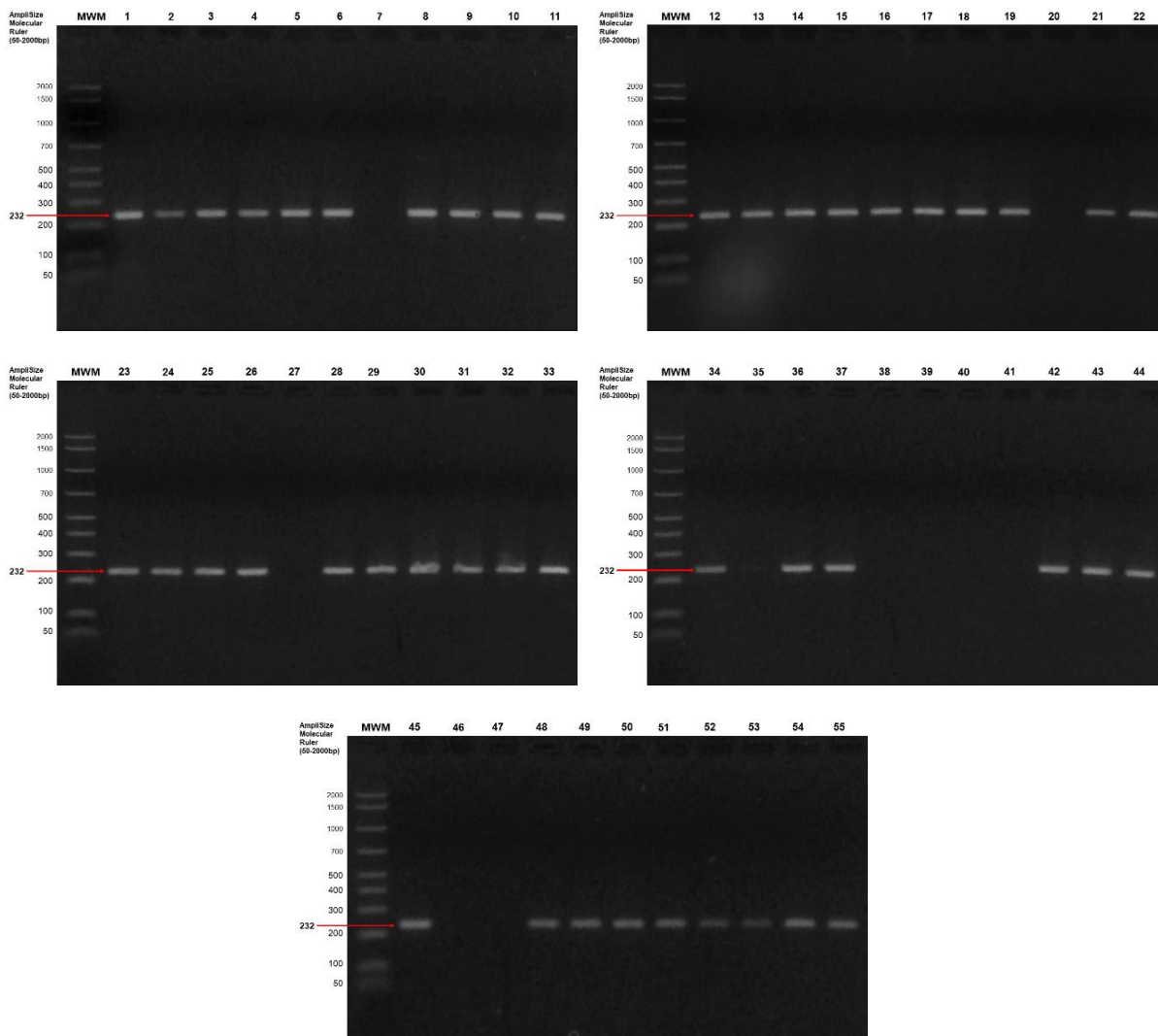


Figura 13. Detección de cepas clínicas no-*P. aeruginosa* mediante el antígeno O de la acetilasa.

Geles de agarosa al 2% teñidos con BrEth que exhiben carriles con ausencia del fragmento genético analizado, para las cepas 7. Pa58rb, 20. Pa82ma, 27. Pa98ra, 35. Pa102rc, 38. Pa106ra, 39. Pa106rb, 40. Pa106rc, 41. Pa107r, 46. Pa114ra y 47. Pa114rb.

Nueve de las cepas descartadas exhibieron resultados negativos para ambas regiones genéticas. Un total de 118 cepas aisladas de 25 pacientes pediátricos con FQ fueron confirmadas como *P. aeruginosa* (Anexo 4).

4.2. Genotipificación de cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

Los *pRAPD-PCR* de OPY-2 y Primer 272 fueron analizados preliminarmente en geles de agarosa al 1% teñidos con BrEth, identificando patrones de bandeo en cepas de referencia de *P. aeruginosa*, mientras no se encontró ningún amplicón en el pozo correspondiente al control sin DNA (Figura 14).

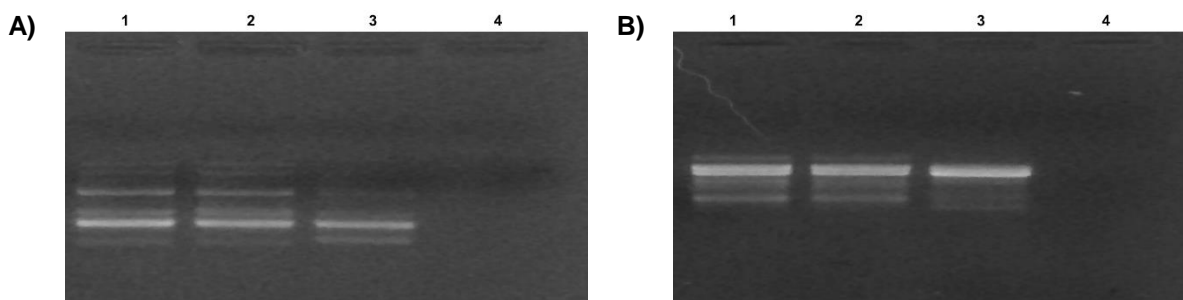


Figura 14. Previsualización de *pRAPD-PCR* en geles de agarosa.

Patrones de bandeo correspondientes a huellas genéticas de las cepas 1. ATCC® 27853™, 2. ATCC® 27855™ y 3. ATCC® 15692™, obtenidas con los iniciadores A) OPY-2 y B) Primer 272. El pozo 4 corresponde al *pRAPD-PCR* control (ensayo sin DNA).

El análisis por *Urea PAGE* de los 236 *pRAPD-PCR* (118 de OPY-2 y 118 de Primer 272) de las 118 cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico (Figura 15), permitieron la visualización de hasta 21 amplicones de pesos moleculares distintos en las cepas clínicas, obtenidos con el iniciador OPY-2 y hasta 93 fragmentos con el Primer 272.

Las huellas genéticas obtenidas de la combinación de los fragmentos de ambos iniciadores, resultaron en perfiles constituidos por 26-74 amplicones y sus pesos moleculares abarcan desde 100 hasta 1390 pb. El análisis de las huellas genéticas realizado mediante el coeficiente de similitud de Jaccard permitió construir un dendrograma que distribuyó a las cepas clínicas en 84 perfiles de *RAPD* y 46 agrupaciones con similitudes $\geq 80\%$ (*RAPD* 1-46) (Figura 16). Detalladamente, 24 grupos de *RAPD* se constituyeron por una sola cepa y el 97.45% de las cepas estudiadas (115/118) se distribuyeron en agrupaciones únicas y específicas para cada hospedero. Esto permitió la identificación de una infección cruzada entre dos pacientes hermanos (Figura 17), cuya cepa inicial (Pa33ra)

aislada el 6 de mayo de 2016 de uno de los pacientes (454078; Px21), mostró una similitud >90% con la cepa Pa78r, aislada el 9 de febrero de 2017 del otro paciente (455826; Px25) y con la cepa Pa119r, aislada nuevamente de Px21 el 3 de septiembre de 2018.

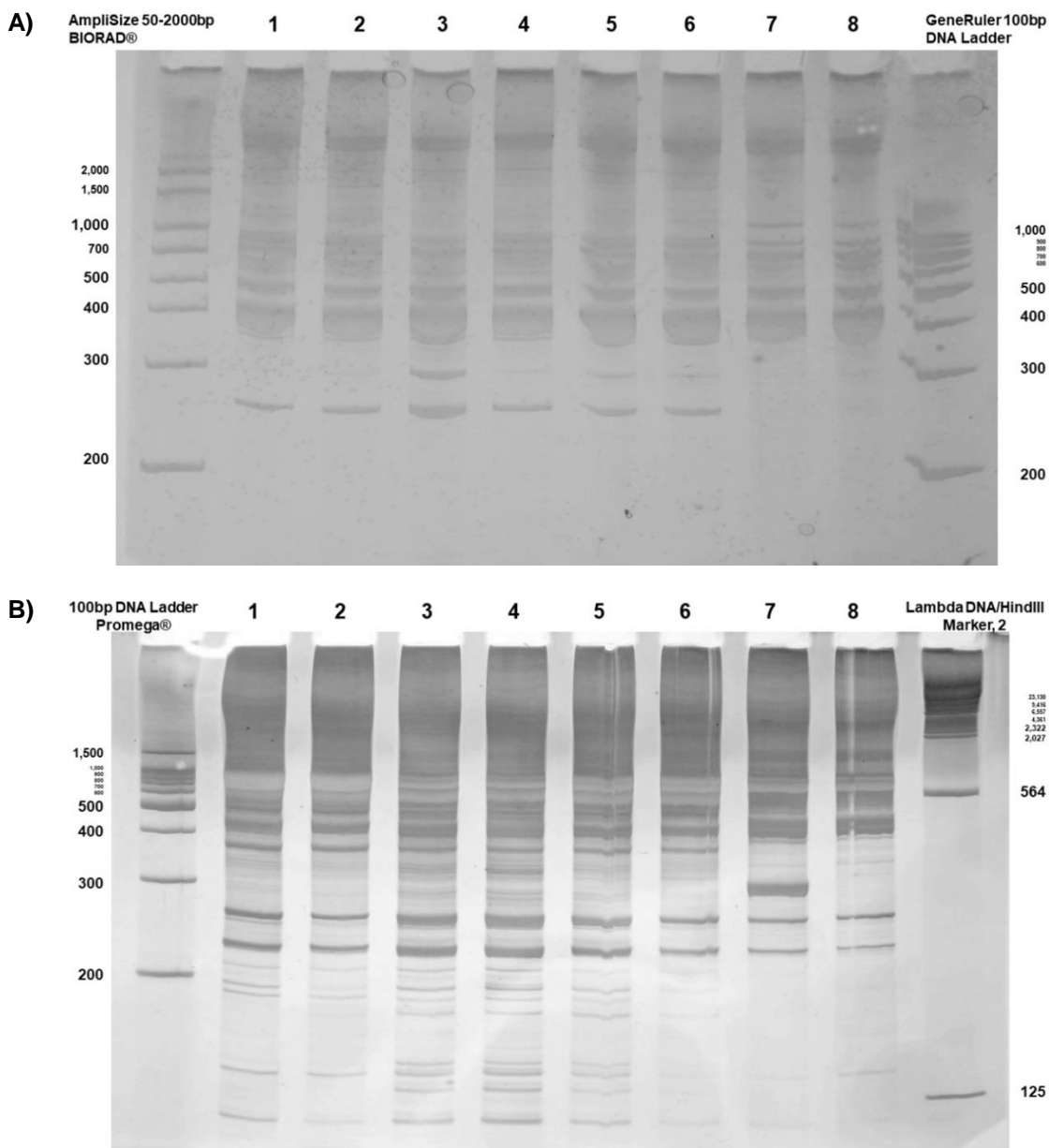


Figura 15. Huellas genéticas de cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

pRAPD-PCR visualizados en gels de *Urea PAGE* al 10% teñidos con AgNO_3 , que muestran perfiles de amplificación de distintas cepas clínicas (carriles 1-8), obtenidas con los iniciadores A) OPY-2 y B) Primer 272. El primer y último carril de cada gel corresponden a dos marcadores de peso molecular diferentes.

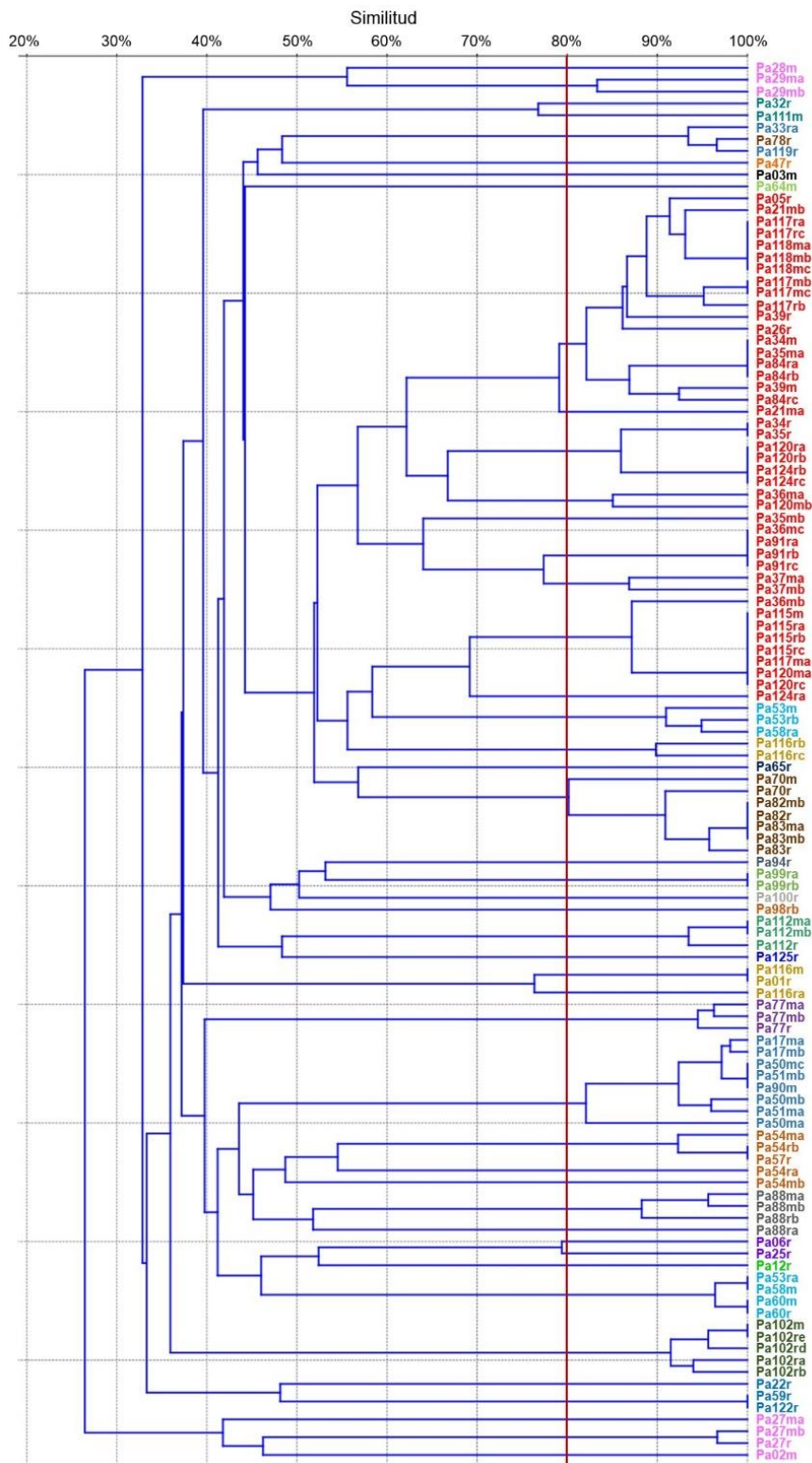


Figura 16. Dendrograma de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con FQ.

Cepas clínicas de *P. aeruginosa* agrupadas por el coeficiente de similitud de Jaccard. Los valores 0.3 a 1.0 representan similitudes de 30 a 100 %, respectivamente. Cada color en el nombre de cada cepa expresa un paciente diferente.

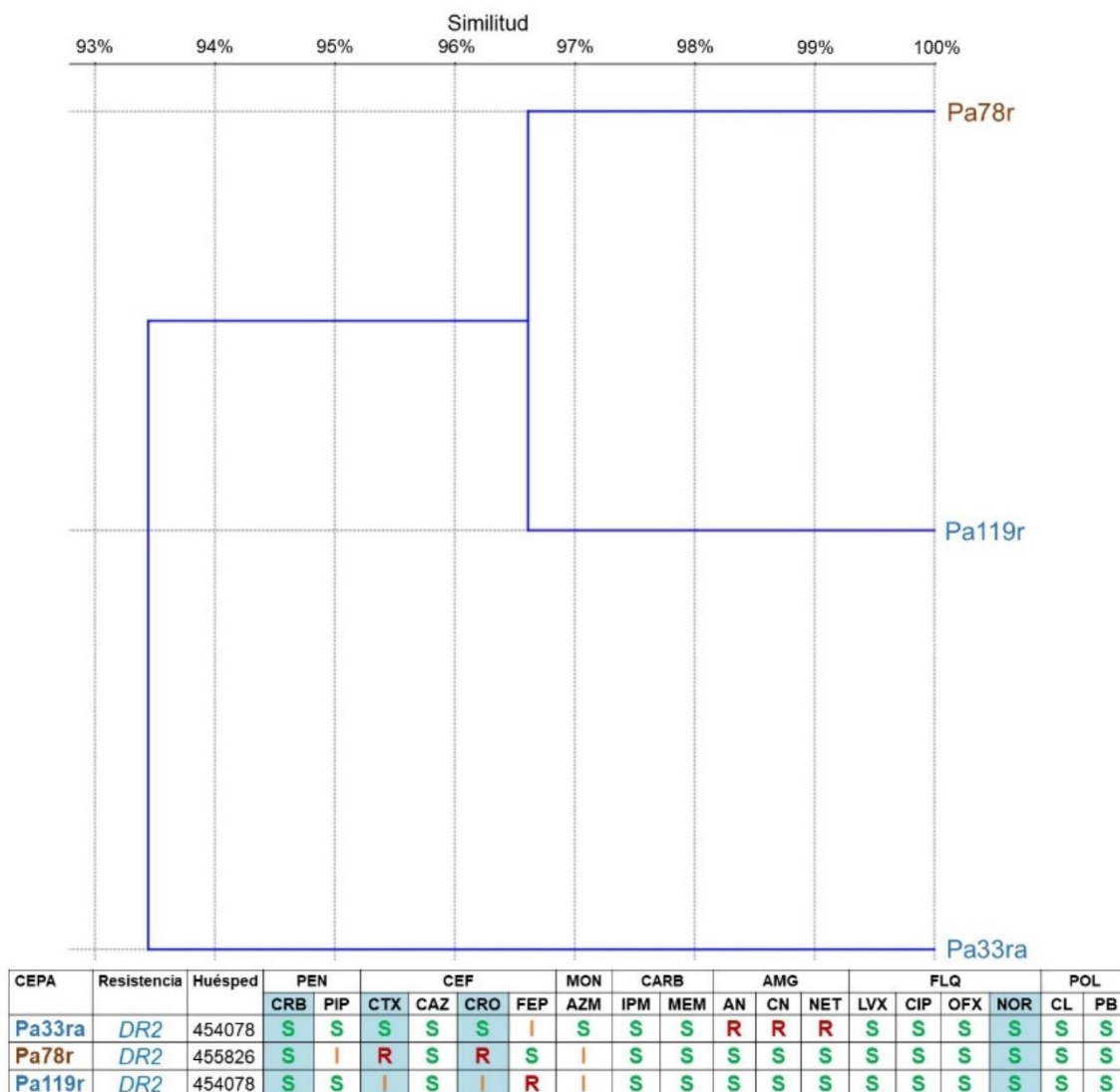


Figura 17. Infección cruzada entre dos pacientes con FQ.

Agrupación *RAPD* 5 que exhibe la similitud genética entre las cepas aisladas de dos pacientes, así como la fecha de aislamiento, categoría de resistencia y perfil de susceptibilidad a los antibióticos de cada cepa. Donde **S**= Sensibilidad al antibiótico; **I**= Resistencia intermedia; **R** = Resistencia; PEN= Penicilinas; CEF= Cefalosporinas; MON= Monobactámicos; CARB= Carbapenémicos; AMG= Aminoglucósidos; FLQ= Fluoroquinolonas; POL= Polimixinas. Los antibióticos adicionales y no sugeridos por el CLSI [119] fueron: CRB= Carbenicilina; CTX= Cefotaxime; CRO= Ceftriaxona y NOR= Norfloxacin. Los antibióticos sugeridos por el CLSI [119] fueron: PIP= Piperacilina; CAZ= Ceftazidime; FEP= Cefepime; AZM= Aztreonam; IPM= Imipenem; MEM= Meropenem; AN= Amikacina; CN= Gentamicina; NET= Netilmicina; LVX= Levofloxacina; CIP= Ciprofloxacina; OFX= Ofloxacina; CL= Colistina y PB= Polimixina B.

Un total de ocho pacientes con infecciones recurrentes exhibieron cepas de grupos de *RAPD* diferentes a lo largo de la infección crónica (pacientes Px02, Px19, Px13, Px12, Px03, Px01, Px23 y Px04), en cinco de ellos (pacientes Px02, Px19, Px03, Px01 y Px04) se

identificaron cepas en coinfección, las cuales fueron eliminadas gradualmente, permitiendo la persistencia de cepas pertenecientes a una misma agrupación de *RAPD*.

4.3. Resistencia a los antibióticos de cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

Todas las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas fueron susceptibles a colistina (CL) y polimixina B (PB). La susceptibilidad *in vitro* mostrada hacia los 16 antibióticos restantes fue menor al 80%, resaltando a NOR, CAZ y CRB como los antibióticos con mayor actividad antimicrobiana contra las cepas clínicas estudiadas, debido a la inhibición del crecimiento del 77.12%, 77.12% y 70.34% de las cepas, respectivamente. En contraste, PIP, CRO y CTX fueron los antibióticos con menor actividad antibacteriana (35.59%, 22.88% y 9.32%, respectivamente). El antibiograma completo con los 18 antibióticos anti-pseudomonales utilizados contra las 118 cepas clínicas de *P. aeruginosa* está descrito en el Anexo 5.

Tabla 3. Distribución de cepas clínicas en categorías de resistencia a los antibióticos.

	<i>PanS</i>	<i>DR1</i>	<i>DR2</i>	<i>MDR</i>	<i>XDR</i>
Número de cepas	13	18	22	50	15

Pie de tabla: *PanS*, susceptibles a todos los antibióticos evaluados; *DR1*, no-susceptibles a al menos un agente de un grupo de antibióticos; *DR2*, no-susceptibles a al menos un agente de dos grupos de antibióticos; *MDR*, no-susceptibles a al menos un agente de tres o más grupos de antibióticos; *XDR*, no-susceptibles a al menos un agente de todos los grupos establecidos para *P. aeruginosa* menos dos grupos.

En la población estudiada se identificó un porcentaje sustancial de cepas de *P. aeruginosa* con resistencia elevada a los antibióticos recomendados por el CLSI (55.08%). Específicamente, el 42.37% de las cepas pertenecieron a la categoría *MDR* y el 12.71% a *XDR*. Por otro lado, el 11.02%, 15.25% y 18.64% de las cepas se definieron como *PanS*, *DR1* y *DR2*, respectivamente (Tabla 3). El 84.61% de las cepas con mayor resistencia a los antibióticos (55/65) fueron aisladas de pacientes con infecciones recurrentes.

Adicionalmente, en las cepas aisladas de ocho pacientes con reinfecciones (considerando cepas integradas en una misma agrupación de *RAPD*), se analizó la variación de los perfiles de resistencia con respecto al tiempo, aunado a la visualización de la sustitución o persistencia de cepas pertenecientes a agrupaciones distintas.

En detalle, el paciente Px02, constituido por siete cepas *MDR* distribuidas en las agrupaciones *RAPD* 1, 2, 44, 45 y 46, mostró una sustitución clonal constante en las cuatro secreciones respiratorias analizadas (Tabla 4). La cepa Pa02m (del *RAPD* 46), fue reemplazada por una coinfección causada por las cepas Pa27ma (*RAPD* 44), Pa27mb y

Pa27r (*RAPD* 45), mismas que no fueron identificadas en el aspirado bronco-alveolar (ABA) obtenido cuatro días después, cabe señalar que el paciente se encontraba bajo tratamiento con AN/CAZ, sin embargo la cepa Pa28m (*RAPD* 1) fue identificada en la misma muestra y 10 días después, únicamente se encontraron las cepas Pa29ma y Pa29mb del *RAPD* 2. Todas las cepas fueron no-susceptibles a los AMG y al menos a dos de las CEF evaluadas.

Tabla 4. Historial infeccioso del paciente Px02.

Cepa		Pa02m	Pa27ma	Pa27mb	Pa27r	Pa28m	Pa29ma	Pa29mb	
Categoría de Resistencia		MDR	MDR	MDR	MDR	MDR	MDR	MDR	
Agrupación <i>RAPD</i>		46	44	45	45	1	2	2	
Fecha (dd/mm/aa)		08/05/15	19/02/16	19/02/16	19/02/16	23/02/16	04/03/16	04/03/16	
Tratamiento del paciente		CN/CIP	S/T	S/T	S/T	AN/CAZ	S/T	S/T	
Familia de antibióticos	PEN	CRB	S	S	S	S	R	S	S
		PIP	S	R	I	R	R	I	I
	CEF	CTX	R	R	R	I	R	R	R
		CAZ	R	I	S	S	S	S	S
		CRO	R	R	I	S	S	R	R
		FEP	R	S	R	I	I	R	S
	MON	AZM	S	S	S	S	I	S	S
	CARB	IPM	S	S	S	S	S	S	S
		MEM	S	S	S	S	S	S	R
	AMG	AN	R	R	R	I	R	R	I
		CN	R	R	R	R	R	R	I
		NET	R	R	R	R	R	R	I
	FLQ	LVX	I	S	R	I	I	I	I
		CIP	S	S	I	S	S	I	S
		OFX	I	S	R	R	R	S	S
		NOR	S	S	S	S	S	S	S
	POL	CL	S	S	S	S	S	S	S
		PB	S	S	S	S	S	S	S

Pie de tabla: **S**= Sensibilidad al antibiótico; **I**= Resistencia intermedia; **R** = Resistencia; PEN= Penicilinas; CEF= Cefalosporinas; MON= Monobactámicos; CARB= Carbapenémicos; AMG= Aminoglucósidos; FLQ= Fluoroquinolonas; POL= Polimixinas; PIP= Piperacilina; CAZ= Ceftazidime; FEP= Cefepime; AZM= Aztreonam; IPM= Imipenem; MEM= Meropenem; AN= Amikacina; CN= Gentamicina; NET= Netilmicina; LVX= Levofloxacin; CIP= Ciprofloxacina; OFX= Ofloxacina; CL= Colistina y PB= Polimixina B; **Filas sombreadas**=Antibióticos adicionales no sugeridos por el CLSI [119]: CRB= Carbenicilina; CTX= Cefotaxime; CRO= Ceftriaxona y NOR= Norfloxacina.

Por otro lado, el primer lavado bronco-alveolar (LBA) adquirido del paciente Px03 durante ausencia de tratamiento, mostró una coinfección conformada por las cepas Pa53m con perfil *MDR* y Pa53rb con perfil *DR2*, ambas pertenecientes al *RAPD* 18, en combinación con la cepa Pa53ra con perfil *DR1* del *RAPD* 40. Las cepas de ambas agrupaciones persistieron hacia la siguiente secreción respiratoria obtenida durante el tratamiento del

paciente con CAZ (Pa58ra con perfil DR2, del RAPD 18 y Pa58m con perfil PanS, del RAPD 40), las cuales exhibieron variaciones mínimas en sus perfiles de resistencia a los antibióticos respecto a sus antecesoras, a pesar de ser agrupadas en categorías de resistencia distintas. Finalmente, en la última muestra obtenida del paciente durante su antibioticoterapia con DX y AN, se identificó la persistencia únicamente de cepas DR1 del RAPD 40 (Pa60m y Pa60r), las cuales presentaron perfiles de resistencia similares a las mostradas por la cepa aislada de la primera muestra analizada (Tabla 5).

Tabla 5. Historial infeccioso del paciente Px03.

Cepa		Pa53m	Pa53rb	Pa53ra	Pa58ra	Pa58m	Pa60m	Pa60r	
Categoría de Resistencia		MDR	DR2	DR1	DR2	PanS	DR1	DR1	
Agrupación RAPD		18	18	40	18	40	40	40	
Fecha (dd/mm/aa)		28/10/16	28/10/16	28/10/16	11/11/16	11/11/16	15/11/16	15/11/16	
Tratamiento del paciente		S/T	S/T	S/T	CAZ	CAZ	DX/AN	DX/AN	
Familia de antibióticos	PEN	CRB	S	I	S	S	S	S	
		PIP	I	I	S	I	S	S	
	CEF	CTX	R	R	I	I	I	R	R
		CAZ	S	S	S	S	S	S	S
		CRO	R	R	I	R	I	R	R
		FEP	S	S	S	I	S	S	S
	MON	AZM	I	S	I	S	S	I	I
	CARB	IPM	S	S	S	S	S	S	S
		MEM	I	S	S	S	S	S	S
	AMG	AN	S	S	S	S	S	S	S
		CN	S	S	S	S	S	S	S
		NET	S	S	S	S	S	S	S
	FLQ	LVX	S	I	S	S	S	S	S
		CIP	S	S	S	S	S	S	S
		OFX	S	S	S	S	S	S	S
		NOR	S	S	S	S	S	S	S
	POL	CL	S	S	S	S	S	S	S
		PB	S	S	S	S	S	S	S

Pie de tabla: **S**= Sensibilidad al antibiótico; **I**= Resistencia intermedia; **R** = Resistencia; PEN= Penicilinas; CEF= Cefalosporinas; MON= Monobactámicos; CARB= Carbapenémicos; AMG= Aminoglucósidos; FLQ= Fluoroquinolonas; POL= Polimixinas; PIP= Piperacilina; CAZ= Ceftazidime; FEP= Cefepime; AZM= Aztreonam; IPM= Imipenem; MEM= Meropenem; AN= Amikacina; CN= Gentamicina; NET= Netilmicina; LVX= Levofloxacina; CIP= Ciprofloxacina; OFX= Ofloxacina; CL= Colistina y PB= Polimixina B; **Filas sombreadas**= Antibióticos adicionales no sugeridos por el CLSI [119]: CRB= Carbenicilina; CTX= Cefotaxime; CRO= Ceftriaxona y NOR= Norfloxacina.

En cuanto al primer LBA obtenido del paciente Px04 en ausencia de tratamiento, se detectó la coinfección con las cepas Pa54ma y Pa54rb del RAPD 32, Pa54ra del RAPD 33 y Pa54mb del RAPD 34. El perfil de susceptibilidad de las cepas del RAPD 32 fue el mismo

a excepción de la no-susceptibilidad a CTX en la cepa Pa54rb, mientras que ambas cepas *MDR* mostraron perfiles de resistencia diferentes. Nueve días después, mientras el paciente fue sometido a terapia con AN/CAZ, se adquirió una SB donde se detectó únicamente un miembro del *RAPD* 32 (Pa57r) con un perfil *PanS*. Finalmente, en su último LBA adquirido durante ausencia de tratamiento, se identificó solamente una cepa del *RAPD* 25 (Pa98rb), misma que exhibió un perfil *MDR* con mayor resistencia a los antibióticos que las cepas identificadas anteriormente (Tabla 6).

Tabla 6. Historial infeccioso del paciente Px04.

Cepa	Pa54ma	Pa54rb	Pa54ra	Pa54mb	Pa57r	Pa98rb		
Categoría de Resistencia	<i>PanS</i>	<i>PanS</i>	<i>MDR</i>	<i>MDR</i>	<i>PanS</i>	<i>MDR</i>		
Agrupación <i>RAPD</i>	32	32	33	34	32	25		
Fecha (dd/mm/aa)	01/11/16	01/11/16	01/11/16	01/11/16	10/11/16	28/11/17		
Tratamiento del paciente	S/T	S/T	S/T	S/T	AN/CAZ	S/T		
Familia de antibióticos	PEN	CRB	S	S	S	R	S	S
		PIP	S	S	I	I	S	S
	CEF	CTX	S	I	R	I	S	I
		CAZ	S	S	S	S	S	S
		CRO	S	S	I	I	S	I
		FEP	S	S	S	S	S	R
	MON	AZM	S	S	I	S	S	I
	CARB	IPM	S	S	I	I	S	R
		MEM	S	S	S	S	S	I
	AMG	AN	S	S	S	S	S	I
		CN	S	S	S	S	S	R
		NET	S	S	I	S	S	I
	FLQ	LVX	S	S	S	S	S	S
		CIP	S	S	S	S	S	S
		OFX	S	S	S	R	S	S
		NOR	S	S	S	S	S	S
	POL	CL	S	S	S	S	S	S
		PB	S	S	S	S	S	S

Pie de tabla: **S**= Sensibilidad al antibiótico; **I**= Resistencia intermedia; **R** = Resistencia; PEN= Penicilinas; CEF= Cefalosporinas; MON= Monobactámicos; CARB= Carbapenémicos; AMG= Aminoglucósidos; FLQ= Fluoroquinolonas; POL= Polimixinas; PIP= Piperacilina; CAZ= Ceftazidime; FEP= Cefepime; AZM= Aztreonam; IPM= Imipenem; MEM= Meropenem; AN= Amikacina; CN= Gentamicina; NET= Netilmicina; LVX= Levofloxacina; CIP= Ciprofloxacina; OFX= Ofloxacina; CL= Colistina y PB= Polimixina B; **Filas sombreadas**= Antibióticos adicionales no sugeridos por el CLSI [119]; CRB= Carbenicilina; CTX= Cefotaxime; CRO= Ceftriaxona y NOR= Norfloxacina.

En el paciente Px01, la primera muestra de esputo del paciente, exhibió una infección con la cepa Pa01r agrupada en el *RAPD* 28, con un perfil *DR1*, la cual fue identificada cerca de tres años después, en un cultivo de LBA obtenido en ausencia de tratamiento (Pa116m), difiriendo en su adquisición de susceptibilidad a PIP. Adicionalmente, las cepas Pa116rb y

Pa116rc del *RAPD* 19, así como la cepa Pa116ra del *RAPD* 29, fueron identificadas en coinfección con la Pa116m, todas ellas presentaron perfiles de susceptibilidad similares a pesar de diferir en su categoría de resistencia (Tabla 7).

Tabla 7. Historial infeccioso del paciente Px01.

Cepa		Pa01r	Pa116m	Pa116ra	Pa116rb	Pa116rc	
Categoría de Resistencia		<i>DR1</i>	<i>DR1</i>	<i>DR1</i>	<i>DR1</i>	<i>PanS</i>	
Agrupación <i>RAPD</i>		28	28	29	19	19	
Fecha (dd/mm/aa)		22/04/15	10/08/18	10/08/18	10/08/18	10/08/18	
Tratamiento del paciente		S/T	S/T	S/T	S/T	S/T	
Familia de antibióticos	PEN	CRB	S	S	S	S	S
		PIP	I	R	I	I	S
	CEF	CTX	R	R	R	R	R
		CAZ	S	S	S	S	S
		CRO	R	R	R	R	R
		FEP	S	S	S	S	S
	MON	AZM	S	S	S	S	S
	CARB	IPM	S	S	S	S	S
		MEM	S	S	S	S	S
	AMG	AN	S	S	S	S	S
		CN	S	S	S	S	S
		NET	S	S	S	S	S
	FLQ	LVX	S	S	S	S	S
		CIP	S	S	S	S	S
		OFX	S	S	S	S	S
		NOR	S	S	S	S	S
	POL	CL	S	S	S	S	S
		PB	S	S	S	S	S

Pie de tabla: **S**= Sensibilidad al antibiótico; **I**= Resistencia intermedia; **R** = Resistencia; **PEN**= Penicilinas; **CEF**= Cefalosporinas; **MON**= Monobactámicos; **CARB**= Carbapenémicos; **AMG**= Aminoglucósidos; **FLQ**= Fluoroquinolonas; **POL**= Polimixinas; **PIP**= Piperacilina; **CAZ**= Cefotaxime; **FEP**= Cefepime; **AZM**= Aztreonam; **IPM**= Imipenem; **MEM**= Meropenem; **AN**= Amikacina; **CN**= Gentamicina; **NET**= Netilmicina; **LVX**= Levofloxacina; **CIP**= Ciprofloxacina; **OFX**= Ofloxacina; **CL**= Colistina y **PB**= Polimixina B; **Filas sombreadas**= Antibióticos adicionales no sugeridos por el CLSI [119]: **CRB**= Carbenicilina; **CTX**= Cefotaxime; **CRO**= Ceftriaxona y **NOR**= Norfloxacina.

En el primer esputo del paciente Px12 adquirido durante su tratamiento con CIP, se aisló la cepa Pa22r del *RAPD* 42 con un perfil *DR1*, misma que no fue identificada en la SB adquirida casi un año después, mientras el paciente era tratado con AN/CAZ. Sin embargo, de esa secreción respiratoria se aisló la cepa Pa53r del *RAPD* 43, la cual exhibió un perfil *MDR*. Esta cepa fue identificada nuevamente (Pa122r) en un esputo adquirido dos años después, durante su tratamiento con DX/CAZ, demostrando la adquisición de resistencia hacia todos los AMG evaluados (Tabla 8).

Las secreciones respiratorias adquiridas del paciente Px13 exhibieron infecciones ocasionadas por las cepas Pa32r y Pa111m, aisladas en un periodo poco mayor a dos años y que mostraron un porcentaje de similitud apenas excluyente (<78%) para ser consideradas como la misma cepa (*RAPD* 3 y 4, respectivamente); además presentaron perfiles de susceptibilidad similares a pesar de pertenecer a categorías de resistencia distintas (*DR2* y *PanS*, respectivamente). Por su parte, las cepas Pa06r y Pa25r, ambas con un perfil *MDR*, fueron aisladas de muestras de esputo del paciente Px23, obtenidas con una diferencia aproximada de ocho meses; las cepas mostraron un porcentaje de similitud escasamente menor al 80% para ser consideradas la misma cepa (*RAPD* 37 y 38 respectivamente) y perfiles de susceptibilidad con diferencias mínimas (Tabla 9).

Tabla 8. Historial infeccioso del paciente Px12.

Cepa			Pa22r	Pa59r	Pa122r
Categoría de Resistencia			<i>DR1</i>	<i>MDR</i>	<i>MDR</i>
Agrupación <i>RAPD</i>			42	43	43
Fecha (dd/mm/aa)			21/12/15	11/11/16	05/03/19
Tratamiento del paciente			CIP	AN/CAZ	CAZ/DX
Familia de antibióticos	PEN	CRB	S	R	S
		PIP	S	I	I
	CEF	CTX	R	I	R
		CAZ	S	S	S
		CRO	I	I	R
		FEP	S	S	S
	MON	AZM	S	S	I
	CARB	IPM	R	S	S
		MEM	R	S	S
	AMG	AN	S	R	R
		CN	S	S	R
		NET	S	S	R
	FLQ	LVX	S	I	I
		CIP	S	S	S
		OFX	S	S	S
		NOR	S	S	S
	POL	CL	S	S	S
		PB	S	S	S

Pie de tabla: **S**= Sensibilidad al antibiótico; **I**= Resistencia intermedia; **R** = Resistencia; PEN= Penicilinas; CEF= Cefalosporinas; MON= Monobactámicos; CARB= Carbapenémicos; AMG= Aminoglicósidos; FLQ= Fluoroquinolonas; POL= Polimixinas; PIP= Piperacilina; CAZ= Ceftazidime; FEP= Cefepime; AZM= Aztreonam; IPM= Imipenem; MEM= Meropenem; AN= Amikacina; CN= Gentamicina; NET= Netilmicina; LVX= Levofloxacina; CIP= Ciprofloxacina; OFX= Ofloxacina; CL= Colistina y PB= Polimixina B; **Filas sombreadas**= Antibióticos adicionales no sugeridos por el CLSI [119]: CRB= Carbenicilina; CTX= Cefotaxime; CRO= Ceftriaxona y NOR= Norfloxacina.

Finalmente, el paciente Px19 fue el hospedero con el historial infeccioso más extenso de este trabajo (Figura 18), conformado por 43 cepas distribuidas en nueve agrupaciones de *RAPD* (*RAPD* 9 a *RAPD* 17) las cuales fueron aisladas de 15 secreciones respiratorias adquiridas a lo largo de 47 meses de seguimiento. Ocho de esas muestras presentaron cepas de una sola agrupación de *RAPD* (muestra 1 [22/05/2015], 3 [25/01/2016], 7 [17/06/2016], 8 [22/06/2016], 9 [23/06/2017], 10 [20/07/2017], 11 [27/07/2018] y 13 [03/09/18]), mientras que en las restantes se encontraron cepas de diferentes agrupaciones (muestra 2 [01/11/2015], 4 [01/06/2016], 5 [08/06/2016], 6 [15/06/2016], 12 [29/08/2018], 14 [26/09/2018] y 15 [16/04/2019]).

Tabla 9. Historial infeccioso de los pacientes Px13 y Px23.

Paciente		Px13		Px23		
Cepa		Pa32r	Pa111m	Pa06r	Pa25r	
Categoría de Resistencia		<i>DR2</i>	<i>PanS</i>	<i>MDR</i>	<i>MDR</i>	
Agrupación <i>RAPD</i>		3	4	37	38	
Fecha (dd/mm/aa)		20/04/16	05/06/18	28/05/15	10/01/16	
Tratamiento del paciente		AZM	S/T	MEM/VAN	S/T	
Familia de antibióticos	PEN	CRB	S	S	S	R
		PIP	I	S	I	I
	CEF	CTX	R	R	R	R
		CAZ	S	S	S	S
		CRO	R	R	R	R
		FEP	S	S	S	S
	MON	AZM	I	S	R	R
	CARB	IPM	S	S	R	R
		MEM	S	S	R	R
	AMG	AN	S	S	I	S
		CN	S	S	S	S
		NET	S	S	I	S
	FLQ	LVX	S	S	R	I
		CIP	S	S	S	S
		OFX	S	S	S	R
		NOR	S	S	S	S
	POL	CL	S	S	S	S
		PB	S	S	S	S

Pie de tabla: **S**= Sensibilidad al antibiótico; **I**= Resistencia intermedia; **R** = Resistencia; PEN= Penicilinas; CEF= Cefalosporinas; MON= Monobactámicos; CARB= Carbapenémicos; AMG= Aminoglucósidos; FLQ= Fluoroquinolonas; POL= Polimixinas; PIP= Piperacilina; CAZ= Ceftazidime; FEP= Cefepime; AZM= Aztreonam; IPM= Imipenem; MEM= Meropenem; AN= Amikacina; CN= Gentamicina; NET= Netilmicina; LVX= Levofloxacina; CIP= Ciprofloxacina; OFX= Ofloxacina; CL= Colistina y PB= Polimixina B; **Filas sombreadas**= Antibióticos adicionales no sugeridos por el CLSI [119]: CRB= Carbenicilina; CTX= Cefotaxime; CRO= Ceftriaxona y NOR= Norfloxacina.

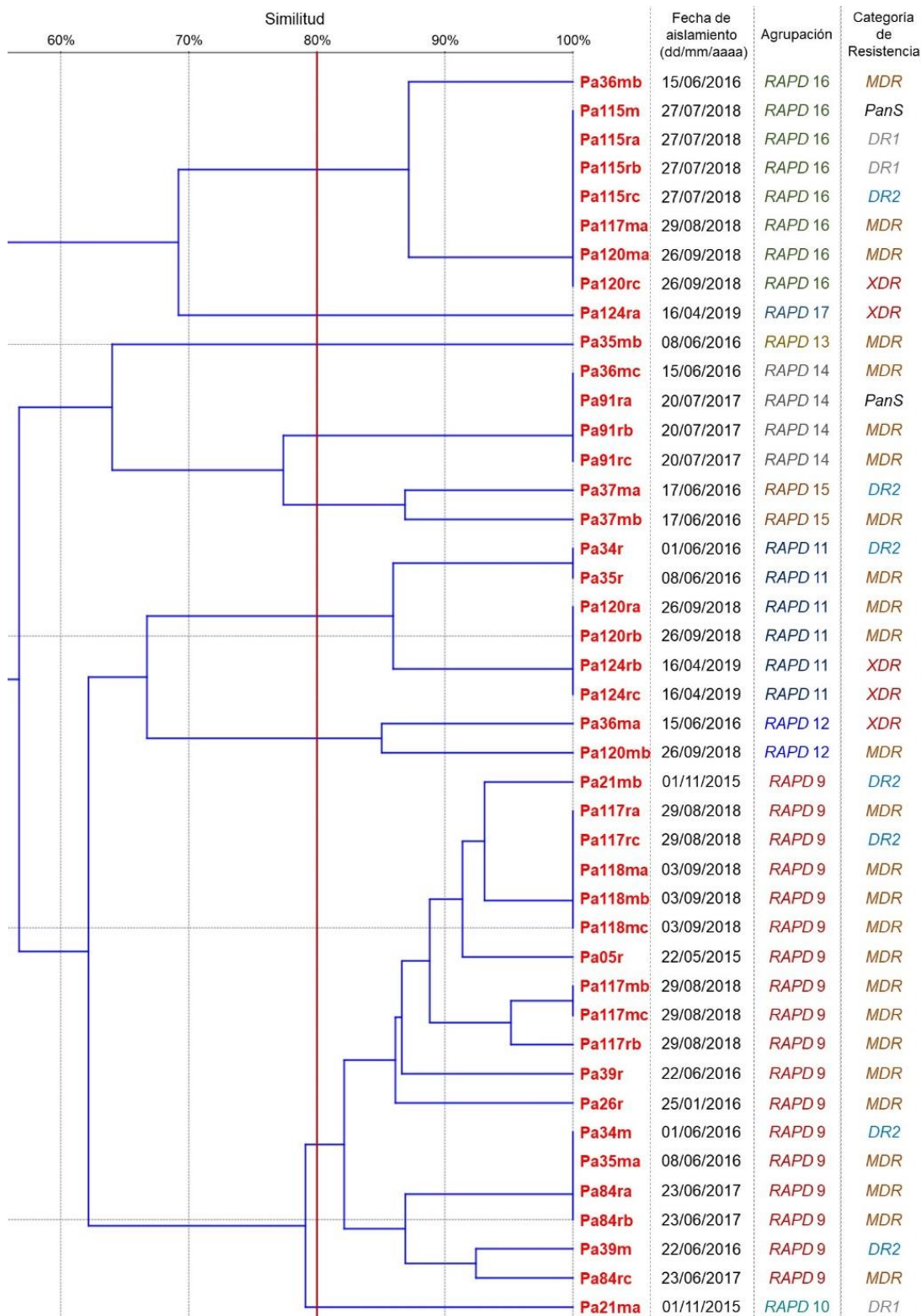


Figura 18. Dendrograma del paciente Px19.

Distribución de las 43 cepas clínicas aisladas del hospedero 457698 en las agrupaciones de RAPD 9-17, indicando fecha de aislamiento y categoría de resistencia.

La primera cepa identificada (Pa05r) perteneció al *RAPD* 9 y mostró un perfil *MDR*. Esa agrupación se conformó por otras 17 cepas, de las cuales cuatro disminuyeron su resistencia hacia la categoría *DR2* (Pa21mb, Pa34m, Pa39m, y Pa117rc), mientras que 13 cepas conservaron su fenotipo *MDR* (Pa26r, Pa35ma, Pa39r, Pa84ra, Pa84rb, Pa84rc, Pa117ra, Pa117rb, Pa117mb, Pa117mc, Pa118ma, Pa118mb y Pa118mc). Posteriormente, de la muestra 2 se aisló la cepa Pa21ma (*RAPD* 10), la cual guardó una similitud ligeramente menor con las cepas del *RAPD* 9, y una susceptibilidad mayor (*DR1*).

Por su parte, el *RAPD* 11 se conformó inicialmente por una cepa *DR2* (Pa34r) aislada de la muestra 4, mientras que las siguientes cepas fueron aisladas de secreciones respiratorias posteriores (Pa35r de la muestra 5; Pa120ra y Pa120rb de la muestra 14; Pa124rb y Pa124rc de la muestra 15). En esta agrupación se distinguió el incremento progresivo de la resistencia a los antibióticos, pasando de un perfil *DR2* (cepa Pa34r) a *MDR* (cepas Pa35r, Pa120ra y Pa120rb) y finalmente a *XDR* (Pa124rb y Pa124rc). Adicionalmente en la muestra 4, se encontró la cepa Pa34m (del *RAPD* 9, descrito en párrafos anteriores), la cual persistió en coinfección hasta la muestra 5 (Pa35ma) con las cepas Pa35r del *RAPD* 11 y Pa35mb del *RAPD* 13, ambas de la categoría *MDR*.

De la muestra 6 de ese mismo paciente (Px19) se aislaron tres cepas pertenecientes a tres agrupaciones de *RAPD* diferentes (Pa36ma del *RAPD* 12, Pa36mc del *RAPD* 14 y Pa36mb del *RAPD* 16). La cepa Pa36ma presentó un fenotipo *XDR*, el cual disminuyó a *MDR* (Pa120mb, similitud del ~85% con Pa36ma) en un periodo de 27 meses (muestra 14), donde se detectó en coinfección con otras tres cepas *MDR* (Pa120ra y Pa120rb del *RAPD* 11, y Pa120ma del *RAPD* 16) y una cepa *XDR* (Pa120rc del *RAPD* 16). También de la muestra 6 se aisló la cepa Pa36mc con perfil *MDR*, la cual fue identificada 13 meses después (muestra 10), como tres variantes con una similitud por *RAPD* >95%, dos de ellas (Pa91rb y Pa91rc) mantuvieron la categoría *MDR* y una (Pa91ra) incrementó su susceptibilidad (*PanS*). En cuanto a la cepa Pa36mb con perfil *MDR*, reveló una similitud por *RAPD* >85% con cuatro cepas (Pa115m con perfil *PanS*; Pa115ra y Pa115rb con perfil *DR1*; y Pa115rc con perfil *DR2*) aisladas 25 meses después de la muestra 11. Estas últimas, mostraron una similitud total por *RAPD* con la cepa Pa117ma con perfil *MDR*, aislada de la siguiente secreción respiratoria (muestra 12) y con las cepas Pa120ma con perfil *MDR* y Pa120rc de la categoría *XDR*, ambas aisladas de la muestra 14.

De la muestra siete fueron aisladas únicamente cepas del *RAPD* 15 (Pa37ma y Pa37mb) con fenotipos de resistencia distintos (*DR2* y *MDR*, respectivamente). Finalmente,

en la muestra 15, además de identificar las cepas Pa124rb y Pa124rc del *RAPD* 11 (descrito en párrafos anteriores), se aisló la cepa Pa124ra (*RAPD* 17) con un fenotipo *XDR*.

Interesantemente, las últimas 11 cepas aisladas de Px19 (muestras 13-15), exhibieron únicamente fenotipos con resistencia elevada a los antibióticos, específicamente siete cepas *MDR* (Pa118ma, Pa118mb, Pa118mc, Pa120ra, Pa120rb, Pa120ma y Pa120mb) y cuatro *XDR* (Pa120rc, Pa124ra, Pa124rb y Pa124rc). Este apartado permitió discriminar 42 cepas con perfiles de *RAPD* idénticos y perfiles de resistencia a los antibióticos semejantes, seleccionando 76 cepas clínicas de *P. aeruginosa* aisladas de 24 pacientes con Fibrosis Quística para el siguiente proceso metodológico (Anexo 6).

4.4. Establecimiento de biopelículas de cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

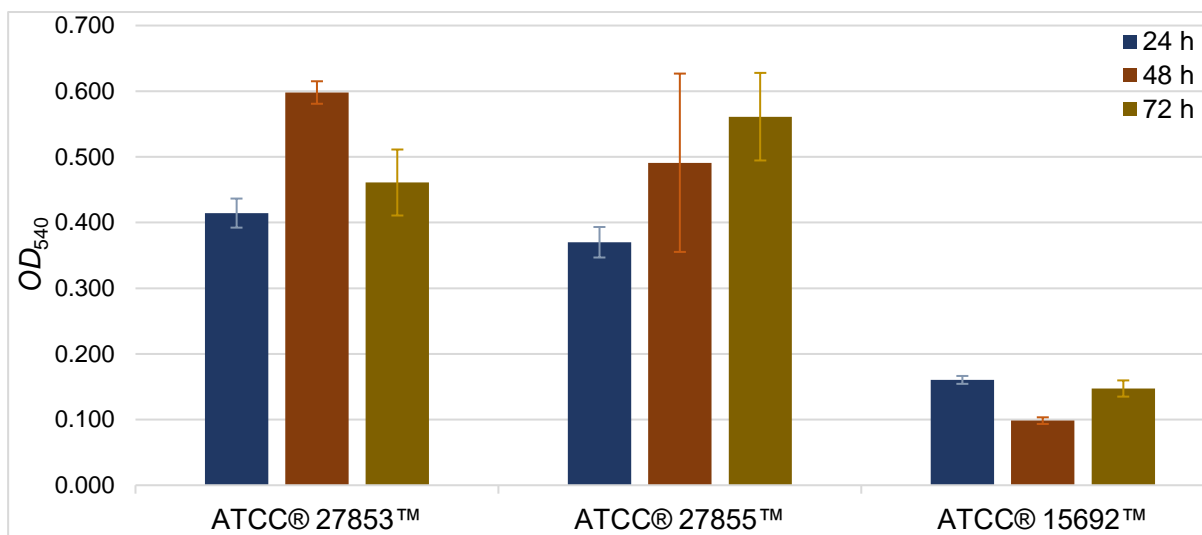


Figura 19. Establecimiento de biopelículas de cepas de referencia de *P. aeruginosa*.

Histograma de la absorbancia identificada en tres ensayos independientes de establecimiento de biopelículas de cada cepa de referencia de *P. aeruginosa*, cuantificadas a las 24 h, 48 h y 72 h.

Las cepas de referencia de *P. aeruginosa* mostraron establecimientos de biopelículas heterogéneos (Figura 19). La cepa ATCC® 15692™ mostró los valores de absorbancia menores en los tres tiempos analizados, identificando a las 24 h su establecimiento de biopelículas máximo (OD_{540} 0.160±0.012), el cual descendió a las 48 h (OD_{540} 0.098±0.010) y se incrementó nuevamente a las 72 h (OD_{540} 0.147±0.024). Por otro lado, las cepas ATCC® 27853™ y ATCC® 27855™ presentaron los mayores establecimientos de biopelículas a las 24 h (OD_{540} 0.414±0.044 y 0.369±0.046, respectivamente), las cuales

fueron significativamente diferentes entre ellas (Mann-Whitney $p=0.0351$), ATCC® 27853™ mostró las absorbancias más intensas a las 48 h (OD_{540} 0.598 ± 0.034), aunque ATCC® 27855™ (OD_{540} 0.491 ± 0.271), fue la que estableció más biopelícula a las 72 h (OD_{540} 0.561 ± 0.133). Las absorbancias totales de las cepas de referencia están detalladas en el Anexo 7.

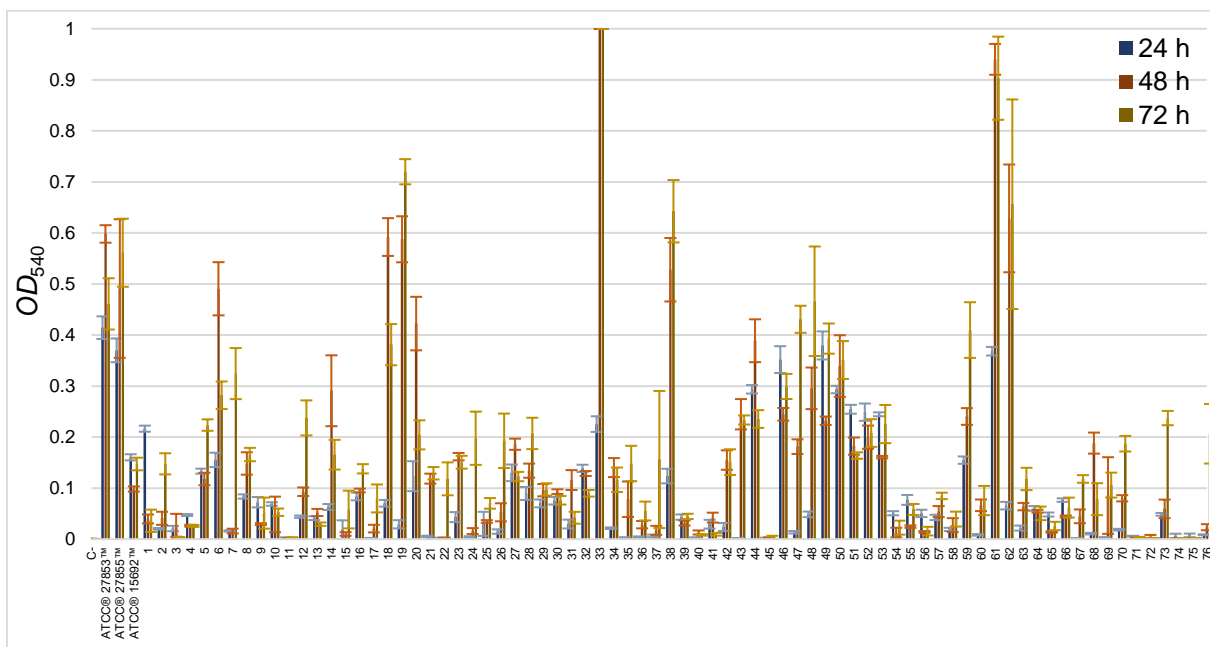


Figura 20. Establecimiento de biopelículas de cepas de referencia de *P. aeruginosa* y 76 cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

Histograma de la absorbancia identificada a las 24 h, 48 h y 72 h, correspondiente a tres ensayos independientes de tinción con CV, referente al establecimiento de biopelículas de 76 cepas clínicas de *P. aeruginosa* ordenadas de acuerdo con la tabla del Anexo 6.

En cuanto a las cepas clínicas de *P. aeruginosa*, todas exhibieron una heterogeneidad elevada en el establecimiento de biopelículas en los tres tiempos analizados (Figura 20; Anexo 8, 24 h; Anexo 9, 48 h y Anexo 10, 72 h).

Los análisis estadísticos basados en la cepa de referencia con menor establecimiento de biopelículas (ATCC® 15692™) a los tres tiempos analizados, permitieron distinguir 42 cepas clínicas con establecimientos de biopelículas equivalentes a esa cepa (Dunn $p=1.000$ a $p=0.0503$) y 34 cepas con formación de biopelículas significativamente menores a las 24 h (Dunn $p=0.0365$ a $p<0.0001$). A las 48 h, se identificaron dos cepas con absorbancias mayores a las de ATCC® 15692™ (Pa54ra, $p=0.0156$ y Pa115rb, $p=0.0205$; Dunn), 66

cepas con absorbancias semejantes (Dunn $p > 0.0698$) y ocho cepas clínicas con absorbancias menores (Dunn $p = 0.0445$ a $p = 0.0008$). Finalmente, a las 72 h, las cepas Pa54ra y Pa115rb formaron significativamente más biopelícula que ATCC® 15692™ (Dunn $p = 0.0241$ y $p = 0.0353$, respectivamente), 64 cepas lo hicieron a niveles similares (Dunn $p > 0.0700$), solo 10 cepas establecieron menos biopelículas (Dunn $p = 0.0350$ a $p = 0.0006$).

Considerando a ATCC® 27853™ como la cepa con mayor formación de biopelículas a las 24 h y 48 h, así como a ATCC® 27855™ como la cepa con mayor establecimiento de biopelículas a las 72 h, no fueron detectadas cepas clínicas que exhibieran absorbancias estadísticamente superiores a las mostradas por esas cepas. Los valores de p de las comparaciones entre cada cepa clínica y cada cepa de referencia de *P. aeruginosa* están descritos en el Anexo 11.

Los análisis comparativos de las absorbancias de cada cepa, basados en su morfología colonial, categoría de resistencia, tipo de secreción respiratoria del que fueron aisladas, agrupación de RAPD, hospedero y tratamiento sometido al paciente durante la toma de su muestra clínica, se describen en los párrafos siguientes.

Se distinguió a las 24 h, un establecimiento de biopelículas estadísticamente menor en las cepas mucoides respecto a las absorbancias identificadas en cepas no-mucoides (Mann-Whitney $p < 0.0001$), aunque esa diferencia fue imperceptible en las mediciones realizadas a las 48 h y 72 h (Mann-Whitney $p = 0.6323$ y $p = 0.3691$, respectivamente) (Figura 21-A). Por otro lado, las cepas integradas en las categorías de resistencia MDR y XDR, fueron las que formaron menos biopelículas a las 24 h, exhibiendo absorbancias estadísticamente menores (Dunn $p = 0.0220$) a las detectadas por el siguiente conjunto de cepas (*PanS*). Por su parte, las cepas DR2 mostraron la mayor absorbancia cuantificada a las 48 h y 72 h, misma que fue significativamente superior a la identificada en las otras categorías de resistencia, a excepción de las cepas MDR analizadas a las 72 h (Dunn $p = 0.0796$) (Figura 21-B).

El análisis basado en el tipo de muestra demostró que las cepas aisladas de ANF, establecieron más biopelículas a las 24 h y 72 h. Específicamente a las 24 h, las cepas de esas muestras no evidenciaron diferencias significativas con las cepas de ABA y LBA (Dunn $p = 1.0000$ y $p = 0.0537$, respectivamente), aunque contrastadas con las cepas de SB, EXP y esputo se identificaron significancias estadísticas (Dunn $p = 0.0038$, $p = 0.0013$ y $p < 0.0001$, respectivamente). Por otro lado, las cepas de ANF exhibieron a las 72h, biopelículas equivalentes a las cepas de ABA y SB, pero significativamente superiores a las cepas de LBA, esputo y EXP (Dunn $p = 0.0089$, $p = 0.0016$ y $p = 0.0024$, respectivamente). Finalmente,

las cepas aisladas de ABA fueron las que establecieron más biopelículas a las 48 h, detectando significancias únicamente contra las cepas aisladas de LBA y esputo (Dunn $p=0.0074$ y $p<0.0001$, respectivamente) (Figura 21-C).

En cuanto al análisis del establecimiento de biopelículas basado en los esquemas terapéuticos, se identificó que la cepa Pa94r agrupada en el *RAPD* 23, aislada de un ANF del hospedero Px07 durante su tratamiento con AN, CAZ y dicloxacilina (DX) (Figura 21-D), que mostró un fenotipo colonial no-mucoide y un perfil de resistencia *DR2*, fue la cepa con mayor establecimiento de biopelículas en todos los tiempos analizados, respecto a las cepas de 29 agrupaciones de *RAPD* (Dunn $p=0.0194$ a $p<0.0001$), y 11 esquemas de tratamiento diferentes (Dunn $p=0.0085$ a $p<0.0001$).

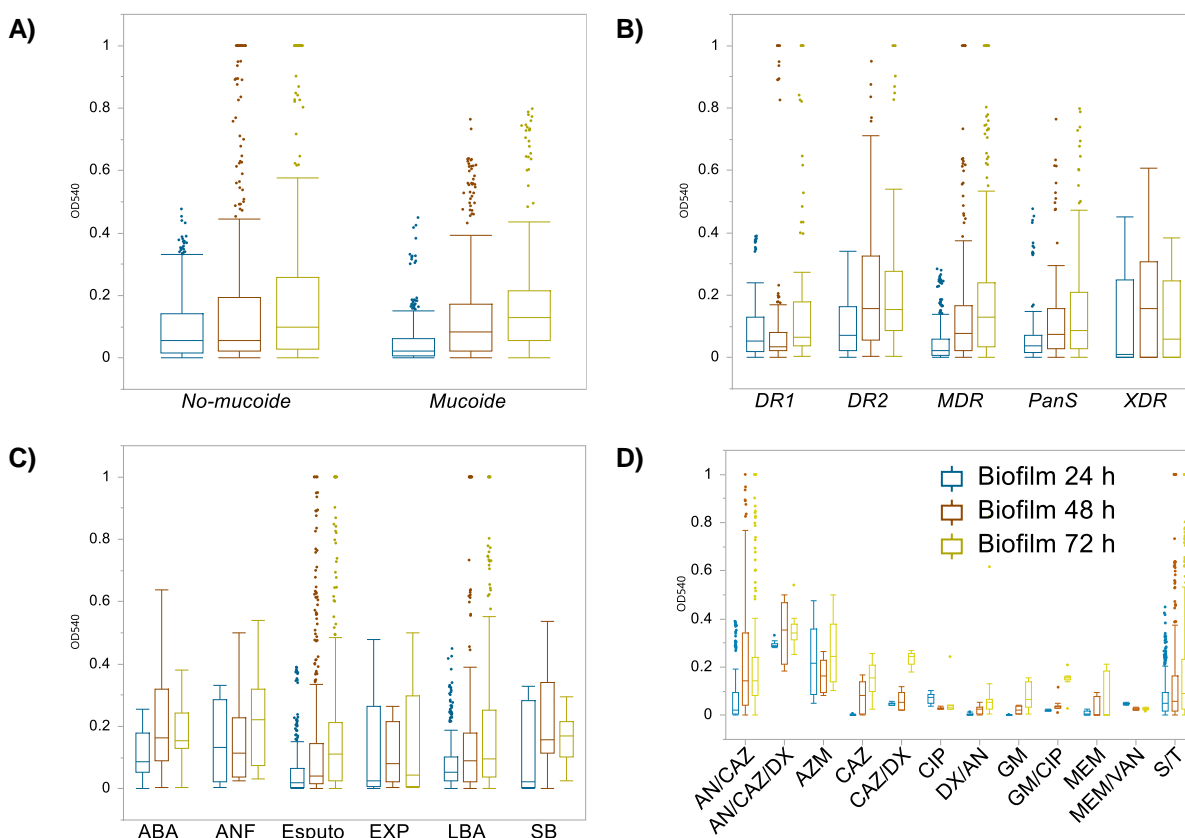


Figura 21. Establecimiento de biopelículas por fenotipo, origen clínico y tratamiento.

Diagramas de caja que ilustran el establecimiento de biopelículas de cepas clínicas de *P. aeruginosa* contrastadas por A) Fenotipo colonial, B) Categoría de resistencia, C) Muestra clínica, D) Tratamiento.

La línea central de las cajas señala la mediana de las absorbancias detectadas, mientras que los puntos indican los valores atípicos.

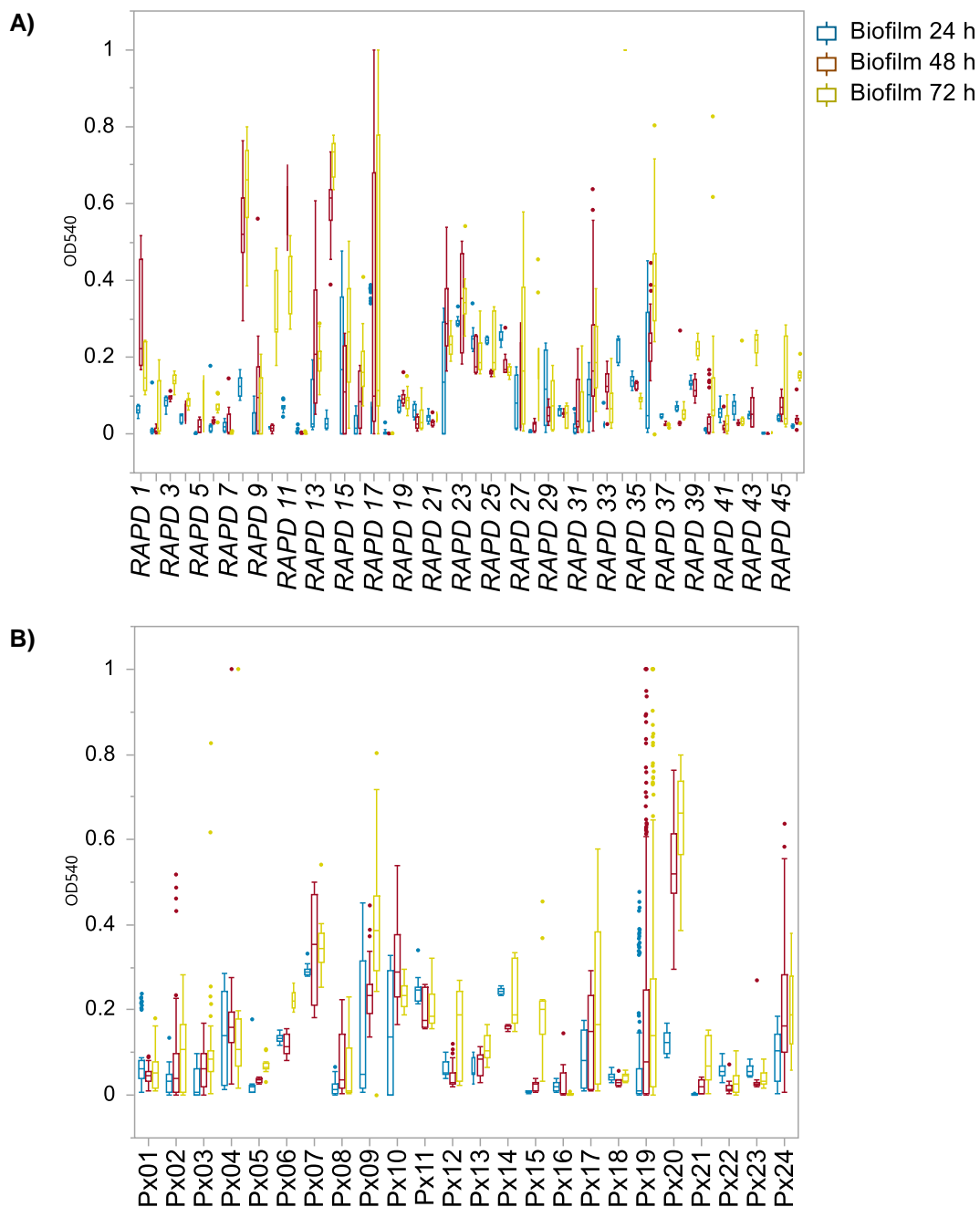


Figura 22. Establecimiento de biopelículas por genotipo y hospedero.

Diagramas de caja que ilustran el establecimiento de biopelículas de cepas clínicas de *P. aeruginosa* contrastadas por A) Agrupación de *RAPD* y B) Hospedero. La línea central de las cajas señala la mediana de las absorbancias detectadas, mientras que los puntos indican los valores atípicos.

La evaluación por genotipo exhibió al *RAPD* 34 (Figura 22-A), como la agrupación con mayor establecimiento de biopelículas a tiempos prolongados (48 h y 72 h), aunque solo alcanzó significancia contra 33 agrupaciones de *RAPD* (Dunn $p=0.0329$ a $p<0.0001$)

para las 48 h y solo hacia 30 agrupaciones para las 72 h (Dunn $p=0.0218$ a $p<0.0001$). Esa agrupación se conformó únicamente por la cepa no-mucoide Pa54ra, aislada de un LBA del paciente Px04 en ausencia de tratamiento y que mostró un perfil *MDR*. Adicionalmente, la comparativa por hospedero (Figura 22-B) mostró en las cepas aisladas del paciente Px20, absorbancias más intensas a tiempos prolongados, alcanzando significancias estadísticas contra las cepas aisladas de 15 hospederos analizadas a las 48 h (Dunn $p=0.0039$ a $p<0.0001$) y 72 h (Dunn $p=0.0057$ a $p<0.0001$). Ese hospedero (Px20) fue infectado por la cepa Pa64m, la cual fue aislada de una muestra de esputo durante su tratamiento con AN/CAZ y mostró un perfil *PanS*.

Ambas cepas (Pa54ra y Pa64m) mostraron los establecimientos de biopelículas mayores a las 72 h. Las absorbancias detectadas en Pa54ra fueron más elevadas que las encontradas en las cepas de 30 agrupaciones de *RAPD* (Dunn $p=0.0218$ a $p<0.0001$) y las cepas de dos esquemas de tratamiento (Dunn $p=0.0249$ a $p=0.0002$), mientras que las observadas en Pa64m fueron mayores al de las cepas de 15 hospederos (Dunn $p=0.0218$ a $p<0.0001$) y las cepas de cinco tratamientos (Dunn $p=0.0173$ a $p<0.0001$). La comparación de sus absorbancias demostró que la cepa Pa54ra estableció más biopelícula a los dos últimos tiempos analizados (Mann-Whitney $p<0.0001$).

Tabla 10. Características de las cepas con establecimiento de biopelículas máximo a las 24 h.

Cepa	Categoría de Resistencia	Agrupación de <i>RAPD</i>	Hospedero	<i>OD</i> ₅₄₀	
				\bar{X}	SD
Pa01r	DR1	29	Px01	0.2165	0.012
Pa06r	MDR	37	Px23	0.0473	0.0037
Pa22r	DR1	42	Px12	0.0724	0.0203
Pa25r	MDR	38	Px23	0.0689	0.0069
Pa54mb	MDR	35	Px04	0.1387	0.0142
Pa65r	DR1	21	Px18	0.0433	0.0103
Pa88ma	XDR	36	Px09	0.3518	0.0525
Pa98rb	MDR	26	Px04	0.2545	0.0173
Pa99rb	DR2	24	Px11	0.2488	0.0339
Pa100r	DR2	25	Px14	0.2447	0.0076
Pa102m	<i>PanS</i>	41	Px22	0.0508	0.0081
Pa102rd	DR1	41	Px22	0.0769	0.0194
Pa102re	<i>PanS</i>	41	Px22	0.0505	0.0143
Pa116ra	DR1	30	Px01	0.0602	0.0092
Pa116rb	DR1	20	Px01	0.0483	0.0079
Pa116rc	<i>PanS</i>	20	Px01	0.0766	0.0068
Pa120rb	MDR	12	Px19	0.0059	0.0015
Pa124ra	XDR	18	Px19	0.0065	0.0084
Pa124rb	XDR	12	Px19	0.0074	0.0071

Pie de tabla: \bar{X} = Media de los valores obtenidos y SD= Desviación estándar.

Posteriormente, las cepas fueron agrupadas de acuerdo al tiempo en que establecieron su máximo establecimiento de biopelículas detectables. Un total de 19 cepas mostraron sus absorbancias máximas a las 24 h (Tabla 10), 20 cepas las presentaron a las 48 h (Tabla 11), de las cuales 19 disminuyeron su establecimiento de biopelículas a las 72 h, mientras una cepa (Pa54ra) exhibió una absorbancia similar a la detectada a las 48 h. Finalmente, 37 cepas desarrollaron más biopelícula a las 72 h (Tabla 12), 31 de las cuales mostraron un comportamiento continuamente ascendente, en contraste a seis cepas cuya absorbancia detectada a las 48 h fue menor a la observada a las 24 h.

Tabla 11. Características de las cepas con establecimiento de biopelículas máximo a las 48 h.

Cepa	Categoría de Resistencia	Agrupación de RAPD	Hospedero	OD ₅₄₀			
				24 h		48 h	
				\bar{X}	SD	\bar{X}	SD
Pa03m	XDR	7	Px16	0.0272	0.0448	0.003	0.0022
Pa17mb	DR2	32	Px24	0.4906	0.1042	0.2819	0.0541
Pa27r	MDR	45	Px02	0.0523	0.0139	0.0294	0.0067
Pa28m	MDR	1	Px02	0.2908	0.1389	0.1655	0.0582
Pa34r	DR2	11	Px19	0.5919	0.074	0.381	0.0807
Pa36ma	XDR	13	Px19	0.4224	0.1049	0.2043	0.057
Pa37ma	DR2	16	Px19	0.1616	0.0144	0.1507	0.0252
Pa50mb	DR1	32	Px24	0.186	0.0219	0.1227	0.0182
Pa53rb	DR2	19	Px03	0.0932	0.009	0.0762	0.0168
Pa54ma	PanS	33	Px04	0.1158	0.0389	0.0419	0.0232
Pa54ra	MDR	34	Px04	1	0	1	0
Pa57r	PanS	33	Px04	0.1402	0.0373	0.1163	0.048
Pa77ma	MDR	31	Px08	0.0131	0.0079	0.0084	0.0031
Pa77mb	DR2	31	Px08	0.0423	0.0193	0.0095	0.0053
Pa77r	MDR	31	Px08	0.155	0.0381	0.1509	0.0503
Pa82mb	XDR	22	Px10	0.2448	0.0594	0.2335	0.0179
Pa83r	XDR	22	Px10	0.3888	0.084	0.2355	0.0348
Pa115rb	DR1	17	Px19	0.9401	0.0604	0.9031	0.163
Pa117mb	MDR	9	Px19	0.1882	0.0412	0.0784	0.0627
Pa120rc	XDR	17	Px19	0.0042	0.0082	0.0016	0.0016

Pie de tabla: \bar{X} = Media de los valores obtenidos y SD= Desviación estándar; **Filas sombreadas**= Cepas que incrementaron o mantuvieron su absorbancia a las 72 h.

Las absorbancias obtenidas en los tres tiempos analizados fueron utilizadas para crear tablas dinámicas que permitieran agrupar a las cepas clínicas en cuatro categorías (I, II, III y IV), basadas en su establecimiento de biopelículas y fungir como variable adicional para la selección de cepas con fenotipos heterogéneos. La composición de las categorías de formación de biopelículas, así como los valores medios y desviaciones estándar de las

absorbancias identificadas en cada cepa, se encuentran detallados en el Anexo 12 (24 h), Anexo 13 (48 h) y Anexo 14 (72 h).

Tabla 12. Características de las cepas con establecimiento de biopelículas máximo a las 72 h.

Cepa	Categoría de Resistencia	Agrupación de RAPD	Hospedero	OD ₅₄₀					
				24 h		48 h		72 h	
				\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD
Pa02m	MDR	46	Px02	0.0204	0.0031	0.0409	0.0256	0.1476	0.0414
Pa12r	DR1	39	Px06	0.1333	0.0098	0.1179	0.0243	0.2236	0.0225
Pa21ma	DR1	10	Px19	0.0161	0.0023	0.0159	0.0092	0.3244	0.1
Pa21mb	DR2	9	Px19	0.0836	0.0083	0.1483	0.0439	0.1658	0.0261
Pa27ma	MDR	44	Px02	0.0027	0.0019	0.0018	0.0011	0.003	0.0017
Pa27mb	MDR	45	Px02	0.044	0.0046	0.0929	0.0168	0.2376	0.0687
Pa29ma	MDR	2	Px02	0.0185	0.0368	0.0102	0.0073	0.0581	0.074
Pa32r	DR2	3	Px13	0.0838	0.0153	0.0953	0.0074	0.1379	0.0181
Pa33ra	DR2	5	Px21	0.0021	0.0007	0.0207	0.0149	0.0798	0.0548
Pa35mb	MDR	14	Px19	0.0292	0.0161	0.5875	0.0902	0.7199	0.0493
Pa36mb	MDR	17	Px19	0.0055	0.0024	0.1186	0.0196	0.1291	0.0243
Pa36mc	MDR	15	Px19	0.0023	0.0014	0.0022	0.0017	0.1182	0.0645
Pa37mb	MDR	16	Px19	0.0038	0.0039	0.0158	0.0116	0.1977	0.1043
Pa47r	MDR	6	Px05	0.03	0.0473	0.0346	0.0053	0.0702	0.0207
Pa50ma	PanS	32	Px24	0.0149	0.0087	0.0527	0.0353	0.1928	0.1065
Pa51mb	MDR	32	Px24	0.0895	0.0255	0.1342	0.0277	0.2071	0.0615
Pa53m	MDR	19	Px03	0.0701	0.0153	0.096	0.0241	0.0974	0.024
Pa58m	PanS	40	Px03	0.0029	0.0019	0.0782	0.0694	0.1483	0.0692
Pa60m	DR1	40	Px03	0.0035	0.0038	0.0284	0.0144	0.0552	0.0369
Pa60r	DR1	40	Px03	0.0064	0.005	0.0173	0.0176	0.156	0.2687
Pa64m	PanS	8	Px20	0.1237	0.0285	0.5279	0.1243	0.6424	0.1223
Pa84rc	MDR	9	Px19	0.0025	0.0009	0.0027	0.002	0.0036	0.0061
Pa88ra	MDR	36	Px09	0.0135	0.0048	0.1813	0.0287	0.4308	0.053
Pa88rb	MDR	36	Px09	0.0486	0.0111	0.2955	0.0815	0.4661	0.2147
Pa91ra	PanS	15	Px19	0.3795	0.0549	0.2321	0.0164	0.393	0.0591
Pa94r	DR2	23	Px07	0.2932	0.0146	0.3392	0.1208	0.351	0.0743
Pa111m	PanS	4	Px13	0.0426	0.0104	0.0541	0.0216	0.0848	0.0126
Pa112ma	DR2	27	Px17	0.0191	0.0063	0.0275	0.0274	0.0393	0.0292
Pa112r	MDR	27	Px17	0.1548	0.0145	0.2404	0.0328	0.4097	0.1091
Pa115m	PanS	17	Px19	0.0084	0.0032	0.0664	0.0227	0.0757	0.0573
Pa115rc	DR2	17	Px19	0.0657	0.0147	0.6285	0.2111	0.6562	0.4105
Pa116m	DR1	29	Px01	0.0217	0.0099	0.0638	0.0144	0.118	0.0438
Pa117ma	MDR	17	Px19	0.0018	0.001	0.0447	0.027	0.118	0.0149
Pa117rc	DR2	9	Px19	0.0029	0.0024	0.0855	0.1501	0.1059	0.0489
Pa120mb	MDR	13	Px19	0.0186	0.0033	0.0801	0.0123	0.187	0.0305
Pa122r	MDR	43	Px12	0.0487	0.0055	0.0594	0.0364	0.2373	0.0279
Pa125r	MDR	28	Px15	0.0086	0.0018	0.0235	0.0118	0.2065	0.1166

Pie de tabla: \bar{X} = Media de los valores obtenidos y SD = Desviación estándar; Filas sombreadas = Cepas con menor absorbancia detectada a las 48 h en contraste a la medición de las 24 h.

Tabla 13. Características de las 30 cepas clínicas de *P. aeruginosa* seleccionadas.

CEPA	Fenotipo colonial	Px	Grupo (RAPD)	Resistencia	Establecimiento de biopelículas						
					24 h		48 h		24h-48h	72 h	
					Media	SD	Media	SD		Media	SD
Pa01r	NM	Px01	29	DR1	0.216	0.012	0.040	0.017	▼	0.036	0.044
Pa06r	NM	Px23	37	MDR	0.047	0.004	0.026	0.004	▼	0.026	0.004
Pa12r	NM	Px06	39	DR1	0.133	0.010	0.118	0.024	▼	0.224	0.022
Pa17mb	M	Px24	32	DR2	0.155	0.028	0.491	0.104	▲	0.282	0.054
Pa21mb	M	Px19	9	DR2	0.084	0.008	0.148	0.044	▲	0.166	0.026
Pa32r	NM	Px13	3	DR2	0.084	0.015	0.095	0.007	▲	0.138	0.018
Pa35mb	M	Px19	14	MDR	0.029	0.016	0.588	0.090	▲	0.720	0.049
Pa36ma	M	Px19	13	XDR	0.123	0.059	0.422	0.105	▲	0.204	0.057
Pa37ma	M	Px19	16	DR2	0.043	0.020	0.162	0.014	▲	0.151	0.025
Pa50mb	M	Px24	32	DR1	0.130	0.033	0.186	0.022	▲	0.123	0.018
Pa51mb	M	Px24	32	MDR	0.090	0.025	0.134	0.028	▲	0.207	0.061
Pa54mb	M	Px04	35	MDR	0.139	0.014	0.129	0.010	▼	0.090	0.013
Pa54ra	NM	Px04	34	MDR	0.225	0.031	1.000	0.000	▲	1.000	0.000
Pa58m	M	Px03	40	PanS	0.003	0.002	0.078	0.069	▲	0.148	0.069
Pa60m	M	Px03	40	DR1	0.003	0.004	0.028	0.014	▲	0.055	0.037
Pa64m	M	Px20	8	PanS	0.124	0.029	0.528	0.124	▲	0.642	0.122
Pa82mb	M	Px10	22	XDR	0.002	0.001	0.245	0.059	▲	0.234	0.018
Pa83r	NM	Px10	22	XDR	0.294	0.017	0.389	0.084	▲	0.235	0.035
Pa88ma	M	Px09	36	XDR	0.352	0.052	0.245	0.025	▼	0.299	0.049
Pa88ra	NM	Px09	36	MDR	0.014	0.005	0.181	0.029	▲	0.431	0.053
Pa88rb	NM	Px09	36	MDR	0.049	0.011	0.296	0.082	▲	0.466	0.215
Pa91ra	NM	Px19	15	PanS	0.380	0.055	0.232	0.016	▼	0.393	0.059
Pa94r	NM	Px07	23	DR2	0.293	0.015	0.339	0.121	▲	0.351	0.074
Pa98rb	NM	Px04	26	MDR	0.254	0.017	0.182	0.034	▼	0.164	0.013
Pa100r	NM	Px14	25	DR2	0.245	0.008	0.161	0.005	▼	0.226	0.075
Pa112r	NM	Px17	27	MDR	0.155	0.015	0.240	0.033	▲	0.410	0.109
Pa115rb	NM	Px19	17	DR1	0.368	0.017	0.940	0.060	▲	0.903	0.163
Pa115rc	NM	Px19	17	DR2	0.066	0.015	0.628	0.211	▲	0.656	0.411
Pa122r	NM	Px12	43	MDR	0.049	0.006	0.059	0.036	▲	0.237	0.028
Pa125r	NM	Px15	28	MDR	0.009	0.002	0.023	0.012	▲	0.206	0.117

Pie de tabla: Px= Paciente; M= Mucoide; NM= No-mucoide. Los colores de las OD_{540} corresponden a su categoría de establecimiento de biopelículas: I, II, III y IV. El símbolo "▲" representa el incremento de biopelícula de las 24 h a las 48 h, mientras "▼" denota su reducción.

La caracterización genotípica y fenotípica de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* fue utilizada para seleccionar 30 cepas (Tabla 13) lo más heterogéneas posibles (cepas aisladas de hospederos diferentes, durante tratamientos distintos, aunado a genotipos, perfiles de resistencia y capacidades de formación de biopelículas heterogéneas), con el objetivo de analizar la interacción de FAM~F23 y el complejo F23~AgNPs contra variantes clínicas diversas de *P. aeruginosa*.

5. Identificación microscópica de cepas clínicas de *P. aeruginosa* con FAM-F23.

La morfología bacilar de las 30 cepas seleccionadas fue visualizada por tinción de Gram y microscopía óptica, identificando 18 cepas con morfologías bacilares tradicionales (Figura 23), 11 cepas coco-bacilares y una cepa identificada como bacilos largos (Figura 24).

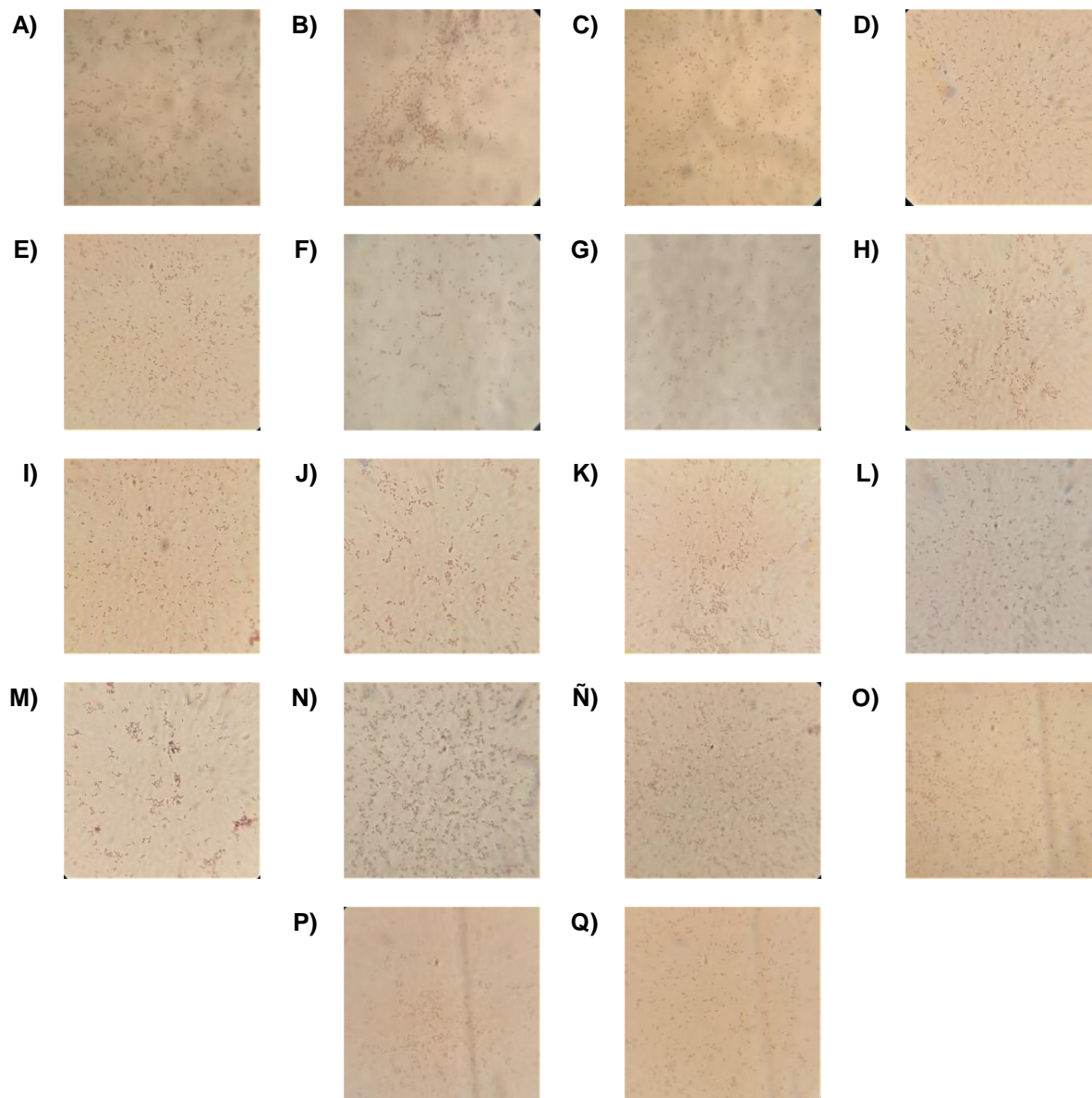


Figura 23. Tinción de Gram de 18 cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

Micrografías de bacilos Gram negativos visualizados a 100X correspondientes a las cepas A) Pa01r, B) Pa12r, C) Pa17mb, D) Pa21mb, E) Pa32r, F) Pa35mb, G) Pa36ma, H) Pa54mb, I) Pa54ra, J) Pa58m, K) Pa60m, L) Pa64m, M) Pa82mb, N) Pa88ra, Ñ) Pa88rb, O) Pa100r, P) Pa115rb y Q) Pa115rc.

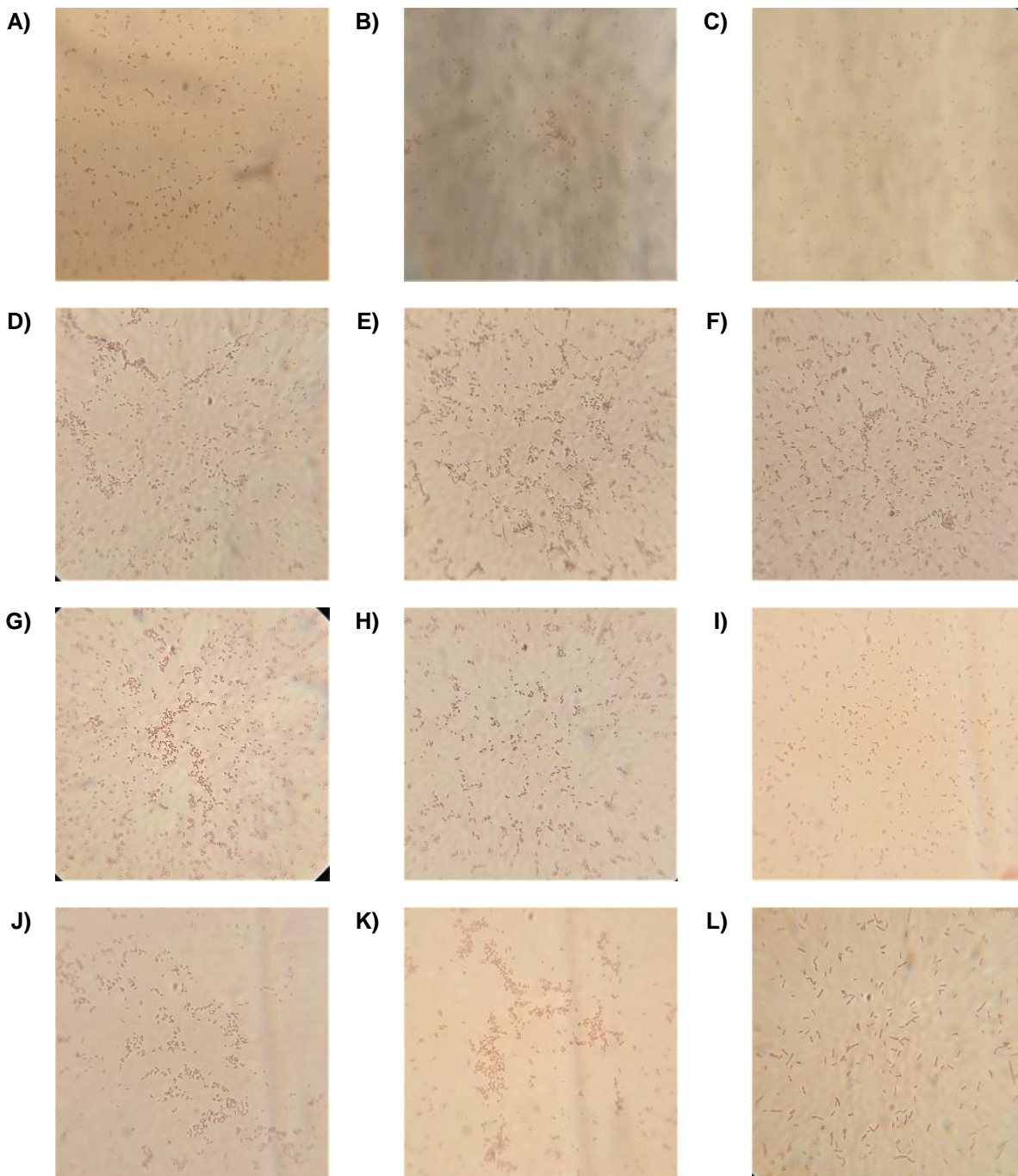


Figura 24. Tinción de Gram de 12 cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

Micrografías de coco-bacilos Gram negativos visualizados a 100X correspondientes a las cepas A) Pa06r, B) Pa50mb, C) Pa51mb, D) Pa83r, E) Pa88ma, F) Pa91ra, G) Pa94r, H) Pa98rb, I) Pa112r, J) Pa122r y K) Pa125r. Asimismo, la visualización de la cepa L) Pa37ma, como bacilos largos.

La fluorescencia de *FAM-F23* fue detectada en las 30 cepas clínicas de *P. aeruginosa*, distinguiendo un rango amplio de intensidades de fluorescencia verde, que fueron desde

12.34±3.675 hasta 42.85±5.718 (Figura 25), identificando un valor general de 26.32±9.07 para las cepas analizadas. Los datos totales de la intensidad de fluorescencia están descritos en el Anexo 15.

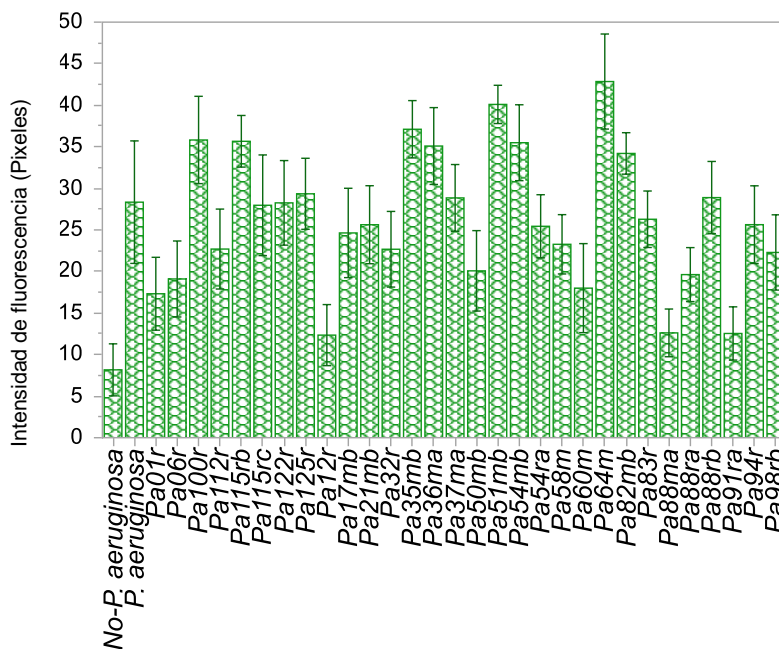


Figura 25. Heterogeneidad de la intensidad de fluorescencia exhibida en las cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

Histograma de la intensidad de fluorescencia detectada en cada cepa clínica de *P. aeruginosa*, así como los conjuntos de cepas de referencia de *P. aeruginosa* y cepas no-*P. aeruginosa*.

Un total de 27 cepas clínicas de *P. aeruginosa* presentaron una intensidad de fluorescencia significativamente superior a la del grupo de cepas no-*P. aeruginosa* (Dunnnett $p < 0.0001$), mientras que las cepas Pa88ma, Pa91ra y Pa12r mostraron significancias ligeramente menores (Dunnnett $p = 0.0001$, $p = 0.0002$ y $p = 0.0005$, respectivamente). También se identificaron ocho cepas con fluorescencias mayores a las del grupo de cepas de referencia de *P. aeruginosa* (Dunnnett $p < 0.0001$) (Figura 26 A al H), nueve cepas con intensidades similares (Figura 26-I a la P) y 13 cepas con intensidades inferiores a ese mismo grupo control (Dunnnett $p = 0.0040$ a $p < 0.0001$) (Figura 27).

La comparación de la intensidad de fluorescencia basada en el fenotipo colonial mostró en las cepas mucoides, niveles de fluorescencia similares (Figura 28-A, Tabla 14) a las exhibidas por el grupo de cepas de referencia de *P. aeruginosa* (valores indicados en la descripción de la Figura 3-B), mientras que el fenotipo no-mucoide exhibió intensidades

menores, pero aun así, significativamente superiores a las detectadas en el grupo de cepas no-*P. aeruginosa*.

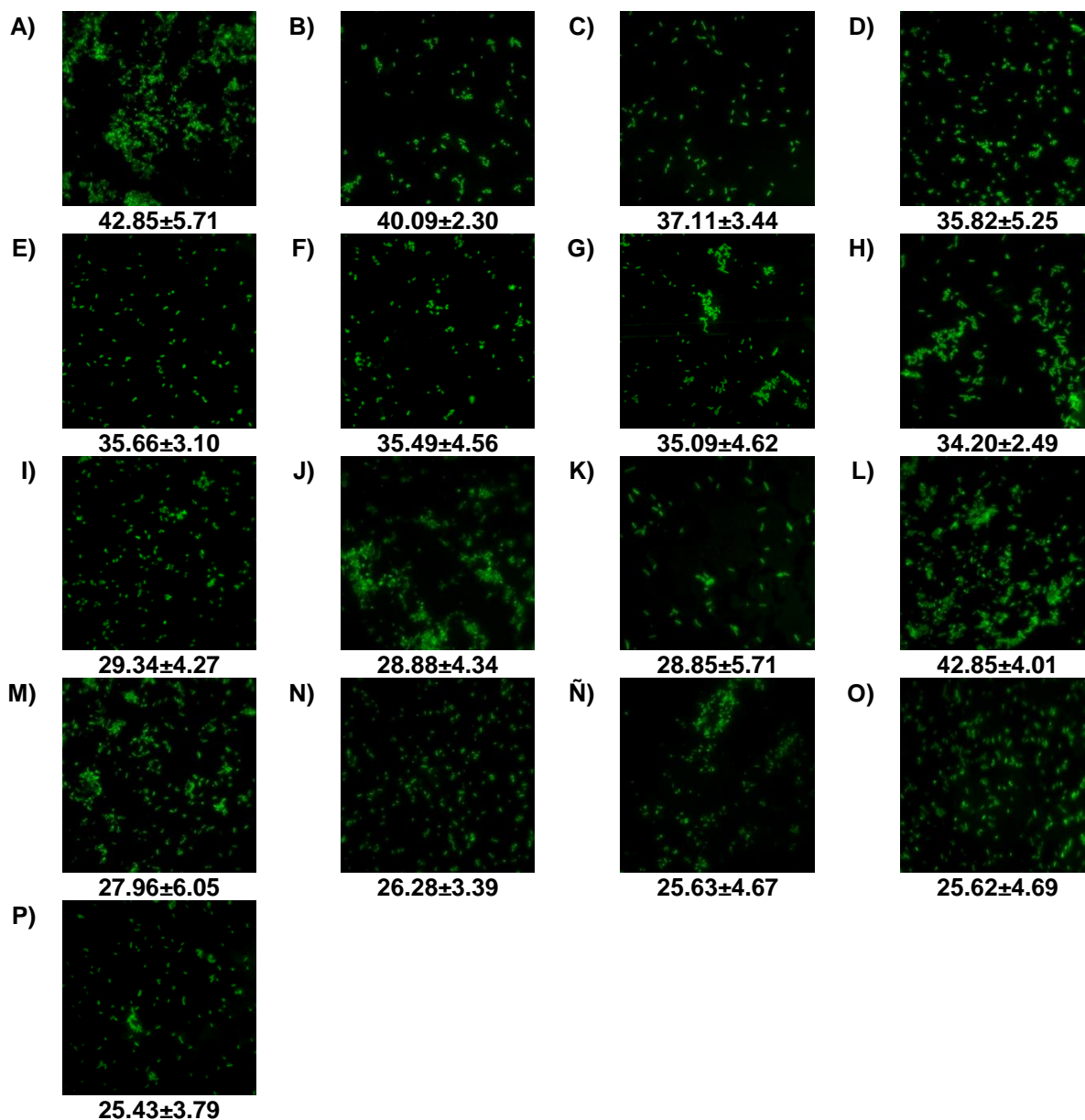


Figura 26. Cepas clínicas de *P. aeruginosa* con fluorescencias \geq a las cepas de referencia de *P. aeruginosa*.

Micrografías de cepas clínicas de *P. aeruginosa* visualizadas con el objetivo de 100X mediante microscopía de fluorescencia, así como el valor de la media y desviación estándar de la intensidad de fluorescencia correspondientes a A) Pa64m, B) Pa51mb, C) Pa35mb, D) Pa100r, E) Pa115rb, F) Pa54mb, G) Pa36ma, H) Pa82mb, I) Pa125r, J) Pa88rb, K) Pa37ma, L) Pa122r, M) Pa115rc, N) Pa83r, Ñ) Pa94r, O) Pa21mb y P) Pa54ra.

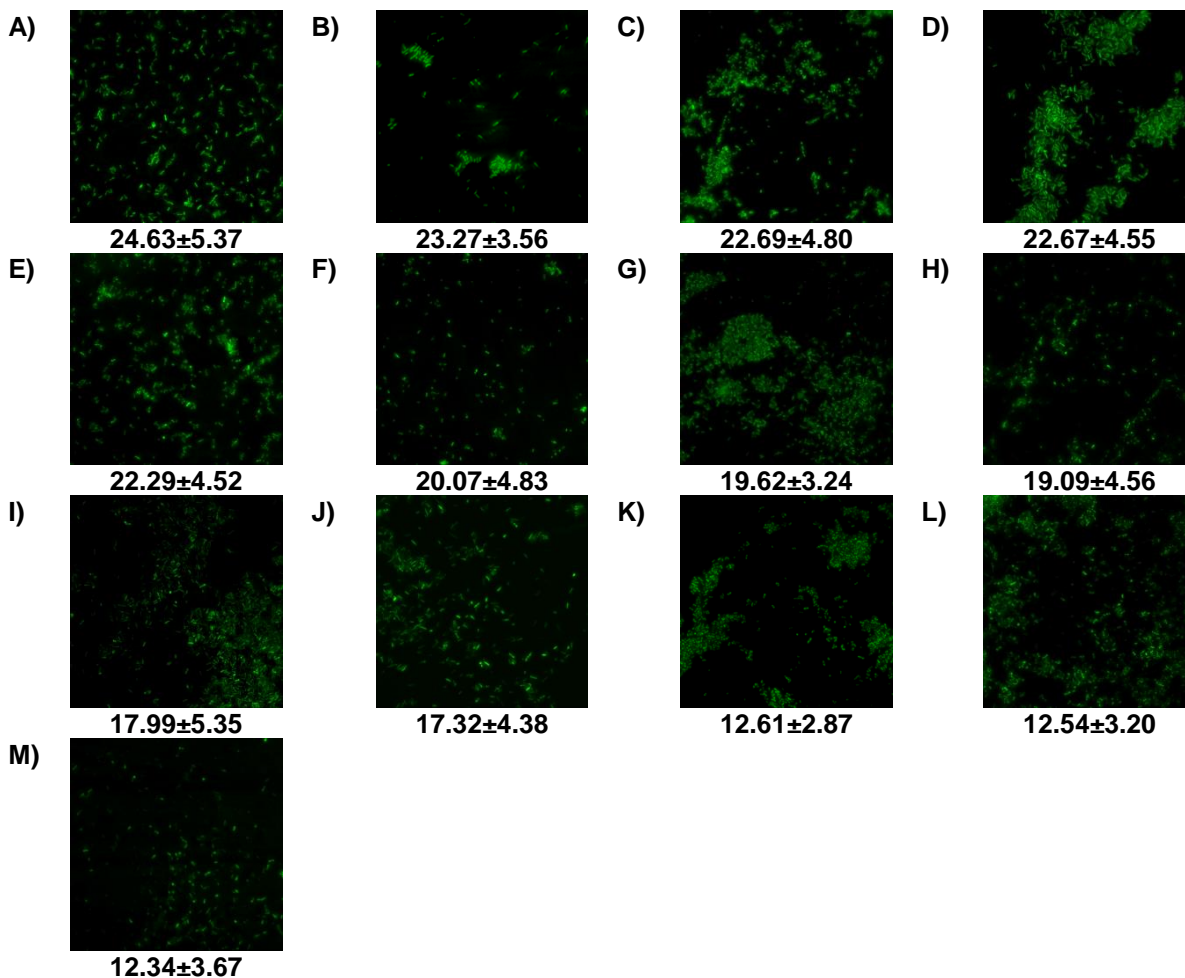


Figura 27. Cepas clínicas de *P. aeruginosa* con menor intensidad de fluorescencia que las identificadas en cepas de referencia de *P. aeruginosa*.

Micrografías de cepas clínicas de *P. aeruginosa* visualizadas con el objetivo de 100X mediante microscopía de fluorescencia, así como la media y desviación estándar de la intensidad de fluorescencia correspondientes a las cepas A) Pa17mb, B) Pa58m, C) Pa112r, D) Pa32r, E) Pa98rb, F) Pa50mb, G) Pa88ra, H) Pa06r, I) Pa60m, J) Pa01r, K) Pa88ma, L) Pa91ra y M) Pa12r, las cuales exhibieron fluorescencias menores que las cepas de referencia de *P. aeruginosa*

Todas las categorías de resistencia mostraron intensidades de fluorescencia significativamente mayores a las del grupo de cepas no-*P. aeruginosa*, distinguiendo a la categoría *PanS* como la agrupación más heterogénea, que comprendió desde la cepa clínica con mayor fluorescencia (Pa64m, intensidad de fluorescencia: 42.85±5.71), hasta una de las cepas con menor fluorescencia (Pa91ra, 12.54±3.20), así como a la categoría *DR1* como el

grupo con niveles de fluorescencia significativamente menores respecto al grupo de cepas de referencia de *P. aeruginosa* (Figura 28-B, Tabla 14).

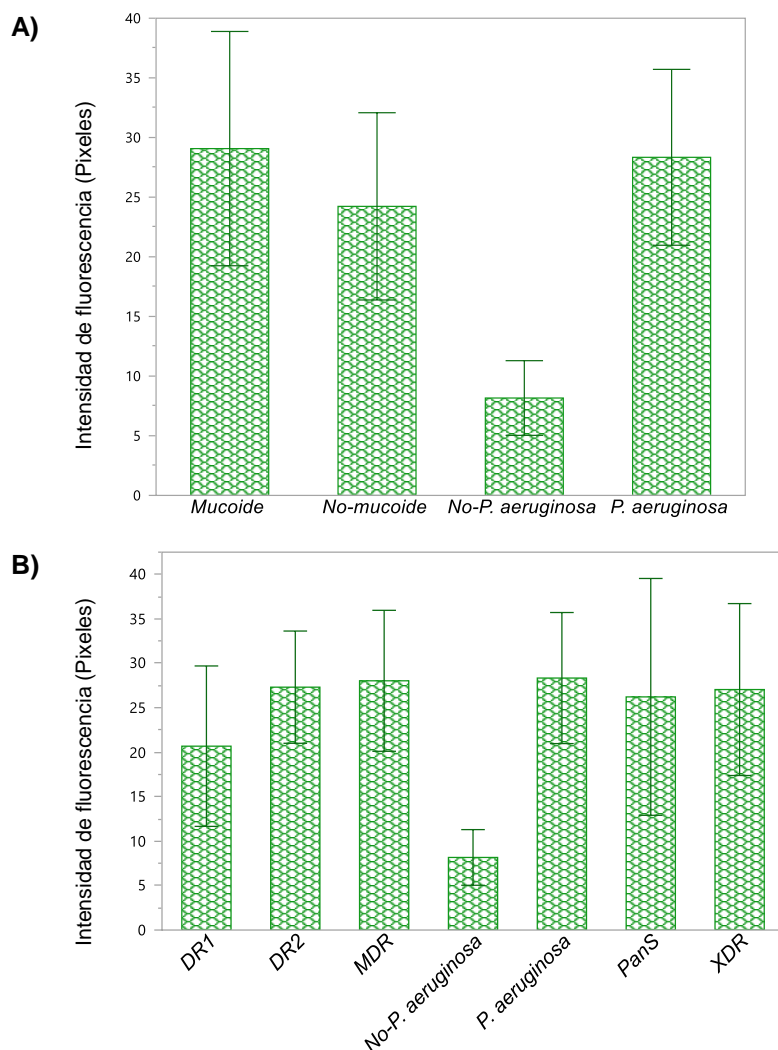


Figura 28. Comparación de fluorescencia por fenotipo colonial y categoría de resistencia.

Histograma del contraste entre la fluorescencia detectada en A) cepas mucoides y no-mucoides, B) por categoría de resistencia, así como su comparación con los grupos control.

En cuanto al establecimiento de biopelículas, las cuatro categorías (I, II, III y IV) presentaron fluorescencias significativamente mayores al grupo no-*P. aeruginosa* (Tabla 14) a los tres tiempos analizados (24 h, 48 h y 72 h), distinguiendo fluorescencias tan heterogéneas como el propio establecimiento de biopelículas. A las 24 h, las cepas con mayor formación de biopelículas (categoría IV) mostraron intensidades de fluorescencia significativamente menores a las del grupo de cepas de referencia de *P. aeruginosa* (Figura 29-A). A las 48 h

(Figura 29-B), las fluorescencias estadísticamente menores fueron detectadas en las cepas con menor establecimiento de biopelículas (categoría I), mientras que a las 72 h (Figura 29-C), las fluorescencias significativamente inferiores correspondieron a las cepas integradas en la categoría II del establecimiento de biopelículas.

Tabla 14. Medidas de tendencia central y significancia de la intensidad de fluorescencia, basada en comparaciones diversas.

Contraste	Agrupación	\bar{X}	SD	Intensidad de fluorescencia	
				Contrastes por especie	
				<i>P. aeruginosa</i> Valor de p	No- <i>P. aeruginosa</i> Valor de p
Fenotipo colonial	Mucoide	29.07	9.81	0.8765	<0.0001
	No-mucoide	24.22	7.84	0.0001	<0.0001
Categoría de resistencia	<i>PanS</i>	26.22	13.31	0.6064	<0.0001
	<i>DR1</i>	20.67	9.02	<.0001*	<0.0001
	<i>DR2</i>	27.31	6.31	0.9582	<0.0001
	<i>MDR</i>	28.03	7.92	0.9999	<0.0001
	<i>XDR</i>	27.04	9.66	0.9226	<0.0001
Biopelículas 24 h	I	27.36	7.65	0.9178	<0.0001
	II	27.60	10.93	0.9823	<0.0001
	III	25.22	8.13	0.0865	<0.0001
	IV	22.55	9.56	<0.0001	<0.0001
Biopelículas 48 h	I	24.01	8.93	<0.0001	<0.0001
	II	28.11	5.85	0.9999	<0.0001
	III	35.98	8.03	<0.0001	<0.0001
	IV	30.55	6.20	0.05425	<0.0001
Biopelículas 72 h	I	26.34	8.58	0.2072	<0.0001
	II	20.95	7.20	<0.0001	<0.0001
	III	35.98	8.03	<0.0001	<0.0001
	IV	30.55	6.20	0.5219	<0.0001
Muestra clínica	ABA	27.71	7.68	0.9988	<0.0001
	ANF	18.98	7.89	<0.0001	<0.0001
	Espuito	26.61	9.66	0.5818	<0.0001
	LBA	27.31	8.96	0.9498	<0.0001
	SB	24.77	3.77	0.1453	<0.0001
Tratamiento	AN/CAZ	30.50	10.14	0.4150	<0.0001
	AN/CAZ/DX	25.63	4.67	0.8335	<0.0001
	AZM	17.60	6.42	<0.0001	<0.0001
	CAZ	23.27	3.56	0.0704	<0.0001
	CAZ/DX	28.25	5.08	1.0000	<0.0001
	DX/AN	17.99	5.35	<0.0001	<0.0001
	MEM/VAN	19.09	4.56	<0.0001	<0.0001
	S/T	26.12	8.07	0.3146	<0.0001

Pie de tabla: \bar{X} = Media; SD= Desviación estándar; Las significancias se obtuvieron por medio de la prueba de Tukey-Kramer, indicando en **color negro**= Ausencia de significancia estadística y en **color rojo**= Diferencia significativa pronunciada.

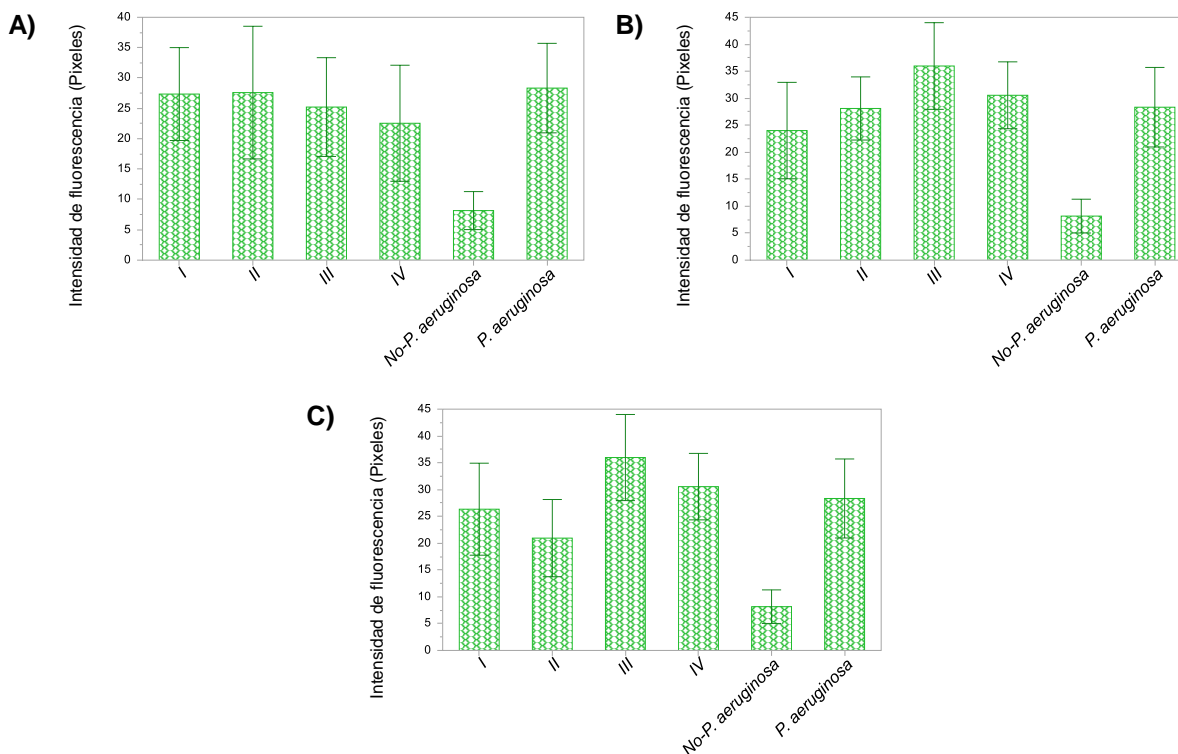


Figura 29. Comparación de la intensidad de fluorescencia mediante su agrupación por establecimiento de biopelículas.

Histogramas de comparación de los niveles de fluorescencia identificada en cepas agrupadas de acuerdo a su establecimiento de biopelículas a las A) 24 h, B) 48 h y C) 72 h, comparadas con ambos grupos de cepas control.

Los contrastes adicionales basados en el tipo de secreción respiratoria, antibioticoterapia utilizada y hospedero, señalaron fluorescencias significativamente más intensas a las identificadas en el grupo de cepas no-*P. aeruginosa* (Figura 30-A, B y D; Tabla 14 y Tabla 15), con excepción de la cepa Pa91ra, aislada de una EXP del hospedero Px19 (Tukey-Kramer $p=0.1642$), aunque al agruparla como “esputo”, la significancia fue recuperada.

Por último, todas las agrupaciones de *RAPD* mostraron intensidades significativamente superiores al grupo de cepas no-*P. aeruginosa* (Figura 30-C, Tabla 15), a excepción de las cepas no-mucoides integradas en los grupos *RAPD* 15 (Pa91ra) y *RAPD* 39 (Pa12r) de los hospederos Px19 y Px06, respectivamente. La cepa Pa91ra fue aislada de un esputo adquirido durante el tratamiento del hospedero con AZM y exhibió un perfil *PanS*, mientras que la cepa Pa12r fue aislada de un ANF durante un esquema terapéutico basado en AN/CAZ y que presentó una categoría de resistencia *DR1*.

Tabla 15. Medidas de tendencia central y significancia de la intensidad de fluorescencia, basada en la comparación por agrupación de *RAPD* y hospedero.

Contraste	Agrupación	Intensidad de fluorescencia			
		\bar{X}	SD	Contrastes por especie	
				<i>P. aeruginosa</i> Valor de <i>p</i>	No- <i>P. aeruginosa</i> Valor de <i>p</i>
RAPD	3	22.67	4.55	0.0009	<0.0001
	8	42.85	5.71	<0.0001	<0.0001
	9	25.62	4.69	0.8638	<0.0001
	13	35.09	4.62	<0.0001	<0.0001
	14	37.11	3.44	<0.0001	<0.0001
	15	12.54	3.20	<0.0001	0.0598
	16	28.85	4.01	1.0000	<0.0001
	17	31.81	6.15	0.0571	<0.0001
	22	30.24	4.96	0.9571	<0.0001
	23	25.63	4.67	0.8670	<0.0001
	25	35.82	5.25	<0.0001	<0.0001
	26	22.29	4.52	0.0002	<0.0001
	27	22.69	4.80	0.0010	<0.0001
	28	29.34	4.27	1.0000	<0.0001
	29	17.32	4.38	<0.0001	<0.0001
	32	28.27	9.64	1.0000	<0.0001
	34	25.43	3.79	0.7714	<0.0001
	35	35.49	4.56	<0.0001	<0.0001
36	20.37	7.56	<0.0001	<0.0001	
37	19.09	4.56	<0.0001	<0.0001	
39	12.34	3.67	<0.0001	0.0992	
40	20.63	5.23	<0.0001	<0.0001	
43	28.25	5.08	1.0000	<0.0001	
Paciente	Px01	17.32	4.38	<0.0001	<0.0001
	Px02	20.63	5.23	<0.0001	<0.0001
	Px03	27.73	7.08	1.0000	<0.0001
	Px06	18.98	7.89	<0.0001	<0.0001
	Px07	20.37	7.56	<0.0001	<0.0001
	Px08	30.24	4.96	0.9762	<0.0001
	Px09	28.25	5.08	1.0000	<0.0001
	Px11	35.82	5.25	<0.0001	<0.0001
	Px12	29.34	4.27	1.0000	<0.0001
	Px13	22.68	4.64	0.0002	<0.0001
	Px14	29.53	9.33	0.9975	<0.0001
	Px15	42.85	5.71	<0.0001	<0.0001
	Px17	30.08	10.77	0.9901	<0.0001
	Px19	25.62	4.69	0.9288	<0.0001
Px23	19.09	4.56	<0.0001	<0.0001	
Px24	24.63	5.37	1.0000	<0.0001	

Pie de tabla: \bar{X} = Media; SD= Desviación estándar; Las significancias se obtuvieron por medio de la prueba de Tukey-Kramer, indicando en **color negro**= Ausencia de significancia estadística y en **color rojo**= Diferencia significativa pronunciada.

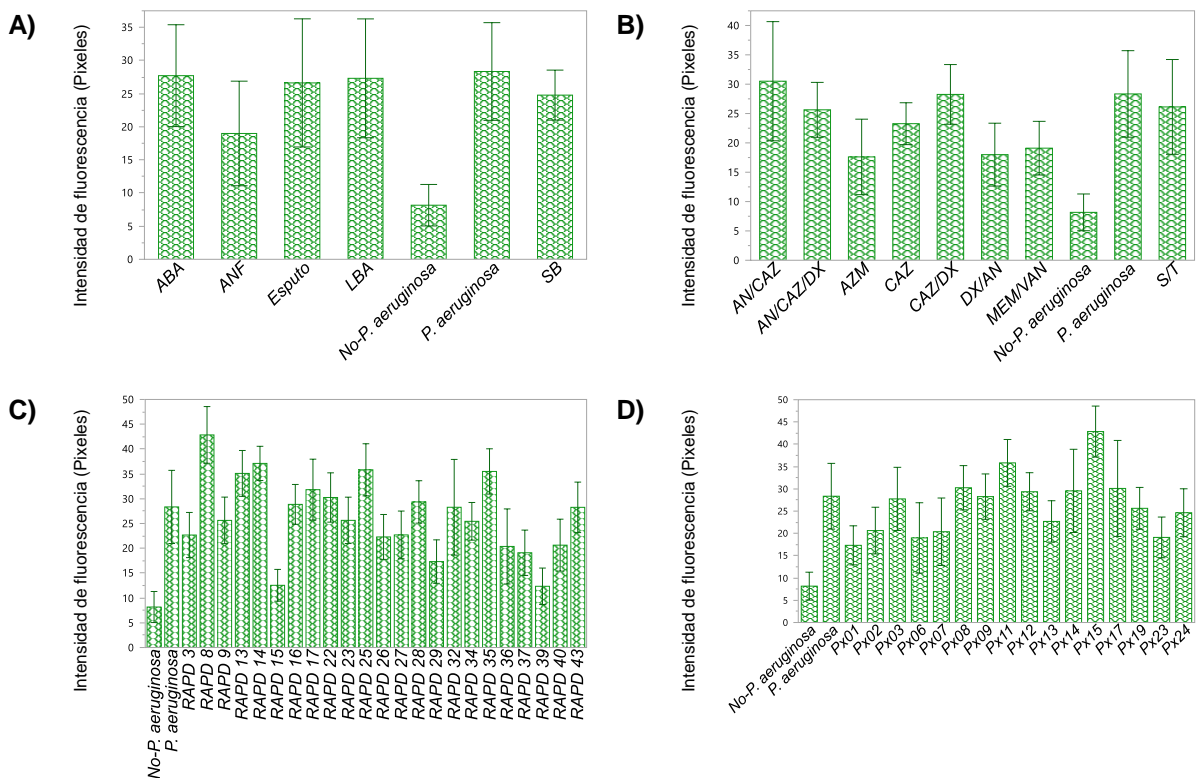


Figura 30. Comparación múltiple de la intensidad de fluorescencia de las cepas agrupadas bajo cuatro argumentos distintos.

Histogramas de la intensidad de fluorescencia comparadas por A) tipo de secreción respiratoria, B) tratamiento del hospedero, C) agrupación de *RAPD* y D) hospedero, así como su contraste con los grupos de cepas control.

6. Reconocimiento de cepas clínicas de *P. aeruginosa* con el complejo F23~AgNPs.

Los datos de las absorbancias (OD_{402}) obtenidas del sobrenadante 1 de los ensayos de interacción, cuyos valores elevados indican una mayor concentración de F23~AgNPs en solución, correspondientes a la deficiencia de reconocimiento del complejo hacia una cepa determinada, permitieron identificar a una cepa clínica de *P. aeruginosa* (Pa54mb) con valores de OD_{402} (0.017 ± 0.017) estadísticamente superiores (Dunnett $p=0.0087$) al grupo de cepas no-*P. aeruginosa* (0.012 ± 0.002), 22 cepas con absorbancias equivalentes a ese mismo grupo control y únicamente siete cepas clínicas con absorbancias significativamente menores (Pa06r y Pa115rc, Dunnett $p=0.0499$; Pa17mb, Dunnett $p=0.0297$; Pa12r, Dunnett $p=0.0227$; Pa32r y Pa50mb, Dunnett $p=0.0297$ y Pa01r $p<0.0001$) (Figura 31). Los datos totales de las absorbancias identificadas en el sobrenadante 1 de los ensayos de interacción están detallados en el Anexo 16.

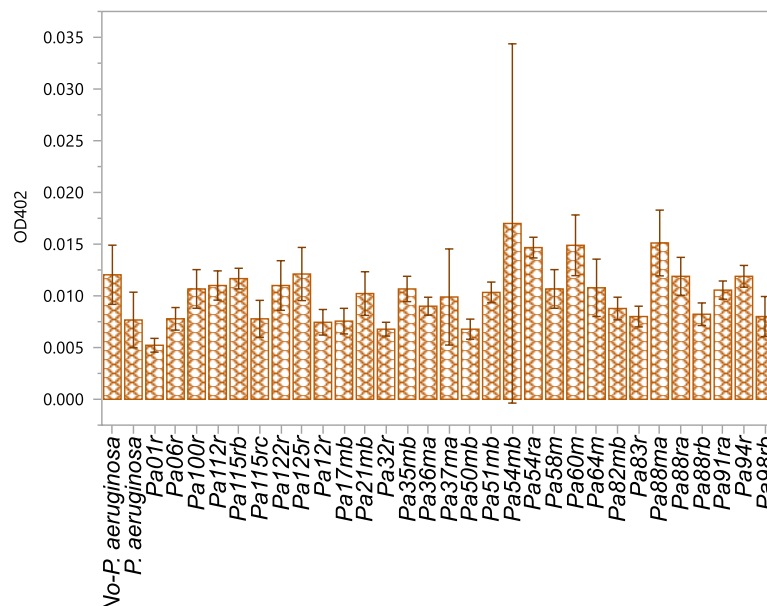


Figura 31. Absorbancias identificadas en el sobrenadante 1 de los ensayos de interacción.

Histograma de las absorbancias detectadas en el primer sobrenadante de los ensayos de interacción, correspondientes al complejo F23~AgNPs en solución, resultantes de su reconocimiento inicial hacia cepas clínicas de *P. aeruginosa*, así como su contraste con las absorbancias identificadas en los conjuntos de cepas de referencia de *P. aeruginosa* y cepas no-*P. aeruginosa*.

Tabla 16. Medidas de tendencia central y significancia de la absorbancia de las cepas clínicas agrupadas por fenotipo colonial, categoría de resistencia y tipo de muestra clínica.

Contraste	Agrupación	\bar{X}	SD	OD ₄₀₂ Contrastes por especie	
				<i>P. aeruginosa</i>	No- <i>P. aeruginosa</i>
				Valor de <i>p</i>	Valor de <i>p</i>
Fenotipo colonial	Mucoide	0.010	0.005	0.0017	0.5704
	No-mucoide	0.009	0.002	0.0919	0.0346
Categoría de resistencia	<i>PanS</i>	0.010	0.001	0.1082	0.8854
	<i>DR1</i>	0.009	0.003	0.7276	0.0732
	<i>DR2</i>	0.009	0.002	0.6338	0.0547
	<i>MDR</i>	0.011	0.005	0.0023	0.9560
	<i>XDR</i>	0.010	0.003	0.1874	0.5967
Muestra clínica	ABA	0.008	0.002	0.9967	0.0159
	ANF	0.009	0.002	0.6725	0.4721
	Espuito	0.009	0.002	0.2100	0.1148
	LBA	0.011	0.006	0.0002	0.9997
	SB	0.009	0.002	0.8295	0.3072

Pie de tabla: \bar{X} = Media; SD= Desviación estándar; Las significancias se obtuvieron por medio de la prueba de Tukey-Kramer, indicando en **color negro**= Ausencia de significancia estadística; en **color anaranjado**= Diferencia significativa y en **color rojo**= Diferencia significativa pronunciada.

La evaluación del reconocimiento de F23~AgNPs hacia las cepas clínicas basada en el fenotipo colonial, señaló absorbancias menores en las cepas no-mucoides, cuyos valores fueron semejantes a los encontrados en el conjunto de cepas de referencia de *P. aeruginosa* ($OD_{402} 0.007 \pm 0.002$), similar al contraste realizado con las absorbancias provenientes de cepas mucoides, el cual tampoco exhibió significancia estadística (Tukey-Kramer $p=0.0826$), a pesar de que estas últimas alcanzaron valores significativamente superiores a ese conjunto de cepas control. Sin embargo, sólo las cepas no-mucoides evidenciaron absorbancias significativamente menores a las identificadas en el conjunto de cepas no-*P. aeruginosa* (Figura 32-A, Tabla 16).

El análisis por categoría de resistencia distinguió en las cepas con perfil *MDR*, absorbancias significativamente superiores a los datos provenientes del conjunto de cepas de referencia de *P. aeruginosa*, mientras que los otros perfiles de resistencia exhibieron absorbancias equivalentes a las encontradas en ese grupo de cepas control. Al contrastar los valores de todos los perfiles de resistencia contra los datos obtenidos del conjunto de cepas no-*P. aeruginosa*, se identificó ausencia de significancia estadística en cada una de ellas (Figura 32-B, Tabla 16), pese a que la evaluación por tipo de muestra clínica, vislumbró absorbancias significativamente menores en cepas aisladas de ABA (Pa17mb, Pa32r, Pa100r), las cuales se distinguieron por mostrar un perfil *DR2* (Figura 32-C, Tabla 16).

En paralelo, los análisis comparativos de las absorbancias realizadas por hospedero (Figura 32-D, Tabla 17) y agrupación de *RAPD* (Figura 32-E, Tabla 17), señalaron absorbancias significativamente menores en las cepas aisladas de los hospederos Px01 (Pa01r), Px13 (Pa32r) y Px24 (Pa50mb y Pa51mb), cuyas cepas fueron agrupadas por similitud genética en los perfiles *RAPD* 29, *RAPD* 3 y *RAPD* 32, respectivamente.

Ambas cepas aisladas del Px24 y pertenecientes a la agrupación *RAPD* 32, fueron identificadas de una muestra de esputo (Pa50mb) y de un LBA (Pa51mb), ostentan perfiles de resistencia diferentes (*DR1* y *MDR*, respectivamente), pero comparten la característica de ser aisladas durante el tratamiento del hospedero con AN/CAZ. Estas cepas en conjunto con otras siete cepas aisladas bajo el mismo esquema de tratamiento, pero con características fenotípicas y genotípicas distintas (detalladas en el párrafo siguiente), dos cepas identificadas durante el tratamiento con AZM (Pa32r y Pa91ra) y una cepa aislada durante la terapia con MEM/VAN (Pa06r), constituyeron las categorías terapéuticas que exhibieron las absorbancias menores, aunque sólo el conjunto de cepas bajo tratamiento AN/CAZ alcanzaron significancia estadística (Figura 32-F, Tabla 18).

Tabla 17. Medidas de tendencia central y significancia de la absorbancia de las cepas clínicas agrupadas por hospedero y agrupación de RAPD.

Contraste	Agrupación	\bar{X}	SD	OD_{402} Contrastes por especie	
				<i>P. aeruginosa</i>	No- <i>P. aeruginosa</i>
				Valor de p	Valor de p
Hospedero	Px01	0.005	0.0006	0.9718	0.0007
	Px03	0.012	0.0032	0.0020	1.0000
	Px04	0.013	0.0104	<.0001	0.9996
	Px06	0.007	0.0012	1.0000	0.2560
	Px07	0.011	0.0010	0.2739	1.0000
	Px09	0.011	0.0035	0.0128	1.0000
	Px10	0.008	0.0010	1.0000	0.1467
	Px12	0.011	0.0023	0.7051	1.0000
	Px13	0.006	0.0006	1.0000	0.0413
	Px14	0.010	0.0018	0.8463	1.0000
	Px15	0.012	0.0025	0.1951	1.0000
	Px17	0.011	0.0014	0.7051	1.0000
	Px19	0.009	0.0023	0.4413	0.6415
	Px20	0.010	0.0027	0.8041	1.0000
	Px23	0.007	0.0010	1.0000	0.2596
Px24	0.008	0.0018	1.0000	0.0306	
RAPD	3	0.006	0.0006	1.0000	0.0468
	8	0.010	0.0027	0.8821	1.0000
	9	0.010	0.0021	0.9851	0.9999
	13	0.009	0.0008	1.0000	0.9048
	14	0.010	0.0012	0.9149	1.0000
	15	0.010	0.0008	0.941	1.0000
	16	0.009	0.0046	0.9977	0.9986
	17	0.009	0.0024	0.9816	0.9326
	22	0.008	0.0010	1.0000	0.1750
	23	0.011	0.0010	0.3293	1.0000
	25	0.010	0.0018	0.9149	1.0000
	26	0.008	0.0019	1.0000	0.4222
	27	0.011	0.0014	0.796	1.0000
	28	0.012	0.0025	0.2341	1.0000
	29	0.005	0.0006	0.9915	0.0006
	32	0.008	0.0018	1.0000	0.0341
	34	0.014	0.0010	0.0004*	0.9789
	35	0.017	0.0173	<.0001*	0.0893
	36	0.011	0.0035	0.0137*	1.0000
37	0.007	0.0010	1.0000	0.3121	
39	0.007	0.0012	1.0000	0.1820	
40	0.012	0.0032	0.0019	1.0000	
43	0.011	0.0023	0.7960	1.0000	

Pie de tabla: \bar{X} = Media; SD= Desviación estándar; Las significancias se obtuvieron por medio de la prueba de Tukey-Kramer, indicando en **color negro**= Ausencia de significancia estadística; en **color anaranjado**= Diferencia significativa y en **color rojo**= Diferencia significativa pronunciada.

Tabla 18. Medidas de tendencia central y significancia de la absorbancia de las cepas clínicas agrupadas por tratamiento, establecimiento de biopelículas e intensidad de fluorescencia.

Contraste	Agrupación	\bar{X}	SD	OD_{402} Contrastes por especie	
				<i>P. aeruginosa</i>	No- <i>P. aeruginosa</i>
				Valor de <i>p</i>	Valor de <i>p</i>
Tratamiento	AN/CAZ	0.008	0.0020	0.9145	0.0217
	AN/CAZ/DX	0.011	0.0010	0.1666	1.0000
	AZM	0.008	0.0020	0.9983	0.1566
	CAZ	0.010	0.0018	0.6421	0.9968
	CAZ/DX	0.011	0.0023	0.4904	0.9997
	DX/AN	0.014	0.0029	0.0002*	0.7068
	MEM/VAN	0.007	0.0010	1.0000	0.1575
	S/T	0.010	0.0057	0.0076	0.9367
Biopelículas 24 h	I	0.010	0.0029	0.0726	0.2270
	II	0.010	0.0072	0.1686	0.2421
	III	0.010	0.0038	0.4266	0.2112
	IV	0.011	0.0028	0.0030	0.9919
Biopelículas 48 h	I	0.010	0.0050	0.0240	0.3184
	II	0.009	0.0018	0.8015	0.0247
	III	0.010	0.0024	0.4295	0.3121
	IV	0.013	0.0018	0.0002	0.9449
Biopelículas 72 h	I	0.010	0.0051	0.1655	0.0695
	II	0.011	0.0028	0.0093	0.8283
	III	0.010	0.0024	0.4299	0.3125
	IV	0.013	0.0018	0.0002	0.9450
Intensidad de fluorescencia (FAM~F23)	Mayor	0.011	0.0064	0.0024	0.8591
	Similar	0.010	0.0030	0.0246	0.3997
	Menor	0.009	0.0034	0.2271	0.0366

Pie de tabla: \bar{X} = Media; SD= Desviación estándar; Las significancias se obtuvieron por medio de la prueba de Tukey-Kramer, indicando en **color negro**= Ausencia de significancia estadística; en **color anaranjado**= Diferencia significativa y en **color rojo**= Diferencia significativa pronunciada.

El conjunto de cepas aisladas de terapia con AN/CAZ se conformó por las cepas Pa50mb y Pa51mb, descritas anteriormente, una cepa *PanS* aislada de una muestra de esputo del Px20 (Pa64m), una cepa *DR2* aislada de una muestra de esputo del Px19 (Pa115rc), dos cepas *DR1*, la primera aislada de un ANF del Px06 (Pa12r) y la segunda aislada de un esputo del Px19 (Pa115rb), además de tres cepas *XDR*, dos de ellas aisladas del Px10 de dos tipos de muestra distintos (Pa82mb, de un esputo y Pa83r de una SB) y una aislada de una muestra de esputo del Px19 (Pa36ma).

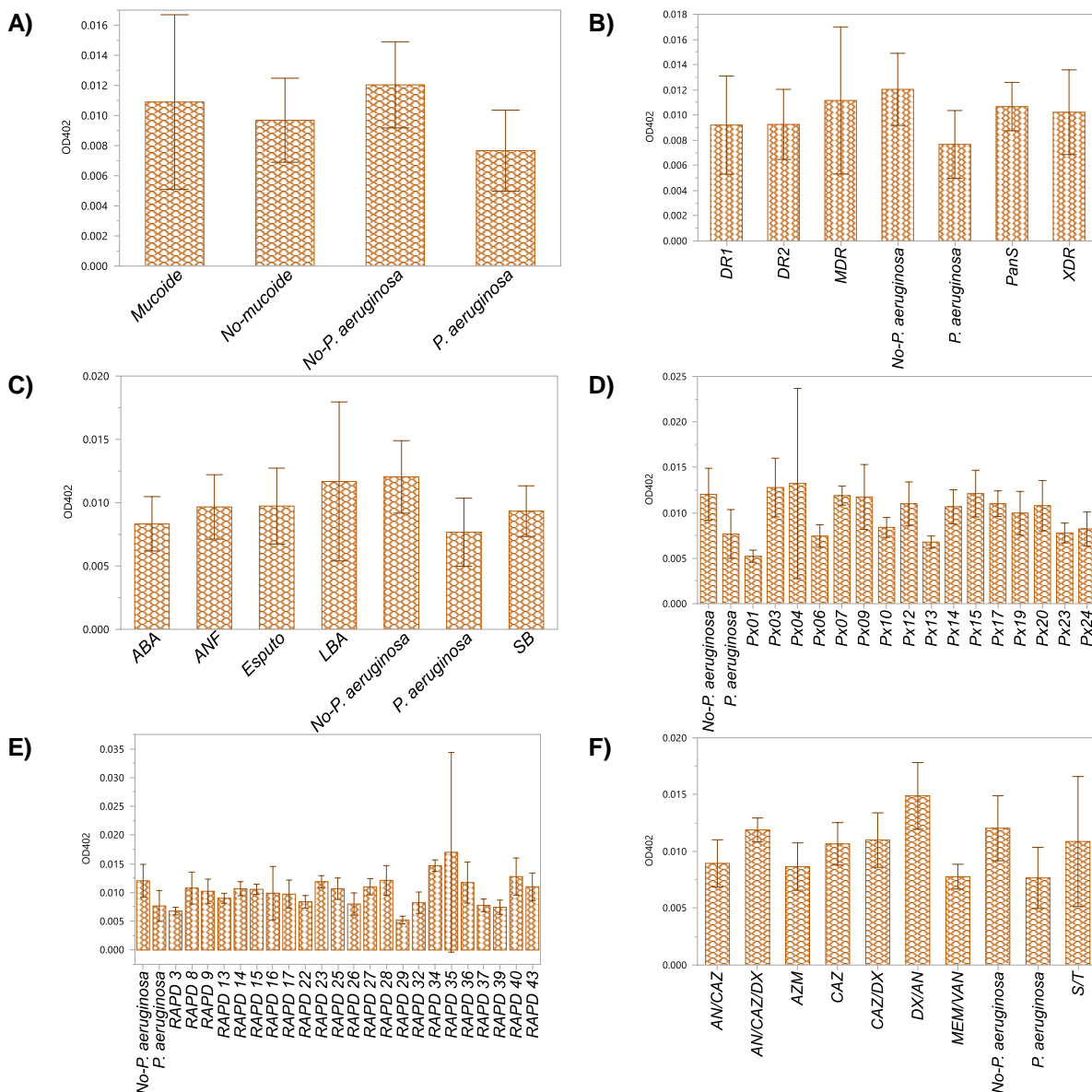


Figura 32. Comparaciones por agrupación de la absorbancia detectada en el sobrenadante 1 de los ensayos de interacción.

Histogramas comparativos de la absorbancia correspondiente a F23~AgNPs, detectada en cepas clínicas de *P. aeruginosa* agrupadas por A) Fenotipo colonial, B) Categoría de resistencia, C) Tipo de muestra clínica, D) Hospedero, E) Perfil de RAPD y F) Tratamiento, contrastadas con ambos grupos de cepas control.

En cuanto a la comparación basada en el establecimiento de biopelículas, todas las categorías a los tres tiempos evaluados mostraron absorbancias semejantes a las identificadas en el conjunto de cepas no-*P. aeruginosa*, excepto el conjunto de cepas integradas en la categoría II de formación de biopelículas en su medición a las 48 h, las que

exhibieron absorbancias significativamente menores a las de ese grupo control (Figura 33-B, Tabla 18). Esa categoría se conformó por cinco cepas clínicas de *P. aeruginosa* aisladas de cinco pacientes diferentes, dos de ellas presentaron una categoría de resistencia *DR2*, una fue *MDR* y dos fueron *XDR*. Una de las cepas *DR2* fue identificada en un ABA adquirido durante ausencia de tratamiento (Pa17mb) y la otra fue aislada de un ANF durante el tratamiento con AK/CAZ/DX (Pa94r). La cepa *MDR* (Pa88rb) fue aislada de un LBA durante ausencia de tratamiento UNA, mientras que ambas cepas *XDR* (Pa36ma y Pa83r) fueron identificadas durante el tratamiento con AK/CAZ.

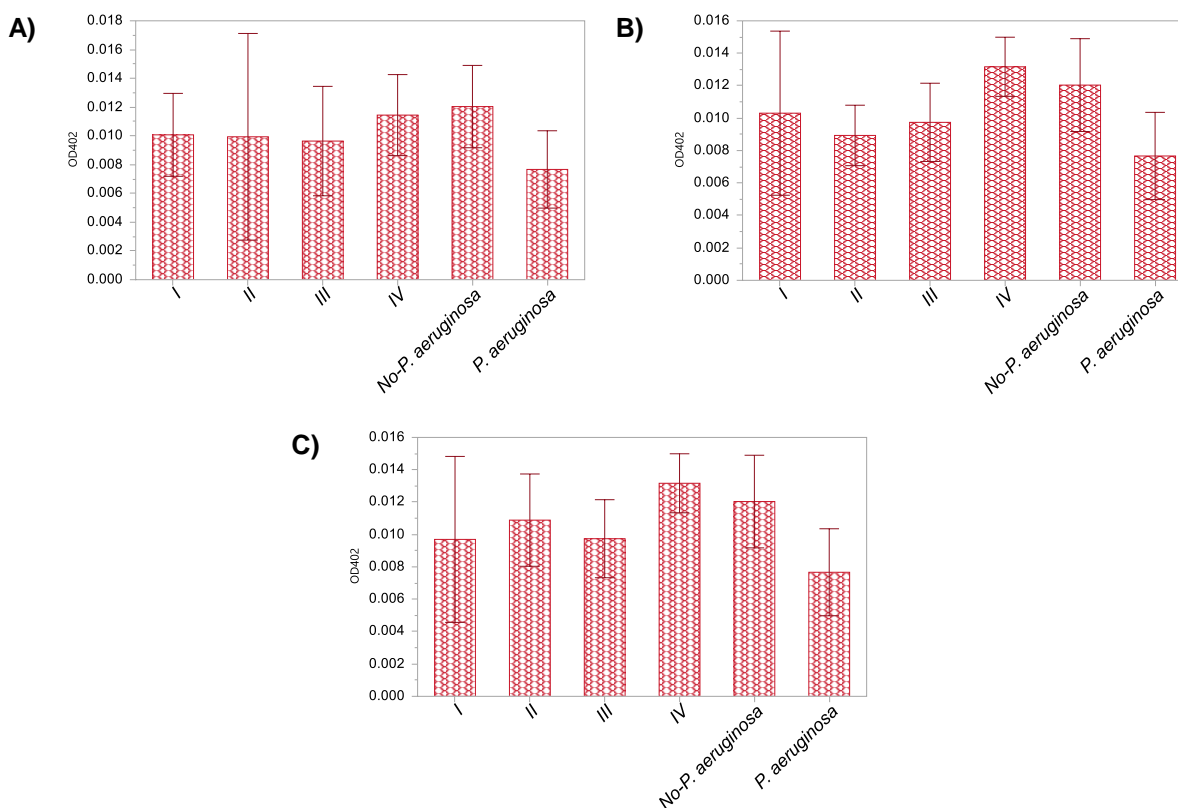


Figura 33. Comparaciones basadas en el establecimiento de biopelículas y las absorbancias detectadas correspondientes a F23~AgNPs.

Histogramas comparativos de las absorbancias cuantificadas en los sobrenadantes 1, referentes a las cepas clínicas agrupadas de acuerdo a su establecimiento de biopelículas a las A) 24 h, B) 48 h y C) 72 h, contrastadas con ambos grupos de cepas control.

Por último, la comparación entre las absorbancias y la intensidad de fluorescencia distinguió que las cepas con menor fluorescencia también exhibieron en el sobrenadante 1,

las absorbancias significativamente más pequeñas a las del grupo de cepas no-*P. aeruginosa* (Figura 34, Tabla 18).

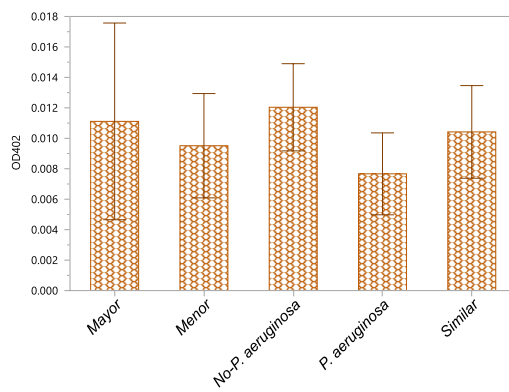


Figura 34. Comparación de absorbancias respecto a la intensidad de fluorescencia.

Diagrama de caja que señala la distribución de las absorbancias identificadas en las cepas clínicas de *P. aeruginosa*, ordenadas de manera descendente y agrupadas de acuerdo a la intensidad de fluorescencia (FAM~F23) detectada.

En cuanto a las absorbancias (OD_{402}) identificadas en el sobrenadante 2 de los ensayos de interacción, cuyos valores corresponden directamente a la cantidad de F23~AgNPs que reconoció a una cepa clínica y que fue recuperada por desnaturalización térmica.

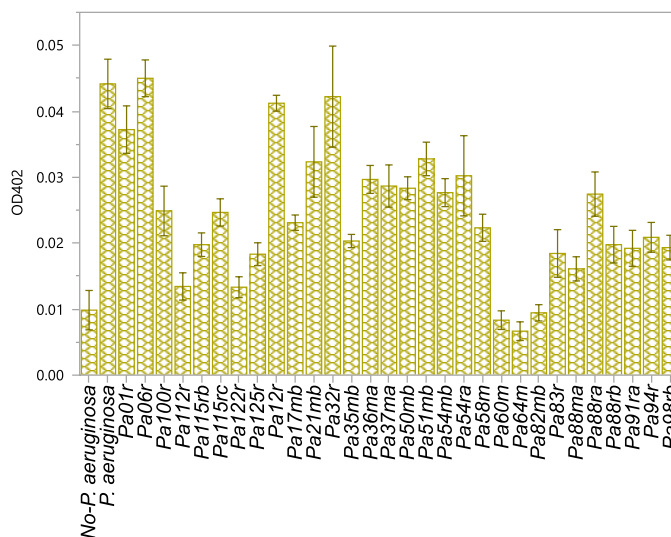


Figura 35. Absorbancias identificadas en el sobrenadante 2 de los ensayos de interacción.

Histograma de las absorbancias detectadas en el segundo sobrenadante de los ensayos de interacción, resultantes de la separación del complejo *P. aeruginosa*-F23~AgNPs por desnaturalización térmica, así como su contraste con los conjuntos de cepas de referencia de *P. aeruginosa* y cepas no-*P. aeruginosa*.

Esto permitió distinguir 25 cepas clínicas de *P. aeruginosa* con absorbancias significativamente mayores (Dunnett $p < 0.0001$, Figura 35) a las detectadas en el conjunto de cepas no-*P. aeruginosa* ($OD_{402} 0.010 \pm 0.007$), así como cinco cepas clínicas de *P. aeruginosa* con absorbancias equivalentes a las del grupo de cepas no-*P. aeruginosa*. Una de ellas exhibió un fenotipo *PanS* (Pa64m, Dunnett $p = 0.1748$), otra fue *DR1* (Pa60m, Dunnett $p = 0.9950$), dos cepas fueron *MDR* (Pa112r, Dunnett $p = 0.0685$ y Pa122r, Dunnett $p = 0.0898$) y una cepa fue *XDR* (Pa82mb, Dunnett $p = 1.0000$). A pesar de la diversidad de perfiles de resistencia de esas cinco cepas (Tabla 19), cuatro de ellas convergieron en la no-susceptibilidad a CTX y CRO, a excepción de la cepa *PanS* Pa64m. Los datos totales de las absorbancias identificadas en el sobrenadante 2 de los ensayos de interacción están detallados en el Anexo 17.

Tabla 19. Características de las cinco cepas clínicas de *P. aeruginosa* que mostraron menor reconocimiento por F23~AgNPs.

Cepa		Pa64m	Pa60m	Pa112r	Pa122r	Pa82mb	
Fenotipo colonial		Mucoide	Mucoide	No-mucoide	No-mucoide	Mucoide	
Tipo de muestra		Espuito	Espuito	LBA	Espuito	Espuito	
Categoría de Resistencia		<i>PanS</i>	<i>DR1</i>	<i>MDR</i>	<i>MDR</i>	<i>XDR</i>	
Agrupación RAPD		8	40	27	43	22	
Hospedero		Px20	Px03	Px17	Px12	Px10	
Tratamiento		AN/CAZ	DX/AN	S/T	CAZ/DX	AN/CAZ	
Familia de antibióticos	PEN	CRB	S	S	R	S	R
		PIP	S	S	R	I	R
	CEF	CTX	S	R	R	R	R
		CAZ	S	S	I	S	R
		CRO	S	R	R	R	R
		FEP	S	S	R	S	R
	MON	AZM	S	S	R	I	R
	CARB	IPM	S	I	S	S	R
		MEM	S	S	S	S	R
	AMG	AN	S	S	S	R	R
		CN	S	S	S	R	R
		NET	S	S	S	R	R
	FLQ	LVX	S	S	I	I	R
		CIP	S	S	S	S	R
		OFX	S	S	I	S	R
		NOR	S	S	S	S	R
	POL	CL	S	S	S	S	S
		PB	S	S	S	S	S

Pie de tabla: **S**= Sensibilidad al antibiótico; **I**= Resistencia intermedia; **R** = Resistencia; PEN= Penicilinas; CEF= Cefalosporinas; MON= Monobactámicos; CARB= Carbapenémicos; AMG= Aminoglucósidos; FLQ= Fluoroquinolonas; POL= Polimixinas; PIP= Piperacilina; CAZ= Ceftazidime; FEP= Cefepime; AZM= Aztreonam; IPM= Imipenem; MEM= Meropenem; AN= Amikacina; CN= Gentamicina; NET= Netilmicina; LVX= Levofloxacina; CIP= Ciprofloxacina; OFX= Ofloxacina; CL= Colistina y PB= Polimixina B; **Filas sombreadas**= Antibióticos adicionales no sugeridos por el CLSI [119]: CRB= Carbenicilina; CTX= Cefotaxime; CRO= Ceftriaxona y NOR= Norfloxacina.

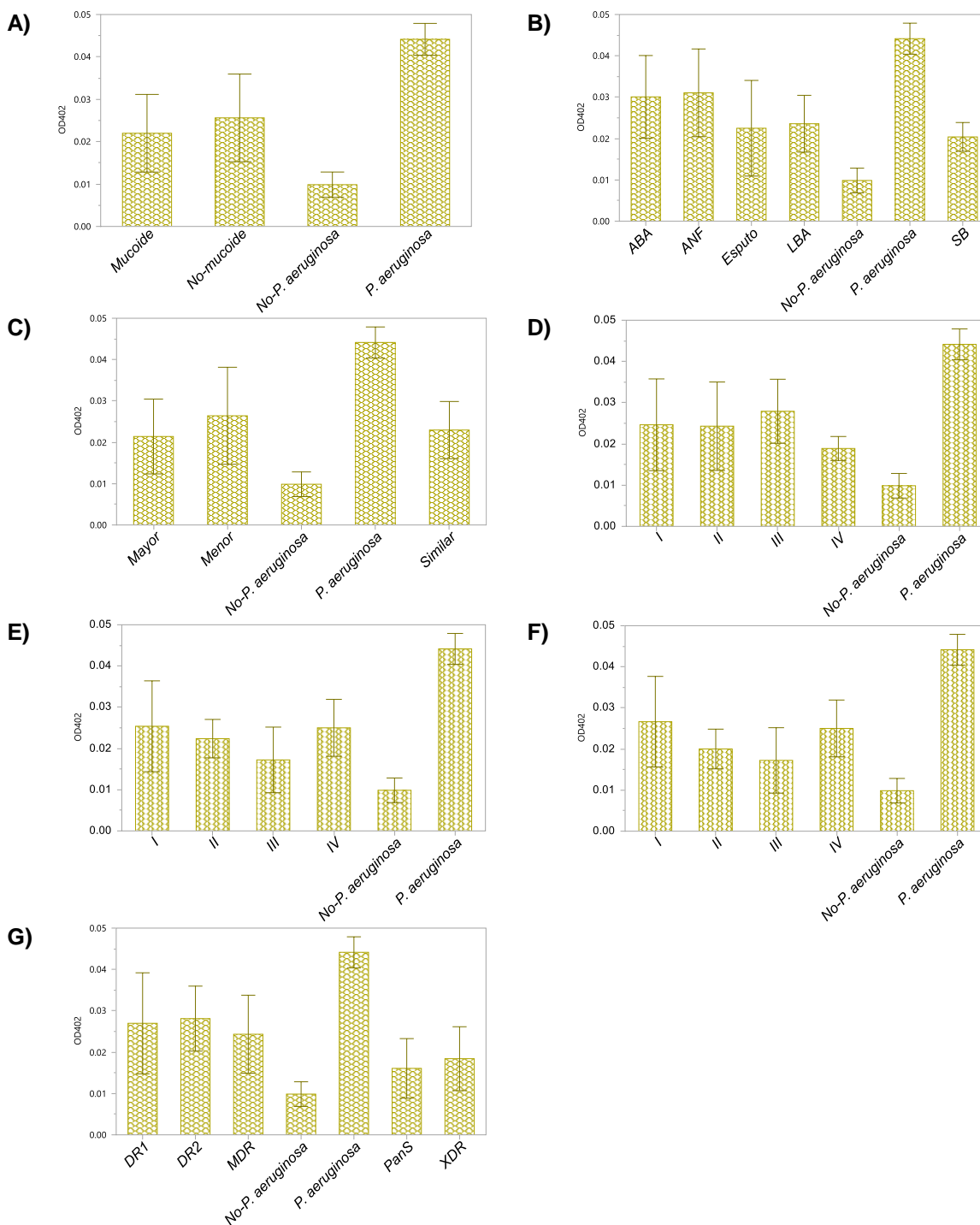


Figura 36. Comparaciones de las absorbancias detectadas en cepas clínicas de *P. aeruginosa*, basadas en cuatro categorías.

Histogramas comparativos de la absorbancia correspondiente a F23-*AgNPs*, detectada en cepas clínicas de *P. aeruginosa* agrupadas por A) Fenotipo colonial, B) Tipo de muestra clínica, C) Intensidad de fluorescencia, establecimiento de biopelículas a las D) 24 h, E) 48 h, F) 72 h y finalmente, por G) Categoría de resistencia.

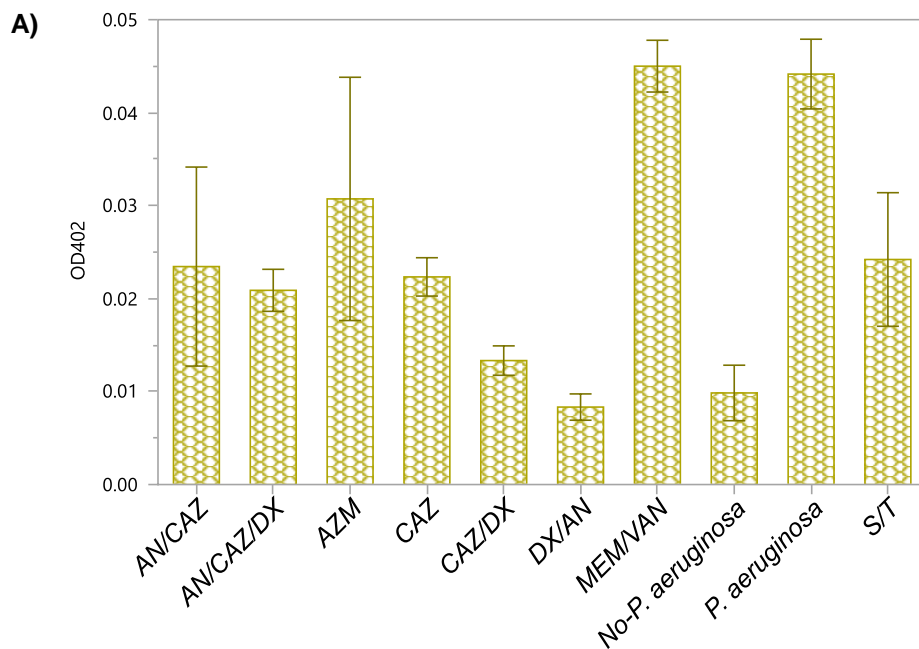
Tabla 20. Medidas de tendencia central y significancia de las absorbancias detectadas, comparadas por tres variables diferentes.

Contraste	Agrupación	\bar{X}	SD	OD_{402} Contrastes por especie	
				<i>P. aeruginosa</i>	No- <i>P. aeruginosa</i>
				Valor de <i>p</i>	Valor de <i>p</i>
Fenotipo colonial	Mucoide	0.021	0.009	<0.0001	<0.0001
	No-mucoide	0.025	0.010	<0.0001	<0.0001
Muestra clínica	ABA	0.030	0.009	<0.0001	<0.0001
	ANF	0.031	0.010	<0.0001	<0.0001
	Esputo	0.022	0.011	<0.0001	<0.0001
	LBA	0.023	0.006	<0.0001	<0.0001
	SB	0.020	0.003	<0.0001	0.0023
Intensidad de fluorescencia	Mayor	0.021	0.009	<0.0001	<0.0001
	Similar	0.022	0.006	<0.0001	<0.0001
	Menor	0.026	0.011	<0.0001	<0.0001
Biopelículas 24 h	I	0.025	0.011	<0.0001	<0.0001
	II	0.024	0.011	<0.0001	<0.0001
	III	0.028	0.008	<0.0001	<0.0001
	IV	0.019	0.003	<0.0001	0.0007
Biopelículas 48 h	I	0.025	0.011	<0.0001	<0.0001
	II	0.022	0.004	<0.0001	<0.0001
	III	0.017	0.008	<0.0001	0.0333
	IV	0.025	0.007	<0.0001	<0.0001
Biopelículas 72 h	I	0.027	0.011	<0.0001	<0.0001
	II	0.020	0.005	<0.0001	<0.0001
	III	0.017	0.008	<0.0001	0.0245
	IV	0.025	0.007	<0.0001	<0.0001
Categoría de resistencia	<i>PanS</i>	0.016	0.007	<0.0001	0.1082
	<i>DR1</i>	0.026	0.012	<0.0001	<0.0001
	<i>DR2</i>	0.028	0.007	<0.0001	<0.0001
	<i>MDR</i>	0.024	0.009	<0.0001	<0.0001
	<i>XDR</i>	0.018	0.007	<0.0001	0.0002

Pie de tabla: \bar{X} = Media; SD= Desviación estándar; Las significancias se obtuvieron por medio de la prueba de Tukey-Kramer, indicando en **color negro**= Ausencia de significancia estadística; en **color anaranjado**= Diferencia significativa y en **color rojo**= Diferencia significativa pronunciada.

Los contrastes entre las absorbancias y el fenotipo colonial, tipo de muestra clínica, intensidad de fluorescencia y establecimiento de biopelículas (Figura 36), así como el basado en la categoría de resistencia (Figura 37), evidenciaron absorbancias significativamente inferiores a las distinguidas en el conjunto de cepas de referencia de *P. aeruginosa*, aunque esos valores también fueron estadísticamente mayores al grupo de cepas no-*P. aeruginosa* (Tabla 20), con la única excepción del conjunto de cepas de la categoría de resistencia *PanS*, constituido por tres cepas (Pa58m, Pa64m y Pa91ra) con características fenotípicas y

genotípicas diferentes, aisladas de tres hospederos distintos (Px03, Px20 y Px19, respectivamente), pero que concordaron en ser aisladas durante el tratamiento con antibióticos (basado en CAZ, AN/CAZ y AZM, respectivamente).



B)

Tratamiento	\bar{X}	SD	OD ₄₀₂ Contrastes por especie	
			<i>P. aeruginosa</i>	No- <i>P. aeruginosa</i>
			Valor de p	Valor de p
AN/CAZ	0.023	0.010	<0.0001	<0.0001
AN/CAZ/DX	0.020	0.002	<0.0001	0.0110
AZM	0.030	0.013	<0.0001	<0.0001
CAZ	0.022	0.002	<0.0001	0.0018
CAZ/DX	0.013	0.001	<0.0001	0.9784
DX/AN	0.008	0.001	<0.0001	1.0000
MEM/VAN	0.045	0.002	1.0000	<0.0001
S/T	0.024	0.007	<0.0001	<0.0001

Pie de tabla: \bar{X} = Media; SD= Desviación estándar; Las significancias se obtuvieron por medio de la prueba de Tukey-Kramer, indicando en **color negro**= Ausencia de significancia estadística; en **color anaranjado**= Diferencia significativa y en **color rojo**= Diferencia significativa pronunciada.

Figura 37. Absorbancias detectadas en cepas clínicas de *P. aeruginosa* comparadas por tratamiento del hospedero.

Histogramas comparativos de la absorbancia correspondiente a F23~AgNPs, detectada en cepas clínicas de *P. aeruginosa* agrupadas por A) Fenotipo colonial, B) Categoría de resistencia, C) Tipo de muestra clínica e D) Intensidad de fluorescencia, así como sus contrastes con el grupo de cepas no-*P. aeruginosa* y el grupo de cepas de referencia de *P. aeruginosa*.

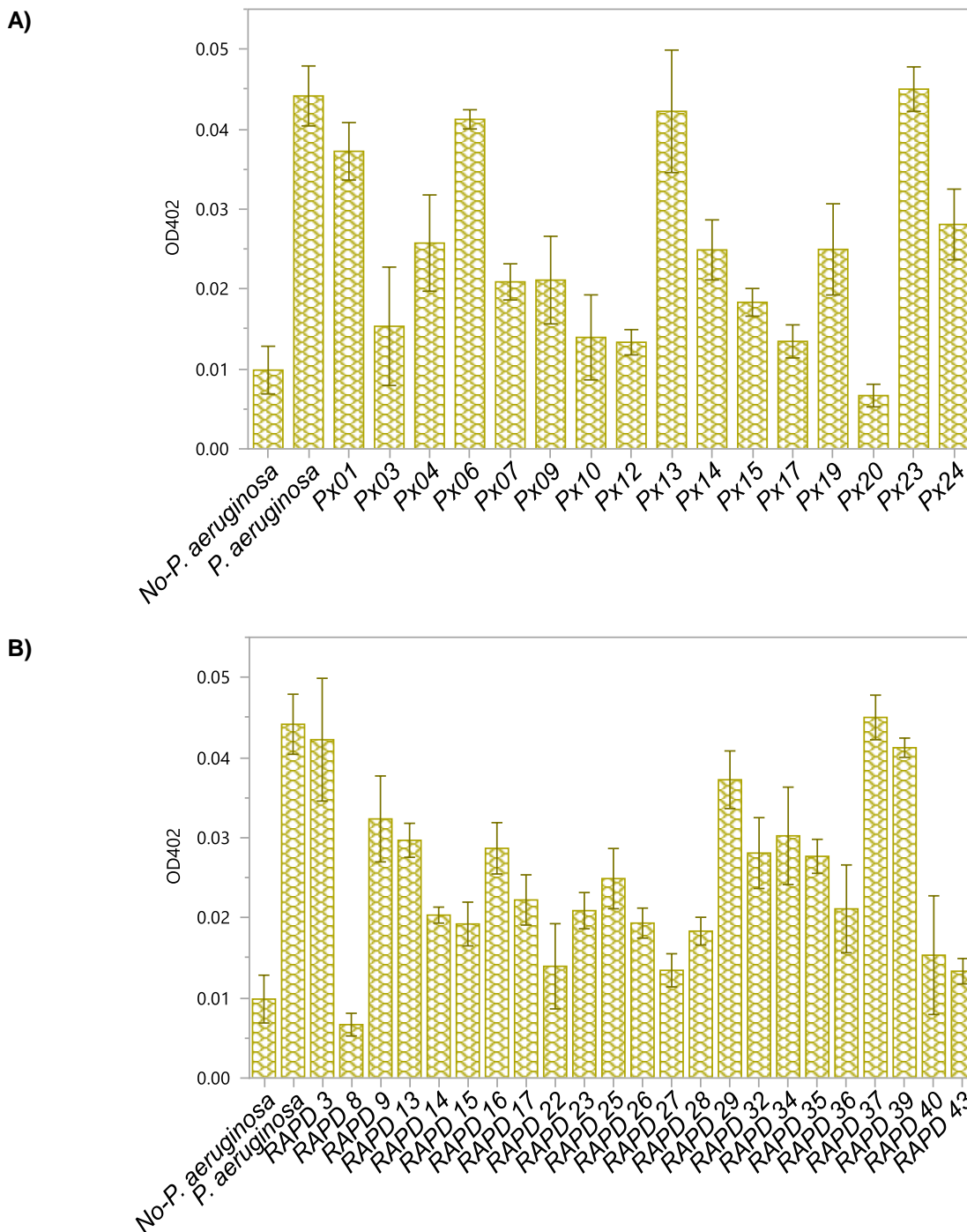


Figura 38. Comparación por hospedero y agrupación de RAPD de las absorbancias detectadas en cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

Histogramas de la absorbancia correspondiente a F23~AgNPs, detectada en cepas clínicas de *P. aeruginosa* agrupadas por A) Hospedero y B) grupo de RAPD, así como su comparación con los valores visualizados en el conjunto de cepas no-*P. aeruginosa* y con el conjunto de cepas de referencia de *P. aeruginosa*.

Tabla 21. Medidas de tendencia central y significancia de la absorbancia detectada en sobrenadantes 2, comparadas por hospedero y agrupación de RAPD, así como contra ambos grupos de cepas control.

Contraste	Agrupación	\bar{X}	SD	OD ₄₀₂ Contrastes por especie	
				<i>P. aeruginosa</i>	No- <i>P. aeruginosa</i>
				Valor de p	Valor de p
Hospedero	Px01	0.037	0.002	0.0259	<0.0001
	Px03	0.015	0.007	<0.0001	0.0256
	Px04	0.025	0.006	<0.0001	<0.0001
	Px06	0.041	0.001	0.9839	<0.0001
	Px07	0.020	0.002	<0.0001	<0.0001
	Px09	0.021	0.005	<0.0001	<0.0001
	Px10	0.013	0.005	<0.0001	0.3304
	Px12	0.013	0.001	<0.0001	0.9204
	Px13	0.042	0.007	0.9999	<0.0001
	Px14	0.024	0.003	<0.0001	<0.0001
	Px15	0.018	0.001	<0.0001	0.0010
	Px17	0.013	0.002	<0.0001	0.8980
	Px19	0.024	0.005	<0.0001	<0.0001
	Px20	0.006	0.001	<0.0001	0.9632
Px23	0.045	0.002	1.0000	<0.0001	
Px24	0.028	0.004	<0.0001	<0.0001	
RAPD	3	0.042	0.007	1.0000	<0.0001
	8	0.006	0.001	<0.0001	0.9526
	9	0.032	0.005	<0.0001	<0.0001
	13	0.029	0.002	<0.0001	<0.0001
	14	0.020	0.001	<0.0001	<0.0001
	15	0.019	0.002	<0.0001	<0.0001
	16	0.028	0.003	<0.0001	<0.0001
	17	0.022	0.003	<0.0001	<0.0001
	22	0.013	0.005	<0.0001	0.1807
	23	0.020	0.002	<0.0001	<0.0001
	25	0.024	0.003	<0.0001	<0.0001
	26	0.019	0.001	<0.0001	<0.0001
	27	0.013	0.002	<0.0001	0.8546
	28	0.018	0.001	<0.0001	<0.0001
	29	0.037	0.003	0.0047	<0.0001
	32	0.028	0.004	<0.0001	<0.0001
	34	0.030	0.006	<0.0001	<0.0001
	35	0.027	0.002	<0.0001	<0.0001
	36	0.021	0.005	<0.0001	<0.0001
37	0.045	0.002	1.0000	<0.0001	
39	0.041	0.001	0.9387	<0.0001	
40	0.015	0.007	<0.0001	0.0046	
43	0.013	0.001	<0.0001	0.8885	

Pie de tabla: \bar{X} = Media; SD= Desviación estándar; Las significancias se obtuvieron por medio de la prueba de Tukey-Kramer, indicando en **color negro**= Ausencia de significancia estadística; en **color anaranjado**= Diferencia significativa y en **color rojo**= Diferencia significativa pronunciada.

Sin embargo, al realizar el contraste específico entre los datos provenientes de las cepas agrupadas por tratamiento y los grupos de cepas control, se distinguieron absorbancias equivalentes al conjunto de cepas no-*P. aeruginosa*, exclusivamente en cepas aisladas de pacientes sometidos a tratamiento con CAZ/DX (Pa122r), así como los tratados con DX/AN (Pa60m), las cuales fueron citadas anteriormente en este apartado y compartieron la característica de ser aisladas de muestras de esputo. En paralelo, las cepas provenientes de hospederos bajo otros esquemas de tratamiento, así como ausencia del mismo, exhibieron absorbancias estadísticamente superiores a las encontradas en cepas no-*P. aeruginosa*, aunque el único conjunto que alcanzó absorbancias equivalentes a las de cepas de referencia de *P. aeruginosa*, fue el constituido por cepas aisladas de pacientes sometidos a terapia con MEM/VAN (Figura 37).

Finalmente, los análisis comparativos basados en hospederos y agrupaciones de *RAPD* (Figura 38) concordaron en la distinción de absorbancias equivalentes al grupo de cepas no-*P. aeruginosa*, encontradas en cinco cepas aisladas de los hospederos Px10 (Cepas Pa82mb y Pa83r), Px12 (cepa Pa122r), Px17 (cepa Pa112r) y Px20 (cepa Pa64m), integradas por similitud genética en las agrupaciones *RAPD* 22, *RAPD* 43, *RAPD* 27 y *RAPD* 8, respectivamente (Tabla 21). Cuatro de ellas mostraron no-susceptibilidad a CTX, CRO y AZM (Pa82mb, Pa83R, Pa122r y Pa112r), a pesar que difirieron en sus categorías de resistencia (Pa82mb y Pa83r fueron *XDR*, mientras Pa122r y Pa112r fueron *MDR*) y una exhibió susceptibilidad a todos los antibióticos evaluados (Pa64m, citada en diversas ocasiones en este apartado).

12. Discusión.

El patógeno *P. aeruginosa* puede colonizar tejidos diversos [90, 146], sin llegar a ser mortal en individuos sanos [90, 147]. No obstante, su aspecto oportunista se hace notorio en individuos con FQ [148, 149], ocasionando infecciones pulmonares tempranas y persistentes, las cuales logran establecerse crónicamente, culminando con la muerte de los pacientes infectados [150].

Es conocido que existe una gran heterogeneidad entre las poblaciones bacterianas de esta especie en el ambiente pulmonar de los pacientes con FQ [59, 151, 152], la cual es favorecida por mutaciones distintas [153] que son acumuladas a lo largo de su genoma extenso, el cual es considerado uno de los más grandes [58, 154–156] y con mayor plasticidad entre las bacterias [154–156], lo que desemboca en una especie con una gran plasticidad

fenotípica [155, 156], que se exhibe primordialmente en las cepas aisladas de secreciones respiratorias de los individuos con FQ [14, 150, 157].

Este trabajo confirmó lo reportado previamente por otros autores [158–160], al identificar morfologías celulares diferentes en las cepas clínicas de *P. aeruginosa*, cuya heterogeneidad se conformó por cepas con morfologías bacilares comunes, bacilos largos, bacilos cortos o coco-bacilos, así como una diversidad elevada de morfologías coloniales, mismas que fueron agrupadas en dos categorías generales definidas como no-mucoides y mucoides.

Esa amplia variedad de fenotipos puede ser resultado de la gama extensa de presiones selectivas presentes en el ambiente pulmonar de estos pacientes y que ha sido descrita por autores diversos [150, 161, 162], ese estrés selectivo ha sido caracterizado por otros autores quienes han definido que son distintos entre cada hospedero [153]. Lo anterior concuerda con la diversidad fenotípica vislumbrada en este trabajo, donde se estudiaron 130 aislados bacterianos de 28 infantes con FQ con edades ampliamente diversas (7 meses a 17 años), 12 de los cuales fueron femeninos y 16 fueron masculinos. Estas características favorecieron la heterogeneidad fenotípica, ya que se ha descrito que el estrés selectivo pulmonar difiere por factores demográficos diversos, como la edad, sexo, genotipo de *CFTR* del hospedero [163] e incluso nicho pulmonar [153], que resultan en variaciones en la concentración de nutrientes, capacidad de penetración de antibióticos y gradientes de oxígeno, entre otros [75].

Por otro lado, la Sociedad Americana para la Microbiología ha reconocido que la identificación microbiológica de las secreciones respiratorias provenientes de los individuos con FQ es complicada [121], debido a que las diversas condiciones a las que las comunidades de *P. aeruginosa* son sometidas, inducen cambios metabólicos importantes [162], mismos que pueden afectar desde la tasa de crecimiento bacteriano, hasta la expresión de factores de virulencia [67, 162], por lo que el uso de herramientas moleculares se ha vuelto imprescindible tanto para la identificación bacteriana [67, 164], como para los análisis epidemiológicos basados en huellas genéticas [164].

En cuanto a la identificación molecular de esta especie, una de las estrategias mayormente utilizadas es la amplificación por *PCR* de la región genética 16s rRNA [67, 77, 78], aunque existen reportes de resultados falsos-positivos que se han asociado a la naturaleza altamente polimórfica de este patógeno [129, 164]. Estudios comparativos previos han demostrado la utilidad de los pares de iniciadores utilizados en esta investigación, donde los iniciadores empleados para la amplificación de la región 16S-23S rDNA ITS, han permitido distinguir especies específicas entre miembros de un mismo género bacteriano [165] y en el caso de *P. aeruginosa* ha alcanzado sensibilidades y especificidades del 100% [128, 165, 166],

mientras que los iniciadores específicos para la región del antígeno O de la acetilasa, han logrado una especificidad elevada por *P. aeruginosa*, permitiendo diferenciarlas entre otras especies del género *Pseudomonas* [129]. Lo anterior fue confirmado en este trabajo al identificar los amplicones específicos de esas regiones únicamente en las cepas de referencia de *P. aeruginosa* y su ausencia en las cepas no-*P. aeruginosa*.

Asimismo, el análisis de ambas regiones en los aislados analizados, permitió excluir un total de 12 cepas bacterianas que habían externado características fenotípicas y perfiles bioquímicos asociados a *P. aeruginosa*, proporcionando una prueba adicional a los reportes de Choi HJ. y cols. [129] y Chen J-W. y cols. [164], acerca de su rendimiento, a pesar de la gran variabilidad fenotípica visualizada en este trabajo, además de fungir como una ratificación de la importancia de analizar más de una región genética, lo cual se ha estimado insuficiente para la detección de este patógeno en muestras clínicas [164], quedando evidenciado al mostrar resultados negativos para ambas regiones, en sólo nueve de las cepas excluidas.

Entre las pruebas moleculares enfocadas en la obtención de huellas genéticas bacterianas, que además son útiles en estudios epidemiológicos, resalta el *RAPD-PCR* por su sencillez, reproducibilidad, rapidez, así como una capacidad discriminatoria resaltable, misma que permite distinguir la relación clonal entre aislados clínicos [167, 168]. En adición, los iniciadores utilizados aquí han sido empleados anteriormente para obtener huellas genéticas de cepas de *P. aeruginosa* provenientes de brotes intrahospitalarios, de pacientes quemados [130, 133, 169], así como de individuos con FQ [130–132, 134, 170], logrando la visualización de hasta 15 amplicones para cada iniciador, identificados mediante geles de agarosa [130, 133]. Sin embargo, este estudio demostró perfiles de *RAPD* constituidos por hasta ~175% más fragmentos moleculares (74 amplicones), lo cual se explica por el uso combinado de *Urea PAGE*, seguido de tinción con AgNO_3 y análisis digital, ya que tan sólo el conjunto de *Urea PAGE* más tinción con AgNO_3 , otorgan un rango de sensibilidad de picogramos [137] que permite visualizar un 80% más amplicones [85].

El hecho de que un porcentaje elevado de las cepas analizadas se distribuyeran en agrupaciones únicas y específicas para cada hospedero fue consistente con lo descrito ampliamente sobre la colonización temprana de los individuos con FQ, la cual es iniciada por cepas adquiridas del ambiente que logran persistir por largos periodos de tiempo en los hospederos [157]. En el caso de este estudio, fue posible identificar el mismo perfil de *RAPD* en cepas con una diferencia temporal de aislamiento aproximado a 40 meses (*RAPD* 9 y *RAPD* 28) pero aisladas de los mismos hospederos (Px19 y Px01, respectivamente).

La única infección cruzada identificada en dos de los 25 pacientes estudiados sugiere que el protocolo de control epidemiológico establecido en el INP es eficiente, debido a que ambos hermanos que comparten la misma ubicación, aunado a un rango temporal amplio entre infecciones, indican que los esquemas terapéuticos posiblemente erradicaron las infecciones o disminuyeron las poblaciones bacterianas en el tracto respiratorio de los pacientes, revelando que el sitio probable de reinfecciones fue un ambiente contaminado en común y no el ambiente hospitalario, lo cual ya ha sido descrito por otros autores donde miembros con FQ de una misma familia suelen presentar la misma cepa de *P. aeruginosa* [131, 171].

Por otro lado, la detección de cepas pertenecientes a agrupaciones de *RAPD* diferentes con categorías de resistencia heterogéneas, identificadas en pacientes con infecciones recurrentes, tanto a manera de coinfección así como distribuidas a lo largo del tiempo analizado, en adición a la eliminación paulatina de ciertos genotipos de *RAPD* que finalizaron con el predominio de ciertas variantes, concuerda con lo reportado por diversos autores, que han descrito la coinfección, no solo con diferentes cepas de *P. aeruginosa* [172], sino incluso con otras especies microbianas [92, 173, 174], como un hecho común en esos individuos [175]. Asimismo, el recambio de las poblaciones bacterianas es un hecho que suele acontecer en los pacientes infectados crónicamente [62, 173] y se ha relacionado con pronósticos desfavorables para sus hospederos [173], debido a que las nuevas cepas adquiridas tienden a poseer características genéticas y fenotípicas que dificultan su erradicación [176], hecho que fue evidenciado en uno de los pacientes (Px19) cuyos últimos 11 aislados presentaron únicamente fenotipos *MDR* y *XDR*.

Una de las particularidades comúnmente identificada en las cepas aisladas de pacientes con infecciones recurrentes, es la aparición de variantes con fenotipo mucoide [62, 176, 177], lo cual estuvo acorde con el porcentaje elevado de cepas mucoides identificadas en pacientes con infecciones recurrentes e infecciones crónicas que conformaron este trabajo, armonizando con el hecho de que la detección de este fenotipo se ha asociado con el establecimiento de infecciones crónicas [150, 153, 161] y falla terapéutica [178]. Esta última, también asociada al surgimiento de variantes cada vez más resistentes a los antibióticos [153, 179], que complican el tratamiento al reducir las opciones terapéuticas disponibles [6, 180].

La frecuencia de cepas de *P. aeruginosa MDR* descrita en esta investigación, fue semejante a la reportada en otros estudios [143, 181], concordando con la tendencia global del incremento de ese fenotipo en pacientes con FQ, el cual se ha acrecentado desde un 15.7 % reportado en 2013, pasando por un 36 % puntualizado en 2017 [92] y hasta el 42.37 % exhibido en este estudio. Por otro lado, la frecuencia de variantes *XDR* fue uno de los hallazgos

centrales de esta investigación, la cual fue similar a la reportada por centros certificados de atención a pacientes con FQ [92, 182], cuyo servicio abarca tanto pacientes pediátricos como adultos, por lo que este porcentaje debería considerarse una señal de precaución, debido a que el INP es una institución enfocada a la atención pediátrica y es conocido ampliamente que las cepas procedentes de pacientes adultos con FQ tienden a ser más resistentes que aquellas aisladas de niños [183].

Adicionalmente, las proporciones elevadas de variantes *MDR* y *XDR* de *P. aeruginosa* encontradas en este trabajo sugieren que las antibioticoterapias cada vez más tempranas, podrían estar repercutiendo en la aparición prematura de fenotipos muy resistentes a los antibióticos, encaminadas a persistir en un ambiente pulmonar que se torna más hostil desde edades pediátricas, traduciéndose en una mayor proporción de fenotipos cada vez más resistentes [184], que podría resultar en un futuro próximo en la detección de variantes resistentes a todos los antibióticos disponibles (*PDR*), como ya ha sido reportado en otras poblaciones [92, 185, 186].

Un ejemplo claro de este suceso es el surgimiento de variantes de *P. aeruginosa* resistentes a colistina detectadas en algunos países [187, 188], que constituye uno de los últimos antibióticos elegibles en el esquema terapéutico general en pacientes con FQ [56, 89, 189] debido principalmente a su neurotoxicidad y nefrotoxicidad elevada [56]. En el INP, como en otros hospitales [190, 191], este antibiótico continúa siendo una alternativa útil para el tratamiento de esos individuos, aunque debe utilizarse con precaución ya que, como se ha estado indicando, esta bacteria podría desarrollar resistencia hacia ese antimicrobiano.

En ese contexto, el esquema terapéutico primordialmente aplicado en esta institución, se conformó por la administración combinada de un aminoglucósido con un β -lactámico (AN/CAZ), que es una terapia comúnmente empleada en centros acreditados de atención a pacientes con FQ [56, 176]. Ese tratamiento evidenció eficacia en la mayoría de las infecciones primarias detectadas, sin inducir porcentajes de resistencia importantes para AN (48.30 %, 57/118) ni para CAZ (22.88 %, 27/118), aunque se debe recalcar que la susceptibilidad a AN detectada en nuestra población (51.70 %) fue inferior a la reportada en otros países (63.60 %) [192], por lo que podría volverse ineficaz en pocos años ya que, como se vislumbró en los resultados de este trabajo, esa antibioticoterapia frecuentemente fue ineficaz en pacientes con infecciones recurrentes.

El hecho de que las cepas aisladas de pacientes con infecciones recurrentes y crónicas exhiban fenotipos alarmantes de resistencia, como las variantes *XDR*, demuestran la necesidad de un uso cuidadoso de los antibióticos actualmente utilizables, antes de que se

reduzcan las posibilidades terapéuticas que agraven aún más la "crisis de resistencia a los antibióticos", lo cual parece ser hasta el momento un efecto adverso inevitable del uso constante de antibióticos agresivos [59, 73, 193] a los cuales los hospederos son sometidos tan pronto como el patógeno es detectado en sus muestras de secreciones respiratorias, con el objetivo de retardar el establecimiento de la cronicidad de la infección [59, 166].

En la población evaluada se identificaron seis cepas *PanS*, las cuales fueron aisladas de pacientes bajo tratamiento con antibióticos, cuatro de ellas mostraron un fenotipo colonial mucoide, lo cual podría explicar en una pequeña fracción su persistencia en esos hospederos debido a que es conocido ampliamente que ese fenotipo expresa una sobreproducción de alginato [194], que es un polisacárido extracelular que protege a la bacteria de la respuesta inmune del hospedero [69, 73], perjudica la penetración de antibióticos [176] y es uno de los constituyentes primordiales de las biopelículas establecidas por esta especie [194], las que son reconocidas por aportar protección a las comunidades bacterianas inmersas en ellas contra factores diversos como la actividad de los antibióticos [162, 191] y es considerado por algunos autores como el mecanismo adaptativo más importante de este patógeno [73], permitiéndole sobrevivir en ambientes inhóspitos [182] y en el cual pueden interactuar con poblaciones microbianas diferentes con características ampliamente heterogéneas [174, 176].

Existen sistemas diversos para el estudio *in vitro* del establecimiento de biopelículas, siendo el más frecuentemente utilizado el basado en microplaca de pozos y tinción con CV [188, 195, 196] debido principalmente a su costo bajo [197, 198]. En este estudio identificamos un establecimiento de biopelículas extremadamente heterogéneo a los tres tiempos evaluados, visualizado tanto en las cepas de referencia de *P. aeruginosa* como en las cepas provenientes de aislados clínicos, reiterando la gran diversidad genotípica y fenotípica que coexiste en los pulmones de los pacientes con FQ, las cuales se exhiben como capacidades variables del establecimiento de biopelículas [139, 199].

El mayor establecimiento de biopelículas identificado en las cepas no-mucoides, sugiere que sus características tales como una mayor movilidad [161, 200], metabolismo basal rápido [161, 201] y una producción de exopolisacáridos independiente a la expresión de alginato [161, 188], entre otros, podrían favorecer el establecimiento primario de esas comunidades microbianas. Sin embargo, el hecho de no identificar diferencias significativas entre ambos fenotipos a tiempos más prolongados, así como la variabilidad visualizada aun entre cepas de fenotipos semejantes, indica que ambos fenotipos poseen la capacidad de establecer biopelículas, aunque los mecanismos empleados para ese fin pueden diferir de cepa a cepa.

Se conoce que este patógeno produce al menos tres exopolisacáridos que son el alginato, el locus codificador de polisacáridos (*Pel*) y el locus de síntesis de polisacáridos (*PsI*) [147], los que participan en el anclaje, establecimiento, desarrollo de biopelículas, así como en la protección bacteriana contra los antimicrobianos y los diferentes mecanismos defensivos del hospedero [194, 202, 203]. Como se mencionó anteriormente, el alginato es el exopolisacárido predominante de la matriz de las biopelículas de cepas mucoides [56, 194], mientras que las cepas no-mucoides suelen utilizar vías alternas para formar biopelículas tales como la biosíntesis de *Pel* y *PsI* [147, 194].

Lo anterior ha sido demostrado en cepas no-productoras de alginato, como la cepa de referencia ATCC® 15692™, la cual utiliza *PsI* como constituyente principal de sus biopelículas [194, 204], o la cepa de referencia UCBPP-PA14, la cual emplea *Pel* para la formación de sus biopelículas [194]. También existen reportes de cepas clínicas de *P. aeruginosa* aisladas de esputo de pacientes con FQ, que externaron una morfología colonial pequeña y no-mucoide (*RSCVs*) aunado a características hiperadherentes e hiperagregativas, las cuales fueron asociadas a la sobreexpresión de *Pel* y *PsI* [194, 205, 206]. Incluso, se ha demostrado mediante estudios mutacionales que la delección de las regiones genéticas encargadas de la expresión de alguno de los exopolisacáridos suele resultar en la sobreexpresión de otro, compensando en cierto rango la ausencia de alguno de los componentes estructurales de la matriz de sus biopelículas [194]. Entonces, la formación de biopelículas variará dependiendo de la expresión específica de esos exopolisacáridos en cada cepa [194, 207], que puede deberse a diferencias transcripcionales de estos polisacáridos o a la presencia de mutaciones deletéreas en los operones encargados de su expresión [184, 194, 204, 207].

Existe información contrastante sobre el establecimiento de biopelículas por cepas con fenotipos *MDR*, mientras algunos autores han correlacionado la formación de biopelículas fuertes en esas cepas [62, 195, 196, 208] otros no han distinguido diferencias significativas entre cepas *MDR* y no-*MDR* [149]. En este trabajo, se encontró heterogeneidad de establecimiento de biopelículas, aunque las cepas con fenotipos más resistentes fueron las que establecieron menos biopelículas a las 24 h, lo cual difiere con esos reportes a pesar de utilizar la misma estrategia metodológica y el mismo tiempo de incubación, aunque esos trabajos estudiaron cepas ambientales, urinarias e intrahospitalarias.

Sin embargo, el mayor establecimiento de biopelículas identificado en cepas *DR2* y *MDR* al tiempo máximo de incubación evaluado en este trabajo, sugiere que los cambios en el metabolismo basal, el cual constantemente se exhibe reducido en las cepas aisladas de pacientes con FQ infectados crónicamente [70, 209], pudo ser una de las variables que

repercuten en la obtención tardía de resultados semejantes a los mencionados en el párrafo anterior. Incluso el menor establecimiento de biopelículas, visualizado en cepas *XDR* de nuestra investigación, está en sintonía con lo reportado por otros autores que han descrito poco establecimiento de biopelículas en esas variantes en contraste a cepas *MDR* [182], aunque esos resultados podrían ser consecuencia de un análisis basado en un número pequeño de cepas *XDR*, debido a que aún suelen ser menos frecuentes que las variantes *MDR* [92, 210].

También se distinguió un establecimiento de biopelículas heterogéneo en cuanto al tipo de muestra, a pesar que todas ellas (esputo, EXP, SB, ABA, ANF y LBA) permiten el estudio microbiológico de las vías aéreas inferiores [66, 177, 211]. De manera general, las vías aéreas se constituyen por dos grandes regiones que son las vías aéreas superiores e inferiores, la primera abarca desde la nariz [212], los senos paranasales, hasta la faringe posterior [66, 68, 213], mientras que el tracto inferior está subdividido en microambientes diversos [214, 215], los cuales están constituidos por compartimentos independientes [81, 159] e interconectados [159], que poseen características particulares [59, 162, 212], como mucosidad variable, grados distintos de bronquiectasias y aireación [216], concentraciones heterogéneas de nutrientes o mezclas diferentes de ellos (como hierro y zinc), presencia de células de la respuesta inmune [162, 216], capacidad de penetración de antibióticos, así como la presencia de microorganismos diversos [59, 79, 162, 216].

Interesantemente, las cepas provenientes de ANF y ABA fueron las que exhibieron establecimientos de formación de biopelículas mayores (ANF, 24 h y 72 h; ABA, 48 h), lo cual puede deberse a que son técnicas que han sido consideradas por autores diversos [67, 217, 218] como invasivas, capaces de extraer comunidades bacterianas ubicadas en regiones pulmonares más profundas [217], mientras que las SB, EXP y esputos han sido catalogadas como muestras más superficiales [217] que suelen mostrar contaminación con microbiota oral, así como con microbiota de las vías aéreas superiores [217, 219]. Esto es importante, ya que otros trabajos [77] indican que las comunidades bacterianas ubicadas en vías aéreas superiores presentan diferencias pronunciadas con las presentes en las vías aéreas inferiores [77], debido a que están expuestas a una menor cantidad de factores estresantes [212], lo que nos permitió en este proyecto evaluar cepas aisladas de muestras no-invasivas colonizadoras de vías aéreas superiores o nichos orales.

Todo lo anterior se reflejó en los análisis por tratamiento, genotipo de *RAPD* y hospedero, los cuales exhibieron cepas que establecieron más biopelículas y que presentaron fenotipos y genotipos heterogéneos, reflejando la presencia de presiones selectivas extremadamente

diferentes a las que las comunidades de *P. aeruginosa* han sido sometidas a lo largo de su proceso infeccioso en los pacientes con FQ. Sin embargo, es crucial evaluar otras variables, tales como la expresión de polisacáridos extracelulares, análisis mutacionales en operones encargados de dicha biosíntesis e incluso el genotipo de *CFTR* de los hospederos, el cual puede resultar en fenotipos de FQ elevadamente variables [220, 221] y rangos amplios de severidad del padecimiento [63].

Como se ha estado describiendo, *P. aeruginosa* posee una versatilidad resaltable [68, 222] que le permite evadir la gran cantidad de agentes estresantes presentes en los pulmones de los individuos con FQ [68, 177, 223], logrando tarde o temprano establecerse crónicamente [224]. Sin embargo, en años recientes se ha descrito un incremento en la esperanza de vida de estos individuos [225], así como una disminución global en la prevalencia de infecciones pulmonares por *P. aeruginosa* [226], datos que se han asociado a la adopción de esquemas terapéuticos tempranos y agresivos con antibióticos a los que son sometidos los pacientes [225, 226], evidenciando lo imprescindible que es contar con herramientas rápidas y precisas para la identificación específica de este patógeno [14], que logren detectarla a pesar de su enorme variabilidad visualizada en aislados clínicos.

Bajo ese argumento, *FAM-F23* demostró, bajo la estrategia metodológica utilizada en este trabajo, ser útil para la identificación específica de *P. aeruginosa* por microscopía de fluorescencia, siendo capaz de distinguir a este bacilo aún entre especies filogenéticamente cercanas, sin importar su fenotipo colonial, categoría de resistencia, capacidad de formación de biopelículas, genotipo, tipo de muestra, tratamiento u hospedero.

Actualmente no existe evidencia documentada de este aptámero marcado con *FAM* para la detección mediante fluorescencia de esta especie bacteriana, aunque existen tres estrategias metodológicas reportadas para la identificación de *P. aeruginosa* que utilizan el aptámero F23 y fluorocromos derivados de la fluoresceína, tales como *FITC* y *FAM*, bajo configuraciones y métodos diversos. El primero de ellos empleó a F23 modificado con *FITC* en su extremo 5' (*FITC-F23*) para la identificación específica de cepas de referencia de esta especie (ATCC® 27853™, ATCC® 49189™, ATCC® 10145™ y ATCC® 15442™), mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo [37], posteriormente fue utilizado para evaluar su capacidad de detección del microorganismo en agua potable, mediante espectrofotometría de fluorescencia, empleando como organismo blanco a la cepa de referencia ATCC® 10145™, [52]. La última estrategia se conformó por la inmovilización de F23 sobre *MNPs* (*MNPs-F23*), en combinación con un cDNA de la secuencia del aptámero, marcado con *FAM* (*cDNA-FAM*) y utilizado para la identificación de la bacteria en muestras de

Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos por Zhong Z. y cols. (2018), quienes emplearon cuatro especies filogenéticamente más distantes para determinar la especificidad de su ensayo basado en *MNPs~F23* y *cDNA-FAM*, las especies abarcaron dos bacilos Gram negativos (*E. coli* O157:H7 y *Salmonella enterica*), un bacilo Gram positivo (*Listeria monocytogenes*) y *S. aureus*, lo que podría explicar en parte la fluorescencia menor a 13% detectada en cepas no-*P. aeruginosa*, respecto a la exhibida por la cepa ATCC® 10145™ [54], mientras que en este trabajo esa fluorescencia inespecífica alcanzó un 31%, que pudo deberse a la distancia filogenética mayor de las cepas evaluadas en esos proyectos, mientras que en este estudio se integraron cepas filogenéticamente cercanas a la especie bacteriana objetivo, que incluyeron a una cepa del género *Pseudomonas* y dos especies anteriormente integradas en ese género (*B. cepacia* y *S. maltophilia*) y que suelen ser aisladas de secreciones respiratorias de pacientes con FQ [228, 229], por lo que no solo comparten características genotípicas, fenotípicas y bioquímicas con *P. aeruginosa*, sino que son sometidas a presiones selectivas semejantes que pudieron determinar la reducción de intensidad de fluorescencia desde las visualizadas en *P. aeruginosa* hacia *P. alcaligenes*, *B. cepacia* y hasta *S. maltophilia*.

Los hallazgos de este estudio denotan la utilidad potencial de *FAM~F23* para la identificación rápida del patógeno en muestras clínicas, incluso capaz de detectar variantes hipermutantes, las cuales son comunes en individuos con FQ e infecciones crónicas, por lo que en un futuro cercano podría evaluarse su funcionamiento contra esas variantes, encaminado al desarrollo de una herramienta diagnóstica rápida y precisa, que a su vez permita un abordaje terapéutico aún más temprano que pueda incrementar la esperanza de vida de esos individuos.

Por el lado terapéutico, este trabajo concuerda con los objetivos señalados en la lista de patógenos de prioridad crítica emitida en 2017 por la Organización Mundial de la Salud (*WHO*, por su acrónimo en inglés) [150, 164], la que surgió para promover la investigación y desarrollo de antibióticos nuevos que permitan combatir la crisis de *AMR* actual [189]. Uno de los patógenos principales de esa categoría es *P. aeruginosa* [150, 231], por lo que la implicación de este trabajo podría ir más allá del abordaje en pacientes con FQ.

En este trabajo se realizó el acoplamiento de F23 sobre *AgNPs*, el cual no había sido descrito para este aptámero y este tipo de *NPs* metálicas. Estos acoplados exhibieron características visuales, espectrales y electroforéticas que sugirieron un acoplamiento basado en la quimisorción del extremo -tiol de F23 sobre la superficie de las *AgNPs*, obteniendo

resultados similares a los de otros autores que han acoplado aptámeros sobre *NPs* metálicas que describen un desplazamiento del pico máximo de absorción de 2-10 nm [110, 232].

Esta molécula (F23~*AgNPs*) mostró la capacidad de distinguir las cepas de referencia de *P. aeruginosa* entre especies filogenéticamente cercanas ($p < 0.05$), tanto en su estado no-inactivado (silvestre) como a cepas inactivadas, aunque las mayores diferencias estadísticas fueron detectadas en éstas últimas ($p < 0.0001$), evidenciando un mejor funcionamiento del aptámero bajo las condiciones originalmente propuestas por Wang K. y cols. [37], quienes seleccionaron a F23 mediante *Whole-cell SELEX* utilizando la cepa de referencia ATCC® 27853™ inactivada, y cuya estrategia de inactivación ha sido útil para identificar cepas de *P. aeruginosa* por medio de aptasensores basados en *LSPR* [21] y mediante F23 marcado con *FITC* [37, 52].

En este trabajo se evaluó la interacción de F23~*AgNPs* hacia cepas clínicas inactivadas de *P. aeruginosa*, y bajo esa condición fueron obtenidas las significancias más notorias en los ensayos con cepas de referencia. Sin embargo, el hecho de que F23~*AgNPs* exhibiera significancias en la identificación de cepas de *P. aeruginosa* no-inactivadas sugiere e insta a estudios posteriores enfocados al desarrollo de una herramienta terapéutica específica contra este patógeno en su estado silvestre, el que se sumaría al único estudio publicado donde utilizaron a F23 para inhibir la formación de biopelículas de la cepa ATCC® 27853™ no-inactivada, mediante su acoplamiento a *SWNTs* (F23- *SWNTs*), así como la construcción de un complejo con ciprofloxacina y *SWNTs* (F23-CIP-*SWNTs*) [22].

La medición de absorbancia en dos sobrenadantes, realizadas a una OD_{402} correspondiente al complejo F23~*AgNPs*, fue utilizada para analizar la capacidad del complejo de reconocer y ligar cepas clínicas de *P. aeruginosa*. Por un lado, valores de absorbancia pequeños en el sobrenadante 1 sugirieron la inmovilización de F23~*AgNPs* sobre la cepa estudiada (*P. aeruginosa*-F23~*AgNPs*), resultando en una reducción de F23~*AgNPs* en solución, mientras que los valores elevados se tradujeron como reconocimientos deficientes. Solamente siete cepas mostraron absorbancias significativamente menores a las detectadas en el grupo de cepas no-*P. aeruginosa*, cinco de las cuales exhibieron un fenotipo colonial no-mucoide, infiriendo que la capacidad de reconocimiento de F23~*AgNPs* podría estar orientada al fenotipo “silvestre” de ese microorganismo (no-mucoide), lo que concuerda con el hecho de identificar absorbancias significativamente menores en cepas no-mucoides respecto a las identificadas en cepas no-*P. aeruginosa*.

Asimismo, la identificación de absorbancias elevadas en una cepa clínica de *P. aeruginosa*, así como la detección de absorbancias semejantes al grupo de cepas no-*P.*

aeruginosa en 22 cepas clínicas de *P. aeruginosa*, insinúan que existe una interacción basal entre F23~AgNPs y los bacilos Gram negativos utilizados en este trabajo, permitiendo la formación de complejos bacteria-F23~AgNPs establecidos por atracción electrostática entre las AgNPs cargadas positivamente y las membranas celulares bacterianas cargadas negativamente [98, 233], lo cual podría representar una barrera pequeña para su uso terapéutico, por lo que sería imprescindible identificar la *K_d* del complejo, incrementar la densidad de F23 sobre las AgNPs con la finalidad de amplificar su afinidad por *P. aeruginosa*, así como la modificación de las AgNPs con moléculas que favorezcan su reconocimiento específico, como el polietilenglicol (PEG) [234].

Lo anterior concuerda con las absorbancias identificadas en el sobrenadante 2, las cuales son el resultado de la desnaturalización térmica de la estructura funcional de F23, permitiendo la separación de los complejos *P. aeruginosa*-F23~AgNPs, que resultan en valores de absorbancia elevados para cepas reconocidas y ligadas por medio de F23. Esos datos mostraron absorbancias significativamente mayores en el 83.33 % de las cepas estudiadas (25/30), sin importar su fenotipo colonial, categoría de resistencia, tipo de muestra clínica, establecimiento de biopelículas, genotipo u hospedero, evidenciando su aplicabilidad potencial pese a lo descrito en el sobrenadante anterior, ya que la aplicación de lavados simples con PBS fueron suficientes para romper la asociación bacteria-F23~AgNPs, mientras que la asociación *P. aeruginosa*-F23~AgNPs requirió temperatura desnaturalizante para romper su interacción.

El único rubro comparativo que sugirió deficiencias de reconocimiento entre F23~AgNPs y *P. aeruginosa* fue el del tratamiento con antibióticos del hospedero durante la toma de la muestra, encontrando diferencias en los tratamientos basados en la combinación de antibióticos que incluyeron DX. La DX es un antibiótico comúnmente utilizado contra bacterias Gram positivas [235], por lo que se infiere que la transferencia horizontal de genes, la que se conoce que puede acontecer incluso entre especies no-relacionadas [236, 237], podría estar influyendo en la adquisición de características adaptativas diversas, que perjudican su reconocimiento por este complejo, reafirmando la necesidad de estudios adicionales para evaluar este complejo F23~AgNPs, bajo modificaciones diversas, que permitan identificar la mayor variedad de genotipos y fenotipos de *P. aeruginosa* posibles, con la finalidad de desarrollar en un futuro próximo, una herramienta terapéutica especie y sitio específica, capaz de identificar una heterogeneidad elevada de variantes de este bacilo, sin reconocer a especies filogenéticamente cercanas.

13. Conclusiones.

1. Las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de secreciones respiratorias de individuos con FQ exhiben una heterogeneidad elevada, la cual es resultado de la plétora de presiones selectivas a las que son sometidas y que varían de manera dependiente a factores demográficos del paciente, tales como edad, género, esquema terapéutico e incluso genotipo de *CFTR*, las cuales deberían ser evaluadas en estudios adicionales.
2. A lo largo de las vías aéreas de los individuos con FQ existen factores micro ambientales diversos, como son grados distintos de mucosidad, aireación, nutrientes o penetración de antibióticos, así como la presencia de otros microorganismos, los cuales pueden aportar características poco comunes al fenotipo de esta bacteria, complicando su diagnóstico certero y oportuno, que repercute en el abordaje terapéutico temprano y apropiado.
3. Este trabajo es pionero en emplear al aptámero F23 marcado con *FAM* (*FAM-F23*) como herramienta de detección microbiológica, demostrando la capacidad de identificar rápida (~2 h) y específicamente a cepas clínicas de *P. aeruginosa* genotípica y fenotípicamente heterogéneas, lo que podría favorecer el área diagnóstica con una herramienta de detección rápida y barata.
4. Adicionalmente a la identificación expedita de este patógeno lograda con *FAM-F23*, el antibiograma continúa siendo imprescindible para emprender el esquema terapéutico de los pacientes, por lo que el uso combinado de la detección rápida y específica de la bacteria y el establecimiento de sus patrones de resistencia a los antibióticos, repercutirá en una mejora sustantiva en la terapéutica de los pacientes infectados por este microorganismo.
5. Este proyecto constituye el primer reporte de *AgNPs* acopladas a F23 (*F23-AgNPs*), lo que fue logrado por quimisorción y que se encamina al desarrollo de una nanopartícula microbicida específica para *P. aeruginosa*.
6. *F23-AgNPs* es capaz de distinguir cepas inactivadas y no-inactivadas de *P. aeruginosa* entre especies filogenéticamente cercanas.

7. Existe un reconocimiento basal débil de F23~AgNPs hacia otros bacilos Gram negativos sugerido por fuerzas electrostáticas, mientras que su unión con *P. aeruginosa* se aludió a la interacción de F23, al requerir temperatura desnaturalizante para romper su asociación.

14. Perspectivas.

Este trabajo da pauta a un amplio campo de investigación, con el planteamiento de interrogantes diversas sobre el empleo de aptámeros dirigidos a *P. aeruginosa* y su empleo combinado con nanopartículas con propiedades antimicrobianas que permitan incursionar en la medicina nanométrica, que responda al llamado de la *WHO* para el desarrollo e investigación de herramientas útiles para combatir la crisis de *AMR*, dentro de los cuales enumero los objetivos subsecuentes a esta tesis.

1. Identificar la constante de disociación (K_d) y límite de detección de FAM~F23 hacia cepas clínicas y cepas de referencia de *P. aeruginosa*.
2. Evaluar la capacidad de identificación de FAM~F23 directamente en muestras de secreciones respiratorias de individuos con FQ, las cuales suelen ser hiper-viscosas y pegajosas, constituyendo un reto adicional para este compuesto.
3. Visualizar la estructura del acoplado F23~AgNPs por microscopía de fuerza atómica.
4. Visualizar el complejo *P. aeruginosa*- F23~AgNPs por microscopía electrónica.
5. Evaluar el reconocimiento de F23~AgNPs con modificaciones estructurales hacia cepas clínicas de *P. aeruginosa* no-inactivadas.
6. Identificar la constante de disociación (K_d) de F23~AgNPs hacia cepas clínicas y cepas de referencia de *P. aeruginosa*.
7. Contrastar la concentración mínima inhibitoria de las AgNPs en solitario y el acoplado F23~AgNPs hacia cepas clínicas y de referencia de *P. aeruginosa*, así como evaluar su actividad en el establecimiento de biopelículas de esas cepas.
8. Analizar la citotoxicidad de F23~AgNPs en líneas celulares procedentes de pulmón.

15. Referencias bibliográficas.

1. MacGowan A, Macnaughton E (2017) Antibiotic resistance. *Medicine (Baltimore)* 45:622–628. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.07.006>
2. Panáček A, Kvítek L, Smékalová M, et al (2018) Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nat Nanotechnol* 13:65–71. <https://doi.org/10.1038/s41565-017-0013-y>
3. Zazo H, Colino CI, Lanao JM (2016) Current applications of nanoparticles in infectious diseases. *J Control Release* 224:86–102. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.008>
4. Zhu X, Radovic-Moreno AF, Wu J, et al (2014) Nanomedicine in the management of microbial infection - Overview and perspectives. *Nano Today* 9:478–498. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.06.003>
5. Drulis-Kawa Z, Dorotkiewicz-Jach A (2010) Liposomes as delivery systems for antibiotics. *Int J Pharm* 387:187–198. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.11.033>
6. Rossolini GM, Arena F, Pecile P, Pollini S (2014) Update on the antibiotic resistance crisis. *Curr Opin Pharmacol* 18:56–60. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.09.006>
7. Frieri M, Kumar K, Boutin A (2017) Antibiotic resistance. *J Infect Public Health* 10:369–378. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
8. Rather IA, Kim B-C, Bajpai VK, Park Y-H (2017) Self-medication and antibiotic resistance: Crisis, current challenges, and prevention. *Saudi J Biol Sci* 24:808–812. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.01.004>
9. Siddiqi KS, Husen A, Rao RAK (2018) A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J Nanobiotechnology* 16:14. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5>
10. Beyth N, Hourri-Haddad Y, Domb A, et al (2015) Alternative antimicrobial approach: Nano-antimicrobial materials. *Evidence-Based Complement Altern Med* 2015:1–16. <https://doi.org/10.1155/2015/246012>
11. Arul D, Balasubramani G, Balasubramanian V, et al (2017) Antibacterial efficacy of silver nanoparticles and ethyl acetate's metabolites of the potent halophilic (marine) bacterium, *Bacillus cereus* A30 on multidrug resistant bacteria. *Pathog Glob Health* 111:367–382. <https://doi.org/10.1080/20477724.2017.1390829>
12. Jaiswal S, Mishra P (2018) Antimicrobial and antibiofilm activity of curcumin-silver nanoparticles with improved stability and selective toxicity to bacteria over mammalian cells. *Med Microbiol Immunol* 207:39–53. <https://doi.org/10.1007/s00430-017-0525-y>
13. Tang Z-X, Lv B-F (2014) MgO nanoparticles as antibacterial agent: preparation and activity. *Brazilian J Chem Eng* 31:591–601. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20140313s00002813>
14. Park KS (2018) Nucleic acid aptamer-based methods for diagnosis of infections. *Biosens Bioelectron* 102:179–188. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.028>
15. Rizo Amézquita JN, Camargo O EA (2017) Boletín del centro colaborador de la OPS/OMS en materia de calidad y seguridad del paciente. Secretaría de Salud, México; Comisión Nacional de Arbitraje, México, Ciudad de México

16. Antimicrobial Resistance Collaborators (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* (London, England) 399:629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
17. Ventola CL (2015) The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T* 40:277–283
18. Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A, et al (2015) Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano-Micro Lett* 7:219–242. <https://doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>
19. Brooks BD, Brooks AE (2014) Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. *Adv Drug Deliv Rev* 78:14–27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.027>
20. Parisi OI, Scrivano L, Sinicropi MS, Puoci F (2017) Polymeric nanoparticle constructs as devices for antibacterial therapy. *Curr Opin Pharmacol* 36:72–77. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.08.004>
21. Hu J, Fu K, Bohn PW (2018) Whole-cell *Pseudomonas aeruginosa* localized surface plasmon resonance aptasensor. *Anal Chem* 90:2326–2332. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04800>
22. Wang S, Mao B, Wu M, et al (2018) Influence of aptamer-targeted antibiofilm agents for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 111:199–208. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0941-4>
23. Urmann K, Modrejowski J, Scheper T, Walter J-G (2017) Aptamer-modified nanomaterials: principles and applications. *BioNanoMaterials* 18:1–17. <https://doi.org/10.1515/bnm-2016-0012>
24. Toscano-Garibay JD, Benítez-Hess ML, Alvarez-Salas LM (2015) Targeting of the HPV-16 E7 Protein by RNA Aptamers. In: Keppler D, Lin AW (eds). Springer New York, New York, NY, pp 221–239
25. Davydova A, Vorobjeva M, Pyshnyi D, et al (2016) Aptamers against pathogenic microorganisms. *Crit Rev Microbiol* 42:847–865. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1070115>
26. Takahashi M (2018) Aptamers targeting cell surface proteins. *Biochimie* 145:63–72. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.11.019>
27. Sun H, Zu Y (2015) A highlight of recent advances in aptamer technology and its application. *Molecules* 20:11959–80. <https://doi.org/10.3390/molecules200711959>
28. Sun H, Zhu X, Lu PY, et al (2014) Oligonucleotide aptamers: new tools for targeted cancer therapy. *Mol Ther Nucleic Acids* 3:e182. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.32>
29. Walker JM (2016) *Nucleic Acid Aptamers*. Springer New York, New York, NY
30. Ruscito A, DeRosa MC (2016) Small-molecule binding aptamers: Selection strategies, characterization, and applications. *Front Chem* 4:14. <https://doi.org/10.3389/fchem.2016.00014>
31. Li P, Zhou L, Yu Y, et al (2015) Characterization of DNA aptamers generated against the soft-shelled turtle iridovirus with antiviral effects. *BMC Vet Res* 11:245. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0559-6>
32. Zhu G, Niu G, Chen X (2015) Aptamer–drug conjugates. *Bioconjug Chem* 26:2186–2197. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00291>

33. Benedetto G, Vestal CG, Richardson C (2015) Aptamer-functionalized nanoparticles as “Smart Bombs”: The unrealized potential for personalized medicine and targeted cancer treatment. *Target Oncol* 10:467–85. <https://doi.org/10.1007/s11523-015-0371-z>
34. Tuerk C, Gold L (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249:505–10
35. Ellington A, Szostak J (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346:818–22. <https://doi.org/10.1038/346818a0>
36. Chang Y-C, Yang C-Y, Sun R-L, et al (2013) Rapid single cell detection of *Staphylococcus aureus* by aptamer-conjugated gold nanoparticles. *Sci Rep* 3:1863. <https://doi.org/10.1038/srep01863>
37. Wang K-Y, Zeng Y-L, Yang X-Y, et al (2011) Utility of aptamer-fluorescence in situ hybridization for rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30:273–278. <https://doi.org/10.1007/s10096-010-1074-0>
38. Bruno JG, Kiel JL (1999) In vitro selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection. *Biosens Bioelectron* 14:457–64. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(99\)00028-7](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(99)00028-7)
39. Sypabekova M, Bekmurzayeva A, Wang R, et al (2017) Selection, characterization, and application of DNA aptamers for detection of *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein MPT64. *Tuberculosis* 104:70–78. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.03.004>
40. Dwivedi HP, Smiley RD, Jaykus L-A (2010) Selection and characterization of DNA aptamers with binding selectivity to *Campylobacter jejuni* using whole-cell SELEX. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:2323–2334. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2728-7>
41. Duan N, Wu S, Chen X, et al (2013) Selection and characterization of aptamers against *Salmonella typhimurium* using Whole-bacterium Systemic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX). *J Agric Food Chem* 61:3229–3234. <https://doi.org/10.1021/jf400767d>
42. Lavu PSR, Mondal B, Ramlal S, et al (2016) Selection and characterization of aptamers using a modified Whole cell bacterium SELEX for the detection of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *ACS Comb Sci* 18:292–301. <https://doi.org/10.1021/acscombsci.5b00123>
43. Friedman AD, Kim D, Liu R (2015) Highly stable aptamers selected from a 2'-fully modified fGmH RNA library for targeting biomaterials. *Biomaterials* 36:110–123. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.08.046>
44. Kim YS, Song MY, Jurng J, Kim BC (2013) Isolation and characterization of DNA aptamers against *Escherichia coli* using a bacterial cell–systematic evolution of ligands by exponential enrichment approach. *Anal Biochem* 436:22–28. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.01.014>
45. Ramlal S, Mondal B, Lavu PS, et al (2018) Capture and detection of *Staphylococcus aureus* with dual labeled aptamers to cell surface components. *Int J Food Microbiol* 265:74–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.002>
46. Rotherham LS, Maserumule C, Dheda K, et al (2012) Selection and application

- of ssDNA aptamers to detect active TB from sputum samples. PLoS One 7:e46862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046862>
47. Li D, Zhou B, Lv B (2020) Antibacterial therapeutic agents composed of functional biological molecules. J Chem 2020:1–13. <https://doi.org/10.1155/2020/6578579>
 48. Kolovskaya OS, Savitskaya AG, Zamay TN, et al (2013) Development of Bacteriostatic DNA Aptamers for *Salmonella*. J Med Chem 56:1564–1572. <https://doi.org/10.1021/jm301856j>
 49. Soundy J, Day D (2017) Selection of DNA aptamers specific for live *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS One 12:e0185385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185385>
 50. Chen F, Zhang X, Zhou J, et al (2012) Aptamer inhibits *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) invasion of macrophage. Mol Biol Rep 39:2157–62. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-0963-3>
 51. Chen F, Zhou J, Huang Y-H, et al (2013) Function of ssDNA aptamer and aptamer pool against *Mycobacterium tuberculosis* in a mouse model. Mol Med Rep 7:669–73. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.1229>
 52. Kim LH, Yu H-W, Kim Y-H, et al (2013) Potential of fluorophore labeled aptamers for *Pseudomonas aeruginosa* detection in drinking water. J Korean Soc Appl Biol Chem 56:165–171. <https://doi.org/10.1007/s13765-013-3019-7>
 53. Yoo SM, Kim D-K, Lee SY (2015) Aptamer-functionalized localized surface plasmon resonance sensor for the multiplexed detection of different bacterial species. Talanta 132:112–117. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.003>
 54. Zhong Z, Gao X, Gao R, Jia L (2018) Selective capture and sensitive fluorometric determination of *Pseudomonas aeruginosa* by using aptamer modified magnetic nanoparticles. Microchim Acta 185:377. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2914-3>
 55. Jia F, Xu L, Yan W, et al (2017) A magnetic relaxation switch aptasensor for the rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* using superparamagnetic nanoparticles. Microchim Acta 184:1539–1545. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2142-2>
 56. Talwalkar JS, Murray TS (2016) The approach to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Clin Chest Med 37:69–81. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2015.10.004>
 57. Cabot G, Zamorano L, Moyà B, et al (2016) Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance and fitness under low and high mutation rates. Antimicrob Agents Chemother 60:1767–1778. <https://doi.org/10.1128/AAC.02676-15>
 58. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA (2017) *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. Front Cell Infect Microbiol 7:39. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>
 59. Winstanley C, O'Brien S, Brockhurst MA (2016) *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in Cystic Fibrosis chronic lung infections. Trends Microbiol 24:327–337. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.008>
 60. Murugan N, Malathi J, Therese KL, Madhavan HN (2018) Application of six multiplex PCR's among 200 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* for the

- detection of 20 drug resistance encoding genes. *Kaohsiung J Med Sci* 34:79–88. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2017.09.010>
61. Teixeira P, Tacão M, Alves A, Henriques I (2016) Antibiotic and metal resistance in a ST395 *Pseudomonas aeruginosa* environmental isolate: A genomics approach. *Mar Pollut Bull* 110:75–81. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.086>
 62. Bianconi I, D’Arcangelo S, Esposito A, et al (2019) Persistence and microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung: A single-patient longitudinal genomic study. *Front Microbiol* 9:3242–3257. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03242>
 63. Bierlaagh MC, Muilwijk D, Beekman JM, van der Ent CK (2021) A new era for people with cystic fibrosis. *Eur J Pediatr* 180:2731–2739. <https://doi.org/10.1007/s00431-021-04168-y>
 64. Masood A, Jacob M, Gu X, et al (2021) Distinctive metabolic profiles between Cystic Fibrosis mutational subclasses and lung function. *Metabolomics* 17:4. <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01760-5>
 65. López-Valdez JA, Aguilar-Alonso LA, Gándara-Quezada V, et al (2021) Cystic fibrosis: current concepts. *Bol Med Hosp Infant Mex* 78:584–596. <https://doi.org/10.24875/BMHIM.20000372>
 66. Shteinberg M, Haq IJ, Polineni D, Davies JC (2021) Cystic fibrosis. *Lancet* 397:2195–2211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32542-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32542-3)
 67. Lund-Palau H, Turnbull AR, Bush A, et al (2016) *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. *Expert Rev Respir Med* 10:685–697. <https://doi.org/10.1080/17476348.2016.1177460>
 68. Sousa A, Pereira M (2014) *Pseudomonas aeruginosa* Diversification during infection development in cystic fibrosis lungs—A review. *Pathogens* 3:680–703. <https://doi.org/10.3390/pathogens3030680>
 69. Bouvier NM (2016) Cystic fibrosis and the war for iron at the host–pathogen battlefield. *Proc Natl Acad Sci* 113:1480–1482. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525101113>
 70. Ciofu O, Tolker-Nielsen T, Jensen PØ, et al (2015) Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Adv Drug Deliv Rev* 85:7–23. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.11.017>
 71. Chalmers JD (2020) Cystic fibrosis lung disease and bronchiectasis. *Lancet Respir Med* 8:12–14. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30335-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30335-2)
 72. Smyth AR, Bell SC, Bojcin S, et al (2014) European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Best practice guidelines. *J Cyst Fibros* 13 Suppl 1:S23–42. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.03.010>
 73. Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T (2010) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol* 5:1663–1674. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.125>
 74. Dickinson KM, Collaco JM (2021) Cystic fibrosis. *Pediatr Rev* 42:55–67. <https://doi.org/10.1542/pir.2019-0212>
 75. Rosales-Reyes R, Vargas-Roldán SY, Lezana-Fernández JL, Santos-Preciado JI (2021) *Pseudomonas aeruginosa*: Genetic adaptation, a strategy for its

- persistence in cystic fibrosis. Arch Med Res 52:357–361. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.12.004>
76. Inam Z, Felton E, Burrell A, et al (2022) Impact of Antibiotics on the Lung Microbiome and Lung Function in Children With Cystic Fibrosis 1 Year After Hospitalization for an Initial Pulmonary Exacerbation. Open forum Infect Dis 9:ofac466. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac466>
 77. Françoise A, Héry-Arnaud G (2020) The microbiome in cystic fibrosis pulmonary disease. Genes (Basel) 11:536. <https://doi.org/10.3390/genes11050536>
 78. Caverly LJ, LiPuma JJ (2018) Cystic fibrosis respiratory microbiota: unraveling complexity to inform clinical practice. Expert Rev Respir Med 12:857–865. <https://doi.org/10.1080/17476348.2018.1513331>
 79. Frayman KB, Armstrong DS, Grimwood K, Ranganathan SC (2017) The airway microbiota in early cystic fibrosis lung disease. Pediatr Pulmonol 52:1384–1404. <https://doi.org/10.1002/ppul.23782>
 80. Green H, Jones A (2015) The microbiome and emerging pathogens in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis. Semin Respir Crit Care Med 36:225–235. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1546752>
 81. Boutin S, Graeber SY, Weitnauer M, et al (2015) Comparison of microbiomes from different niches of upper and lower airways in children and adolescents with cystic fibrosis. PLoS One 10:e0116029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116029>
 82. Metzger MI, Graeber SY, Stahl M, et al (2021) A Volatile and Dynamic Longitudinal Microbiome Is Associated With Less Reduction in Lung Function in Adolescents With Cystic Fibrosis. Front Cell Infect Microbiol 11:763121. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.763121>
 83. Suzuki M, Yamada K, Aoki M, et al (2016) Applying a PCR-based open-reading frame typing method for easy genotyping and molecular epidemiological analysis of *Pseudomonas aeruginosa*. J Appl Microbiol 120:487–497. <https://doi.org/10.1111/jam.13016>
 84. Workentine M, Poonja A, Waddell B, et al (2016) Development and validation of a PCR assay to detect the prairie epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 54:489–491. <https://doi.org/10.1128/JCM.02603-15>
 85. Barnini S, Dodi C, Campa M (2004) Enhanced resolution of random amplified polymorphic DNA genotyping of *Pseudomonas aeruginosa*. Lett Appl Microbiol 39:274–277. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01576.x>
 86. Chatterjee M, Anju CP, Biswas L, et al (2016) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. Int J Med Microbiol 306:48–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.11.004>
 87. Óscar Fielbaum C (2011) Avances en fibrosis quística. Rev Médica Clínica Las Condes 22:150–159. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(11\)70407-2](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(11)70407-2)
 88. Kordes A, Preusse M, Willger SD, et al (2019) Genetically diverse *Pseudomonas aeruginosa* populations display similar transcriptomic profiles in a cystic fibrosis explanted lung. Nat Commun 10:3397. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11414-3>
 89. Ahmadian L, Norouzi Bazgir Z, Ahanjan M, et al (2021) Role of aminoglycoside-

- modifying enzymes (AMEs) in resistance to aminoglycosides among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the north of Iran. *Biomed Res Int* 2021:1–10. <https://doi.org/10.1155/2021/7077344>
90. Mapipa Q, Digban TO, Nnolim NE, Nwodo UU (2021) Antibiofilm profile and virulence signatures of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from selected agrestic hospital effluents. *Sci Rep* 11:11800. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91280-6>
 91. Zhao J, Cheng W, He X, et al (2018) Association of furanone C-30 with biofilm formation & antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J Med Res* 147:400. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_2010_16
 92. Rutter WC, Burgess DR, Burgess DS (2017) Increasing incidence of multidrug resistance among cystic fibrosis respiratory bacterial isolates. *Microb Drug Resist* 23:51–55. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0048>
 93. Bartłomiejczyk T, Lankoff A, Kruszewski M, Szumiel I (2013) Silver nanoparticles -- allies or adversaries? *Ann Agric Environ Med* 20:48–54
 94. Martinez-Gutierrez F, Boegli L, Agostinho A, et al (2013) Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. *Biofouling* 29:651–660. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.794225>
 95. Zhang X-F, Liu Z-G, Shen W, Gurunathan S (2016) Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int J Mol Sci* 17:1534. <https://doi.org/10.3390/ijms17091534>
 96. Salem W, Leitner DR, Zingl FG, et al (2015) Antibacterial activity of silver and zinc nanoparticles against *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 305:85–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.11.005>
 97. Mohamed El-Azizi M, Nour El Din S, El-Tayeb T, Abou Aisha K (2016) In vitro and in vivo antimicrobial activity of combined therapy of silver nanoparticles and visible blue light against *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Nanomedicine* 1749. <https://doi.org/10.2147/IJN.S102398>
 98. Khameneh B, Diab R, Ghazvini K, Fazly Bazzaz BS (2016) Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microb Pathog* 95:32–42. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.009>
 99. Habash MB, Park AJ, Vis EC, et al (2014) Synergy of silver nanoparticles and aztreonam against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 58:5818–5830. <https://doi.org/10.1128/AAC.03170-14>
 100. Ribeiro SM, Felício MR, Boas EV, et al (2016) New frontiers for anti-biofilm drug development. *Pharmacol Ther* 160:133–144. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.02.006>
 101. Yuan Y-G, Peng Q-L, Gurunathan S (2017) Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: An alternative approach for antimicrobial therapy. *Int J Mol Sci* 18:569. <https://doi.org/10.3390/ijms18030569>
 102. Kumari M, Pandey S, Giri VP, et al (2017) Tailoring shape and size of biogenic silver nanoparticles to enhance antimicrobial efficacy against MDR bacteria. *Microb Pathog* 105:346–355. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.11.012>
 103. Kalishwaralal K, BarathManiKanth S, Pandian SRK, et al (2010) Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and

- Staphylococcus epidermidis*. Colloids Surfaces B Biointerfaces 79:340–344. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.04.014>
104. Reithofer MR, Lakshmanan A, Ping ATK, et al (2014) In situ synthesis of size-controlled, stable silver nanoparticles within ultrashort peptide hydrogels and their anti-bacterial properties. Biomaterials 35:7535–7542. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.102>
 105. Loo C-Y, Young PM, Lee W-H, et al (2014) Non-cytotoxic silver nanoparticle-polyvinyl alcohol hydrogels with anti-biofilm activity: designed as coatings for endotracheal tube materials. Biofouling 30:773–788. <https://doi.org/10.1080/08927014.2014.926475>
 106. Naqvi SZ, Kiran U, Ali, et al (2013) Combined efficacy of biologically synthesized silver nanoparticles and different antibiotics against multidrug-resistant bacteria. Int J Nanomedicine 3187. <https://doi.org/10.2147/IJN.S49284>
 107. Liu B, Zhang J, Liao J, et al (2014) Aptamer-functionalized nanoparticles for drug delivery. J Biomed Nanotechnol 10:3189–3203. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1839>
 108. Kong R-M, Zhang X-B, Chen Z, Tan W (2011) Aptamer-assembled nanomaterials for biosensing and biomedical applications. Small 7:2428–36. <https://doi.org/10.1002/smll.201100250>
 109. Azcárate JC, Corthey G, Pensa E, et al (2013) Understanding the surface chemistry of thiolate-protected metallic nanoparticles. J Phys Chem Lett 4:3127–3138. <https://doi.org/10.1021/jz401526y>
 110. Sperling R a, Parak WJ (2010) Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci 368:1333–1383. <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0273>
 111. Chen LQ, Xiao SJ, Peng L, et al (2010) Aptamer-based silver nanoparticles used for intracellular protein imaging and single nanoparticle spectral analysis. J Phys Chem B 114:3655–3659. <https://doi.org/10.1021/jp9104618>
 112. Walter J-G, Kökpınar O, Friehs K, et al (2008) Systematic investigation of optimal aptamer immobilization for protein–microarray applications. Anal Chem 80:7372–7378. <https://doi.org/10.1021/ac801081v>
 113. Zhu G, Lübbecke M, Walter J-G, et al (2011) Characterization of optimal aptamer-microarray binding chemistry and spacer design. Chem Eng Technol 34:2022–2028. <https://doi.org/10.1002/ceat.201000551>
 114. García-García JA, Reding-Bernal A, López-Alvarenga JC (2013) Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. Investig en Educ Médica 2:217–224. [https://doi.org/10.1016/S2007-5057\(13\)72715-7](https://doi.org/10.1016/S2007-5057(13)72715-7)
 115. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2018) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI supplement M07, 11th ed. 19087 USA
 116. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods 9:676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
 117. Liu J, Lu Y (2006) Preparation of aptamer-linked gold nanoparticle purple aggregates for colorimetric sensing of analytes. Nat Protoc 1:246–252. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.38>

118. Hu H, Li H, Zhao Y, et al (2014) Aptamer-functionalized silver nanoparticles for scanometric detection of platelet-derived growth factor-BB. *Anal Chim Acta* 812:152–160. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.12.026>
119. Deka J, Měch R, laneselli L, et al (2015) Surface passivation improves the synthesis of highly stable and specific DNA-functionalized gold nanoparticles with variable DNA density. *ACS Appl Mater Interfaces* 7:7033–7040. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b01191>
120. Yu M, Wang H, Fu F, et al (2017) Dual-recognition Förster resonance energy transfer based platform for one-step sensitive detection of pathogenic bacteria using fluorescent vancomycin–gold nanoclusters and aptamer–gold nanoparticles. *Anal Chem* 89:4085–4090. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04958>
121. Jorgensen JH (2015) *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington, DC, USA
122. Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ (1989) Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 8:151–156. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>
123. Riffiani R, Sulistinah N, Sunarko B (2015) Comparison of three DNA isolation and purification methods of bacterial DNA. *KnE Life Sci* 2:491. <https://doi.org/10.18502/kls.v2i1.199>
124. Fujimoto S, Nakagami Y, Kojima F (2004) Optimal bacterial DNA isolation method using bead-beating technique. *Med Sch* 3:33–38
125. Savli H (2003) Expression stability of six housekeeping genes: a proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. *J Med Microbiol* 52:403–408. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05132-0>
126. da Silva Filho L V, Levi JE, Oda Bento CN, et al (1999) PCR identification of *Pseudomonas aeruginosa* and direct detection in clinical samples from cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol* 48:357–361. <https://doi.org/10.1099/00222615-48-4-357>
127. Mozioglu E, Akgöz M, Tamerler C, et al (2014) A simple guanidinium isothiocyanate method for bacterial genomic DNA isolation. *TURKISH J Biol* 38:125–129. <https://doi.org/10.3906/biy-1308-7>
128. Lavenir R, Jocktane D, Laurent F, et al (2007) Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific ecfX gene target. *J Microbiol Methods* 70:20–29. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.008>
129. Choi HJ, Kim MH, Cho MS, et al (2013) Improved PCR for identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:3643–3651. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4709-0>
130. Baena del Valle JA, Gomez Alegria CJ, Gomez Camargo DE (2014) Antimicrobial susceptibility and genotypification of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients and other diseases in Cartagena (Colombia). *Salud Uninorte* 30:104–120
131. Kalferstova L, Vilimovska Dedeckova K, Antuskova M, et al (2016) How and why to monitor *Pseudomonas aeruginosa* infections in the long term at a cystic

- fibrosis centre. J Hosp Infect 92:54–60. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.09.010>
132. Armstrong DS, Nixon GM, Carzino R, et al (2002) Detection of a widespread clone of *Pseudomonas aeruginosa* in a pediatric cystic fibrosis clinic. Am J Respir Crit Care Med 166:983–987. <https://doi.org/10.1164/rccm.200204-269OC>
 133. Goli HR, Nahaei MR, Rezaee MA, et al (2018) Role of MexAB-OprM and MexXY-OprM efflux pumps and class 1 integrons in resistance to antibiotics in burn and Intensive Care Unit isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Public Health 11:364–372. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.09.016>
 134. Mahenthiralingam E, Campbell ME, Foster J, et al (1996) Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 34:1129–35
 135. Nanvazadeh F, Khosravi AD, Zolfaghari MR, Parhizgari N (2013) Genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients by RAPD-PCR. Burns 39:1409–1413. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2013.03.008>
 136. Summer H, Grämer R, Dröge P (2009) Denaturing urea polyacrylamide gel electrophoresis (Urea PAGE). J Vis Exp 3–5. <https://doi.org/10.3791/1485>
 137. Bassam BJ, Gresshoff PM (2007) Silver staining DNA in polyacrylamide gels. Nat Protoc 2:2649–2654. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.330>
 138. Hames BD (1998) Gel electrophoresis of proteins: A practical approach, Third Edit. New York
 139. Deligianni E, Pattison S, Berrar D, et al (2010) *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates of similar RAPD genotype exhibit diversity in biofilm forming ability in vitro. BMC Microbiol 10:38. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-38>
 140. CLSI (2020) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29th edition. CLSI supplement M100, 30th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, 19087 USA
 141. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2018) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100, 28th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, 19087 USA
 142. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, 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 18:268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
 143. Gill J, Arora S, Khanna S, Kumar Kvsh (2016) Prevalence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from a tertiary level Intensive Care Unit. J Glob Infect Dis 8:155–159. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.192962>
 144. Yayan J, Ghebremedhin B, Rasche K (2015) Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in pneumonia at a single university hospital center in Germany over a 10-year period. PLoS One 10:e0139836. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139836>
 145. O'Toole GA (2011) Microtiter dish biofilm formation assay. J Vis Exp 3–5. <https://doi.org/10.3791/2437>
 146. Qin M, Ma X, Fan S, et al (2021) Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* using a DNazyme-based sensor. Food Sci Nutr 9:3873–3884. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2367>

147. Streeter K, Katouli M (2016) *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. *Infect Epidemiol Med* 2:25–32. <https://doi.org/10.7508/iem.2016.01.008>
148. Qin S, Xiao W, Zhou C, et al (2022) *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther* 7:199. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>
149. Eladawy M, El-Mowafy M, El-Sokkary MMA, Barwa R (2021) Antimicrobial resistance and virulence characteristics in ERIC-PCR typed biofilm forming isolates of *P. aeruginosa*. *Microb Pathog* 158:105042. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105042>
150. Gutiérrez-Santana JC, Gerónimo-Gallegos A, Martínez-Corona MB, et al (2022) High rates of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. *Curr Microbiol* 79:353. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03048-4>
151. Mowat E, Paterson S, Fothergill JL, et al (2011) *Pseudomonas aeruginosa* population diversity and turnover in cystic fibrosis chronic infections. *Am J Respir Crit Care Med* 183:1674–1679. <https://doi.org/10.1164/rccm.201009-1430OC>
152. Darch SE, McNally A, Harrison F, et al (2015) Recombination is a key driver of genomic and phenotypic diversity in a *Pseudomonas aeruginosa* population during cystic fibrosis infection. *Sci Rep* 5:7649. <https://doi.org/10.1038/srep07649>
153. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S (2021) *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *Int J Mol Sci* 22:1–37. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
154. Varga JJ, Barbier M, Mulet X, et al (2015) Genotypic and phenotypic analyses of a *Pseudomonas aeruginosa* chronic bronchiectasis isolate reveal differences from cystic fibrosis and laboratory strains. *BMC Genomics* 16:883. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2069-0>
155. Wolter DJ, Scott A, Armbruster CR, et al (2021) Repeated isolation of an antibiotic-dependent and temperature-sensitive mutant of *Pseudomonas aeruginosa* from a cystic fibrosis patient. *J Antimicrob Chemother* 76:616–625. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa482>
156. Langendonk RF, Neill DR, Fothergill JL (2021) The building blocks of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for current resistance-breaking therapies. *Front Cell Infect Microbiol* 11:. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.665759>
157. Sener Okur D, Yuruyen C, Gungor O, et al (2019) Genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Turkish children with cystic fibrosis. *Infect Drug Resist* Volume 12:675–685. <https://doi.org/10.2147/IDR.S183151>
158. Clark ST, Diaz Caballero J, Cheang M, et al (2015) Phenotypic diversity within a *Pseudomonas aeruginosa* population infecting an adult with cystic fibrosis. *Sci Rep* 5:10932. <https://doi.org/10.1038/srep10932>
159. Markussen T, Marvig RL, Gomez-Lozano M, et al (2014) Environmental heterogeneity drives within-host diversification and evolution of *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* 5:e01592-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01592-14>

160. Workentine ML, Sibley CD, Glezerson B, et al (2013) Phenotypic heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* populations in a cystic fibrosis patient. PLoS One 8:e60225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060225>
161. Camus L, Briaud P, Vandenesch F, Moreau K (2021) How bacterial adaptation to cystic fibrosis environment shapes interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Front Microbiol 12:1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.617784>
162. Rossi E, La Rosa R, Bartell JA, et al (2021) *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. Nat Rev Microbiol 19:331–342. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00477-5>
163. Cuthbertson L, Walker AW, Oliver AE, et al (2020) Lung function and microbiota diversity in cystic fibrosis. Microbiome 8:45. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00810-3>
164. Chen J-W, Lau YY, Krishnan T, et al (2018) Recent advances in molecular diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* infection by state-of-the-art genotyping techniques. Front Microbiol 9:1104–112. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01104>
165. Tyler SD, Strathdee CA, Rozee KR, Johnson WM (1995) Oligonucleotide primers designed to differentiate pathogenic *Pseudomonas* on the basis of the sequencing of genes coding for 16S-23S rRNA internal transcribed spacers. Clin Diagn Lab Immunol 2:448–53. <https://doi.org/10.1128/cdli.2.4.448-453.1995>
166. Deschaght P, Van Daele S, De Baets F, Vaneechoutte M (2011) PCR and the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory samples of CF patients. A literature review. J Cyst Fibros 10:293–7. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2011.05.004>
167. Auda IG, Al-Kadmy IMS, Kareem SM, et al (2017) RAPD- and ERIC-based typing of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates. J AOAC Int 100:532–536. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0267>
168. Vaněrková M, Mališová B, Kotásková I, et al (2017) Biofilm formation, antibiotic susceptibility and RAPD genotypes in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from single centre intensive care unit patients. Folia Microbiol (Praha) 62:531–538. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0526-7>
169. Hematzadeh A, Haghkhal M (2021) Biotyping of isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human infections by RAPD and ERIC-PCR. Heliyon 7:e07967. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07967>
170. Nazik H, Ongen B, Erturan Z, Salcioğlu M (2007) Genotype and antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from cystic fibrosis patients. Jpn J Infect Dis 60:82–6
171. Picard E, Aviram M, Yahav Y, et al (2004) Familial concordance of phenotype and microbial variation among siblings with CF. Pediatr Pulmonol 38:292–297. <https://doi.org/10.1002/ppul.20111>
172. Ortiz-Herrera M, Gerónimo-Gallegos A, Cuevas-Schacht F, et al (2004) Caracterización, por RAPD PCR de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística. Salud Publica Mex 46:149–157
173. Middleton MA, Layeghifard M, Klingel M, et al (2018) Epidemiology of clonal *Pseudomonas aeruginosa* infection in a canadian cystic fibrosis population. Ann

- Am Thorac Soc 15:827–836. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201801-007OC>
174. Hendricks MR, Lashua LP, Fischer DK, et al (2016) Respiratory syncytial virus infection enhances *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth through dysregulation of nutritional immunity. Proc Natl Acad Sci 113:1642–1647. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516979113>
 175. Granchelli AM, Adler FR, Keogh RH, et al (2018) Microbial interactions in the cystic fibrosis airway. J Clin Microbiol 56:. <https://doi.org/10.1128/JCM.00354-18>
 176. Van den Bossche S, De Broe E, Coenye T, et al (2021) The cystic fibrosis lung microenvironment alters antibiotic activity: causes and effects. Eur Respir Rev 30:210055. <https://doi.org/10.1183/16000617.0055-2021>
 177. Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA (2011) Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 24:29–70. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-10>
 178. Blanchard AC, Horton E, Stanojevic S, et al (2017) Effectiveness of a stepwise *Pseudomonas aeruginosa* eradication protocol in children with cystic fibrosis. J Cyst Fibros 16:395–400. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.01.007>
 179. Waters V, Smyth A (2015) Cystic fibrosis microbiology: Advances in antimicrobial therapy. J Cyst Fibros 14:551–560. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.02.005>
 180. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, et al (2019) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnol Adv 37:177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
 181. Saderi H, Owlia P (2015) Detection of multidrug resistant (MDR) and extremely drug resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in Tehran, Iran. Iran J Pathol 10:265–71
 182. Zahedani SS, Tahmasebi H, Jahantigh M (2021) Coexistence of virulence factors and efflux pump genes in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: Analysis of biofilm-forming strains from Iran. Int J Microbiol 2021:1–8. <https://doi.org/10.1155/2021/5557361>
 183. Cystic Fibrosis Foundation (2016) Patient registry annual data report 2015
 184. Malone J (2015) Role of small colony variants in persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis lungs. Infect Drug Resist 237. <https://doi.org/10.2147/IDR.S68214>
 185. Wang CY, Jerng JS, Cheng KY, et al (2006) Pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalised patients: clinical features, risk-factors and outcomes. Clin Microbiol Infect 12:63–68. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01305.x>
 186. John A, Goździk-Spychalska J, Durda-Masny M, et al (2021) *Pseudomonas aeruginosa*, the type of mutation, lung function, and nutritional status in adults with cystic fibrosis. Nutrition 89:111221. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2021.111221>
 187. Jansen G, Mahrt N, Tueffers L, et al (2016) Association between clinical antibiotic resistance and susceptibility of *Pseudomonas* in the cystic fibrosis lung. Evol Med Public Heal 2016:182–194. <https://doi.org/10.1093/emph/eow016>
 188. Rosales-Reyes R, Rodríguez-Alvarado M, Lezana-Fernández JL, et al (2020) *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cohort of mexican children with cystic fibrosis show adaptation to a chronic phenotype. Pediatr Infect Dis J 39:899–906.

- <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002714>
189. Pelegrin AC, Palmieri M, Mirande C, et al (2021) *Pseudomonas aeruginosa*: a clinical and genomics update. FEMS Microbiol Rev 45:.. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab026>
 190. Pournajaf A, Razavi S, Irajian G, et al (2018) Integron types, antimicrobial resistance genes, virulence gene profile, alginate production and biofilm formation in Iranian cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Le Infez Med 26:226–236
 191. Nolan PJ, Jain R, Cohen L, et al (2021) In vitro activity of ceftolozane-tazobactam and ceftazidime-avibactam against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis. Diagn Microbiol Infect Dis 99:115204. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115204>
 192. Petrova G, Strateva T, Miteva D, et al (2016) Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* before and after initiation of inhaled tobramycin in Bulgaria. J Infect Dev Ctries 10:1265–1267. <https://doi.org/10.3855/jidc.7658>
 193. d'Angelo I, Perfetto B, Costabile G, et al (2016) Large porous particles for sustained release of a decoy oligonucleotide and poly(ethylenimine): Potential for combined therapy of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. Biomacromolecules 17:1561–1571. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b01646>
 194. Colvin KM, Irie Y, Tart CS, et al (2012) The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. Environ Microbiol 14:1913–1928. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x>
 195. Ochoa SA, Cruz-Córdova A, Rodea GE, et al (2015) Phenotypic characterization of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from pediatric patients associated to biofilm formation. Microbiol Res 172:68–78. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.11.005>
 196. Li X-F, Shi H-Q, Liang Y, et al (2022) Interaction of biofilm and efflux pump in clinical isolates of carbapenem resistant *P. aeruginosa*. Eur Rev Med Pharmacol Sci 26:1729–1737. https://doi.org/10.26355/eurrev_202203_28242
 197. Niu C, Gilbert ES (2004) Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. Appl Environ Microbiol 70:6951–6. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.6951-6956.2004>
 198. Coenye T, Nelis HJ (2010) In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. J Microbiol Methods 83:89–105. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.08.018>
 199. Flynn KM, Dowell G, Johnson TM, et al (2016) Evolution of ecological diversity in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* by altered cyclic diguanylate signaling. J Bacteriol 198:2608–18. <https://doi.org/10.1128/JB.00048-16>
 200. Vidya P, Smith L, Beaudoin T, et al (2016) Chronic infection phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* are associated with failure of eradication in children with cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 35:67–74. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2509-4>
 201. van Duuren JBJH, Músken M, Karge B, et al (2017) Use of single-frequency impedance spectroscopy to characterize the growth dynamics of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. Sci Rep 7:5223.

- <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05273-5>
202. Gonçalves-de-Albuquerque CF, Silva AR, Burth P, et al (2016) Possible mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa*-associated lung disease. *Int J Med Microbiol* 306:20–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.11.001>
 203. Lam JS, Taylor VL, Islam ST, et al (2011) Genetic and functional diversity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Front Microbiol* 2:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00118>
 204. Ghafoor A, Hay ID, Rehm BHA (2011) Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl Environ Microbiol* 77:5238–5246. <https://doi.org/10.1128/AEM.00637-11>
 205. Starkey M, Hickman JH, Ma L, et al (2009) *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. *J Bacteriol* 191:3492–3503. <https://doi.org/10.1128/JB.00119-09>
 206. Harmsen M, Yang L, Pamp SJ, Tolker-Nielsen T (2010) An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59:253–268. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00690.x>
 207. Schurr MJ (2013) Which bacterial biofilm exopolysaccharide is preferred, Psl or alginate? *J Bacteriol* 195:1623–1626. <https://doi.org/10.1128/JB.00173-13>
 208. Ratajczak M, Kamińska D, Nowak-Malczewska D, et al (2021) Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, genes coding virulence factors and source of origin of *Pseudomonas aeruginosa*; clinical strains. *Ann Agric Environ Med* 28:306–313. <https://doi.org/10.26444/aaem/122682>
 209. Karballaei Mirzahosseini H, Hadadi-Fishani M, Morshedi K, Khaledi A (2020) Meta-analysis of biofilm formation, antibiotic resistance pattern, and biofilm-related genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples. *Microb Drug Resist* 26:815–824. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0274>
 210. Almeida MM, Freitas MT, Folescu TW, et al (2021) Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in chronic lung infection: Current resistance profile and hypermutability in patients with cystic fibrosis. *Curr Microbiol* 78:696–704. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02337-0>
 211. Zemanick ET, Wagner BD, Robertson CE, et al (2017) Airway microbiota across age and disease spectrum in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 50:1700832. <https://doi.org/10.1183/13993003.00832-2017>
 212. Bhagirath AY, Li Y, Somayajula D, et al (2016) Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulm Med* 16:174. <https://doi.org/10.1186/s12890-016-0339-5>
 213. McGarry ME, Huang C-Y, Nielson DW, Ly NP (2021) Early acquisition and conversion of *Pseudomonas aeruginosa* in Hispanic youth with cystic fibrosis in the United States. *J Cyst Fibros* 20:424–431. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2020.10.002>
 214. Pallett R, Leslie LJ, Lambert PA, et al (2019) Anaerobiosis influences virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates and the interaction with *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep* 9:6748. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42952-x>

215. Malhotra S, Hayes D, Wozniak DJ (2019) Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and regional inflammation in the cystic fibrosis lung. *J Cyst Fibros* 18:796–803. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.04.009>
216. Planet PJ (2022) Adaptation and evolution of pathogens in the cystic fibrosis lung. *J Pediatric Infect Dis Soc* 11:S23–S31. <https://doi.org/10.1093/jpids/piac073>
217. Burns JL, Rolain J-M (2014) Culture-based diagnostic microbiology in cystic fibrosis: Can we simplify the complexity? *J Cyst Fibros* 13:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2013.09.004>
218. Rosenfeld M, Ramsey BW, Gibson RL (2003) *Pseudomonas* acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. *Curr Opin Pulm Med* 9:492–497. <https://doi.org/10.1097/00063198-200311000-00008>
219. O'Toole GA (2018) Cystic fibrosis airway microbiome: Overturning the old, opening the way for the new. *J Bacteriol* 200:. <https://doi.org/10.1128/JB.00561-17>
220. Scotet V, L'Hostis C, Férec C (2020) The changing epidemiology of cystic fibrosis: incidence, survival and impact of the *CFTR* gene discovery. *Genes (Basel)* 11:589. <https://doi.org/10.3390/genes11060589>
221. Bergeron C, Cantin AM (2021) New therapies to correct the cystic fibrosis basic defect. *Int J Mol Sci* 22:6193. <https://doi.org/10.3390/ijms22126193>
222. Laborda P, Sanz-García F, Hernando-Amado S, Martínez JL (2021) *Pseudomonas aeruginosa*: an antibiotic resilient pathogen with environmental origin. *Curr Opin Microbiol* 64:125–132. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.09.010>
223. Lopes SP, Ceri H, Azevedo NF, Pereira MO (2012) Antibiotic resistance of mixed biofilms in cystic fibrosis: impact of emerging microorganisms on treatment of infection. *Int J Antimicrob Agents* 40:260–263. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.04.020>
224. Gregory G, Anderson (2012) *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the CF lung and its implications for therapy. In: *Cystic Fibrosis - Renewed Hopes Through Research*. InTech
225. Bartell JA, Sommer LM, Marvig RL, et al (2021) Omics-based tracking of *Pseudomonas aeruginosa* persistence in “eradicated” cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 57:2000512. <https://doi.org/10.1183/13993003.00512-2020>
226. Blanchard AC, Waters VJ (2019) Microbiology of cystic fibrosis airway disease. *Semin Respir Crit Care Med* 40:727–736. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1698464>
227. Le Guern F, Mussard V, Gaucher A, et al (2020) Fluorescein derivatives as fluorescent probes for pH monitoring along recent biological applications. *Int J Mol Sci* 21:9217. <https://doi.org/10.3390/ijms21239217>
228. Corzo-Delgado JE, Gómez-Mateos JM (2006) *Stenotrophomonas maltophilia*, un patógeno nosocomial de importancia creciente. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24:1–3. <https://doi.org/10.1157/13083366>
229. Rojas-Rojas FU, López-Sánchez D, Meza-Radilla G, et al (2019) El controvertido complejo *Burkholderia cepacia*, un grupo de especies promotoras del crecimiento vegetal y patógenas de plantas, animales y humanos. *Rev Argent*

- Microbiol 51:84–92. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.01.002>
230. Davies E V., James CE, Brockhurst MA, Winstanley C (2017) Evolutionary diversification of *Pseudomonas aeruginosa* in an artificial sputum model. BMC Microbiol 17:3–13. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0916-z>
 231. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis 18:318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
 232. Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S (2014) Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. RSC Adv 4:3974–3983. <https://doi.org/10.1039/C3RA44507K>
 233. Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS, Yadav V (2016) Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. Front Microbiol 7:1831. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831>
 234. Shnoudeh AJ, Hamad I, Abdo RW, et al (2019) Synthesis, characterization, and applications of metal nanoparticles. In: Biomaterials and Bionanotechnology. Elsevier, pp 527–612
 235. Wu G, Zheng Y, Zhou H, et al (2015) Safety and pharmacokinetics of dicloxacillin in healthy Chinese volunteers following single and multiple oral doses. Drug Des Devel Ther 9:5687. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S92117>
 236. Hobman JL, Crossman LC (2015) Bacterial antimicrobial metal ion resistance. J Med Microbiol 64:471–497. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.023036-0>
 237. Sawa T, Momiyama K, Mihara T, et al (2020) Molecular epidemiology of clinically high-risk *Pseudomonas aeruginosa* strains: Practical overview. Microbiol Immunol 64:331–344. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12776>

16. Anexos.

- Anexo 1. Reconocimiento de cepas de referencia de *P. aeruginosa* con F23~AgNPs (OD_{402}).

	Valores de absorbancia a OD_{402}									
	SOBRENADANTE 1					SOBRENADANTE 2				
	Repetición			\bar{X}	SD	Repetición			\bar{X}	SD
	1	2	3			1	2	3		
Control negativo (PBS 0.1X)	-0.001	0.000	0.001	0.000	0.001	-0.001	0.000	0.001	0.000	0.001

Cepas no-inactivadas	ATCC® 27853™	0.006	0.006	0.006	0.006	0.000	0.017	0.016	0.017	0.017	0.001
	ATCC® 27855™	0.006	0.006	0.005	0.006	0.001	0.020	0.022	0.023	0.022	0.002
	ATCC® 15692™	0.003	0.005	0.002	0.003	0.002	0.019	0.019	0.021	0.020	0.001
	<i>P. alcaligenes</i>	0.010	0.016	0.009	0.012	0.004	0.013	0.016	0.021	0.017	0.004
	<i>B. cepacia</i>	0.010	0.010	0.007	0.009	0.002	0.008	0.009	0.010	0.009	0.001
	<i>S. maltophilia</i>	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.022	0.025	0.022	0.023	0.002

Cepas inactivadas	ATCC® 27853™	0.015	0.006	0.008	0.010	0.005	0.051	0.055	0.039	0.048	0.008
	ATCC® 27855™	0.003	0.004	0.006	0.004	0.002	0.044	0.041	0.045	0.043	0.002
	ATCC® 15692™	0.008	0.007	0.009	0.008	0.001	0.044	0.045	0.044	0.044	0.001
	<i>P. alcaligenes</i>	0.015	0.016	0.014	0.015	0.001	0.009	0.015	0.013	0.012	0.003
	<i>B. cepacia</i>	0.012	0.013	0.012	0.012	0.001	0.008	0.008	0.006	0.007	0.001
	<i>S. maltophilia</i>	0.010	0.007	0.008	0.008	0.002	0.012	0.006	0.009	0.009	0.003

Pie de tabla: \bar{X} = Media de los valores obtenidos y SD= Desviación estándar

○ Anexo 2. Características demográficas de las cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

No.	Cepa	Fenotipo colonial	Tipo de muestra	INFORMACIÓN DEL HOSPEDERO				
				Px	Registro INP	Sexo	Edad	Tratamiento
1	Pa01r	NM	Esputo	Px01	494492	F	5 años	S/T
2	Pa02m	Mucoide	Esputo	Px02	419317	M	11 años	GM/CIP
3	Pa03m	Mucoide	Esputo	Px16	455149	F		S/T
4	Pa05r	NM	Esputo	Px19	457698	M	7 años	AN/CAZ
5	Pa06r	NM	Esputo	Px23	495206	M	10 años	MEM/VAN
6	Pa12r	NM	ANF	Px06	495924	F	10 meses	AN/CAZ
7	Pa17ma	Mucoide	ABA	Px24	451319	M	8 años	S/T
8	Pa17mb	Mucoide	ABA	Px24	451319	M	8 años	S/T
9	Pa21ma	Mucoide	Esputo	Px19	457698	M	7 años	S/T
10	Pa21mb	Mucoide	Esputo	Px19	457698	M	7 años	S/T
11	Pa22r	NM	Esputo	Px12	471468	M	5 años	CIP
12	Pa25r	NM	Esputo	Px23	495206	M	10 años	S/T
13	Pa26r	NM	Esputo	Px19	457698	M	7 años	CAZ/AN/DX
14	Pa27ma	Mucoide	Esputo	Px02	419317	M	15 años	S/T
15	Pa27mb	Mucoide	Esputo	Px02	419317	M	15 años	S/T
16	Pa27r	NM	Esputo	Px02	419317	M	15 años	S/T
17	Pa28m	Mucoide	ABA	Px02	419317	M	15 años	AN/CAZ
18	Pa29ma	Mucoide	Esputo	Px02	419317	M	15 años	S/T
19	Pa29mb	Mucoide	Esputo	Px02	419317	M	15 años	S/T
20	Pa32r	NM	ABA	Px13	469557	F	6 años	AZM
21	Pa33ra	NM	ABA	Px21	454078	F	9 años	GM
22	Pa33rb	NM	ABA	Px21	454078	F	9 años	GM
23	Pa34m	Mucoide	Esputo	Px19	457698	M	7 años	AN/CAZ
24	Pa34r	NM	Esputo	Px19	457698	M	7 años	AN/CAZ
25	Pa35ma	Mucoide	LBA	Px19	457698	M	7 años	S/T
26	Pa35mb	Mucoide	LBA	Px19	457698	M	7 años	S/T
27	Pa35r	NM	LBA	Px19	457698	M	7 años	S/T
28	Pa36ma	Mucoide	Esputo	Px19	457698	M	7 años	AN/CAZ
29	Pa36mb	Mucoide	Esputo	Px19	457698	M	7 años	AN/CAZ
30	Pa36mc	Mucoide	Esputo	Px19	457698	M	7 años	AN/CAZ
31	Pa37ma	Mucoide	LBA	Px19	457698	M	7 años	S/T
32	Pa37mb	Mucoide	LBA	Px19	457698	M	7 años	S/T
33	Pa39m	Mucoide	SB	Px19	457698	M	8 años	S/T
34	Pa39r	NM	SB	Px19	457698	M	8 años	S/T
35	Pa47r	NM	ANF	Px05	501060	F	7 meses	AN/CAZ
36	Pa50ma	Mucoide	Esputo	Px24	451319	M	9 años	AN/CAZ
37	Pa50mb	Mucoide	Esputo	Px24	451319	M	9 años	AN/CAZ
38	Pa50mc	Mucoide	Esputo	Px24	451319	M	9 años	AN/CAZ
39	Pa51ma	Mucoide	LBA	Px24	451319	M	9 años	AN/CAZ
40	Pa51mb	Mucoide	LBA	Px24	451319	M	9 años	AN/CAZ
41	Pa53m	Mucoide	LBA	Px03	494302	F	1 año	S/T
42	Pa53ra	NM	LBA	Px03	494302	F	1 año	S/T

43	Pa53rb	NM	LBA	Px03	494302	F	1 año	S/T
44	Pa54ma	Mucoide	LBA	Px04	504411	F	8 años	S/T
45	Pa54mb	Mucoide	LBA	Px04	504411	F	8 años	S/T
46	Pa54ra	NM	LBA	Px04	504411	F	8 años	S/T
47	Pa54rb	NM	LBA	Px04	504411	F	8 años	S/T
48	Pa57r	NM	SB	Px04	504411	F	8 años	AN/CAZ
49	Pa58m	Mucoide	SB	Px03	494302	F	2 años	CAZ
50	Pa58ra	NM	SB	Px03	494302	F	2 años	CAZ
51	Pa58rb	NM	SB	Px03	494302	F	2 años	CAZ
52	Pa59r	NM	SB	Px12	471468	M	2 años	AN/CAZ
53	Pa60m	Mucoide	Esputo	Px03	494302	F	2 años	DX/AN
54	Pa60r	NM	Esputo	Px03	494302	F	2 años	DX/AN
55	Pa64m	Mucoide	Esputo	Px20	504682	M	4 años	AN/CAZ
56	Pa65r	NM	Esputo	Px18	503048	F	7 meses	S/T
57	Pa70m	Mucoide	LBA	Px10	451767	M	12 años	AN/CAZ
58	Pa70r	NM	LBA	Px10	451767	M	12 años	AN/CAZ
59	Pa73r	NM	ABA	Px26	454012	M	13 años	S/T
60	Pa77ma	Mucoide	EXP	Px08	483845	M	7 años	AN/CAZ
61	Pa77mb	Mucoide	EXP	Px08	483845	M	7 años	AN/CAZ
62	Pa77r	NM	EXP	Px08	483845	M	7 años	AN/CAZ
63	Pa78r	NM	Esputo	Px25	455826	F	13 años	AN/CAZ
64	Pa82ma	Mucoide	Esputo	Px10	451767	M	12 años	AN/CAZ
65	Pa82mb	Mucoide	Esputo	Px10	451767	M	12 años	AN/CAZ
66	Pa82r	NM	Esputo	Px10	451767	M	12 años	AN/CAZ
67	Pa83ma	Mucoide	SB	Px10	451767	M	12 años	AN/CAZ
68	Pa83mb	Mucoide	SB	Px10	451767	M	12 años	AN/CAZ
69	Pa83r	NM	SB	Px10	451767	M	12 años	AN/CAZ
70	Pa84ra	NM	Esputo	Px19	457698	M	4 años	AN/CAZ
71	Pa84rb	NM	Esputo	Px19	457698	M	4 años	AN/CAZ
72	Pa84rc	NM	Esputo	Px19	457698	M	4 años	AN/CAZ
73	Pa88ma	Mucoide	LBA	Px09	459413	M	8 años	S/T
74	Pa88mb	Mucoide	LBA	Px09	459413	M	8 años	S/T
75	Pa88ra	NM	LBA	Px09	459413	M	8 años	S/T
76	Pa88rb	NM	LBA	Px09	459413	M	8 años	S/T
77	Pa90m	Mucoide	EXP	Px24	451319	M	10 años	S/T
78	Pa91ra	NM	EXP	Px19	457698	M	9 años	AZM
79	Pa91rb	NM	EXP	Px19	457698	M	9 años	AZM
80	Pa91rc	NM	EXP	Px19	457698	M	9 años	AZM
81	Pa94r	NM	ANF	Px07	508993	F	6 años	AN/CAZ/DX
82	Pa98ra	NM	LBA	Px04	504411	F	9 años	S/T
83	Pa98rb	NM	LBA	Px04	504411	F	9 años	S/T
84	Pa99ra	NM	LBA	Px11	439782	M	12 años	S/T
85	Pa99rb	NM	LBA	Px11	439782	M	12 años	S/T
86	Pa100r	NM	ABA	Px14	490272	M	3 años	S/T
87	Pa102m	Mucoide	LBA	Px22	465452	M	13 años	S/T
88	Pa102ra	NM	LBA	Px22	465452	M	13 años	S/T
89	Pa102rb	NM	LBA	Px22	465452	M	13 años	S/T
90	Pa102rc	NM	LBA	Px22	465452	M	13 años	S/T

91	Pa102rd	NM	LBA	Px22	465452	M	13 años	S/T
92	Pa102re	NM	LBA	Px22	465452	M	13 años	S/T
93	Pa106ra	NM	EXP	Px21	454078	F	12 años	AN/CAZ/DX
94	Pa106rb	NM	EXP	Px21	454078	F	12 años	AN/CAZ/DX
95	Pa106rc	NM	EXP	Px21	454078	F	12 años	AN/CAZ/DX
96	Pa107r	NM	EXP	Px27	413151	F	17 años	S/T
97	Pa111m	Mucoide	LBA	Px13	469557	F	8 años	S/T
98	Pa112ma	Mucoide	LBA	Px17	48681	M	4 años	S/T
99	Pa112mb	Mucoide	LBA	Px17	48681	M	4 años	S/T
100	Pa112r	NM	LBA	Px17	48681	M	4 años	S/T
101	Pa114ra	NM	LBA	Px28	514175	M	1 año	AN/CAZ
102	Pa114rb	NM	LBA	Px28	514175	M	1 año	AN/CAZ
103	Pa115m	Mucoide	Esputo	Px19	457698	F	10 años	AN/CAZ
104	Pa115ra	NM	Esputo	Px19	457698	F	10 años	AN/CAZ
105	Pa115rb	NM	Esputo	Px19	457698	F	10 años	AN/CAZ
106	Pa115rc	NM	Esputo	Px19	457698	F	10 años	AN/CAZ
107	Pa116m	Mucoide	LBA	Px01	494492	F	7 años	S/T
108	Pa116ra	NM	LBA	Px01	494492	F	7 años	S/T
109	Pa116rb	NM	LBA	Px01	494492	F	7 años	S/T
110	Pa116rc	NM	LBA	Px01	494492	F	7 años	S/T
111	Pa117ma	Mucoide	Esputo	Px19	457698	M	10 años	AN/CAZ
112	Pa117mb	Mucoide	Esputo	Px19	457698	M	10 años	AN/CAZ
113	Pa117mc	Mucoide	Esputo	Px19	457698	M	10 años	AN/CAZ
114	Pa117ra	NM	Esputo	Px19	457698	M	10 años	AN/CAZ
115	Pa117rb	NM	Esputo	Px19	457698	M	10 años	AN/CAZ
116	Pa117rc	NM	Esputo	Px19	457698	M	10 años	AN/CAZ
117	Pa118ma	Mucoide	Esputo	Px19	457698	M	10 años	CAZ/AN/SXT/AZM
118	Pa118mb	Mucoide	Esputo	Px19	457698	M	10 años	CAZ/AN/SXT/AZM
119	Pa118mc	Mucoide	Esputo	Px19	457698	M	10 años	CAZ/AN/SXT/AZM
120	Pa119r	NM	Esputo	Px21	454078	F	12 años	AN/CAZ
121	Pa120ma	Mucoide	Esputo	Px19	457698	M	10 años	MEM
122	Pa120mb	Mucoide	Esputo	Px19	457698	M	10 años	MEM
123	Pa120ra	NM	Esputo	Px19	457698	M	10 años	MEM
124	Pa120rb	NM	Esputo	Px19	457698	M	10 años	MEM
125	Pa120rc	NM	Esputo	Px19	457698	M	10 años	MEM
126	Pa122r	NM	Esputo	Px12	471468	M	8 años	CAZ/DX
127	Pa124ra	NM	LBA	Px19	457698	M	11 años	S/T
128	Pa124rb	NM	LBA	Px19	457698	M	11 años	S/T
129	Pa124rc	NM	LBA	Px19	457698	M	11 años	S/T
130	Pa125r	NM	Esputo	Px15	427864	M	17 años	S/T

Pie de tabla: No.= Número consecutivo de cepa; Px= Paciente; NM= No-mucoide; ANF= Aspirado nasofaríngeo; ABA= Aspirado bronco-alveolar; EXP= Expectoración; LBA = Lavado bronco-alveolar; SB= Secreción bronquial; F= Femenino; M= Masculino; S/T= Sin tratamiento; AN= Amikacina CAZ= Cefotaxima; GM= Gentamicina; CIP= Ciprofloxacina; MEM= Meropenem; VAN= Vancomicina; DX= Dicloxacilina; AZM=Azitromicina; SXT= Trimetoprima/ Sulfametoxazol.

○ Anexo 3. Valores de pureza de cada DNAg bacteriano.

CEPA	DNA (ng/μL)	Relación 260/280	Relación 260/230
ATTC® 27853™	527	1.99	2.2
ATTC® 27855™	1764	2.13	2.41
ATCC® 15692™	403	2.04	2.25
<i>P. alcaligenes</i>	1105	1.96	2.54
<i>B. cepacia</i>	4322	2.18	2.23
<i>S. maltophilia</i>	7118	2.21	2.21
Pa01r	1550	2.13	2.33
Pa02m	1292	2.11	2.38
Pa03m	315	2.03	2.43
Pa05r	1035	2.09	2.29
Pa06r	2462	2.1	1.81
Pa12r	1094	2.06	2.31
Pa17ma	1967	2.09	2.33
Pa17mb	363	2.01	2.17
Pa21ma	3573	2.05	1.8
Pa21mb	2640	2.08	2.32
Pa22r	3134	2.12	2.42
Pa25r	1628	2.04	2.42
Pa26r	3997	2.15	2.03
Pa27ma	3042	2.11	2.07
Pa27mb	2014	2.14	2.38
Pa27r	670	2.09	2.34
Pa28m	615	2.07	2.37
Pa29ma	2380	2.12	2.37
Pa29mb	1030	2.07	2.29
Pa32r	1902	2.17	2.4
Pa33ra	656	2.02	2.42
Pa33rb	597	2.03	1.93
Pa34m	704	2.02	2.42
Pa34r	866	2.04	2.37
Pa35ma	922	2.12	2.31
Pa35mb	678	2.06	2.4
Pa35r	1434	2.07	2.3
Pa36ma	1335	2.1	2.33
Pa36mb	552	2.02	1.87
Pa36mc	962	2.09	2.41
Pa37ma	2451	2.11	2.08
Pa37mb	4196	2.13	2.19
Pa39m	2558	2.1	1.85
Pa39r	516	2.09	2.37
Pa47r	3082	2.13	2.36
Pa50ma	1005	2.13	2.34
Pa50mb	908	2.02	2.26

Pa50mc	2028	2.11	2.36
Pa51ma	1654	2.11	2.53
Pa51mb	1655	2.07	2.34
Pa53m	2338	2.15	2.35
Pa53ra	356	1.87	2.2
Pa53rb	2127	2.1	2.37
Pa54ma	1156	2.08	2.21
Pa54mb	2107	2.1	2.48
Pa54ra	931	2.04	2.23
Pa54rb	661	1.85	1.93
Pa57r	1089	2.1	2.33
Pa58m	1179	2.12	2.29
Pa58ra	1510	2.11	2.29
Pa58rb	3733	2.21	2.34
Pa59r	2794	2.11	2.32
Pa60m	1207	2.12	2.25
Pa60r	2570	2.1	2.37
Pa64m	3238	2.1	2.37
Pa65r	1788	2.11	2.41
Pa70m	160	1.74	2.22
Pa70r	1105	2	2.14
Pa73r	3934	2.12	2.42
Pa77ma	2085	2.08	2.41
Pa77mb	2185	2.08	2.31
Pa77r	3005	2.1	2.41
Pa78r	3976	2.11	2.47
Pa82ma	791	2.09	2.63
Pa82mb	2765	2.17	2.27
Pa82r	567	2.01	2.24
Pa83ma	1366	2.1	2.48
Pa83mb	915	2.05	2.58
Pa83r	2299	2.11	2.47
Pa84ra	623	2.09	2.47
Pa84rb	1144	2.08	2.55
Pa84rc	711	1.96	2.42
Pa88ma	5050	2.21	2.28
Pa88mb	1033	2.05	1.92
Pa88ra	5958	2.04	1.8
Pa88rb	781	2.03	2.41
Pa90m	1243	2.07	2.33
Pa91ra	710	2.01	2.16
Pa91rb	2551	2.08	2.31
Pa91rc	523	1.99	2.14
Pa94r	1106	2.04	2.37
Pa98ra	5097	2.1	2.05

Pa98rb	402	2.02	2.32
Pa99ra	631	2.01	2.12
Pa99rb	385	1.97	1.97
Pa100r	697	2.01	2
Pa102m	1017	2.06	2.27
Pa102ra	1156	1.99	1.94
Pa102rb	1095	2.04	1.95
Pa102rc	205	2.03	2.46
Pa102rd	1730	2.05	2.19
Pa102re	728	1.9	2.25
Pa106ra	1801	2.06	2.35
Pa106rb	2037	2.09	2.34
Pa106rc	612	2.01	1.81
Pa107r	598	2.02	2.08
Pa111m	2320	2.09	1.81
Pa112ma	1722	2.09	2.13
Pa112mb	768	1.95	2.14
Pa112r	534	2	2.05
Pa114ra	2662	2.09	2.36
Pa114rb	1333	2.01	2.09
Pa115m	1175	1.97	2.13
Pa115ra	206	1.78	2.28
Pa115rb	3725	2.2	2.37
Pa115rc	1676	2.19	2.26
Pa116m	319	1.93	2.04
Pa116ra	1256	2	2.46
Pa116rb	381	1.88	2.2
Pa116rc	612	2.01	1.98
Pa117ma	1935	2.03	2.43
Pa117mb	1161	1.9	1.92
Pa117mc	1525	2	2.39
Pa117ra	1022	2.04	2.37
Pa117rb	946	2.04	2.34
Pa117rc	4130	2.12	1.84
Pa118ma	894	2.03	2.42
Pa118mb	449	2	2.45
Pa118mc	3386	2.06	2.04
Pa119r	532	1.81	2.31
Pa120ma	284	1.75	2.41
Pa120mb	1541	2.07	2.12
Pa120ra	1071	2.06	2.39
Pa120rb	425	2.02	2.36
Pa120rc	997	2.05	2.17
Pa122r	3470	2.08	2.09
Pa124ra	1185	2.01	2.25
Pa124rb	2897	1.99	2.07
Pa124rc	2571	2.09	2.32
Pa125r	480	1.93	2.14

○ Anexo 4. Resumen de identificación molecular de cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

CEPA	16S-23S rDNA ITS	Antígeno O de la acetilasa
ATTC® 27853™	+	+
ATTC® 27855™	+	+
ATCC® 15692™	+	+
<i>P. alcaligenes</i>	Negativo	Negativo
<i>B. cepacia</i>	Negativo	Negativo
<i>S. maltophilia</i>	Negativo	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	+	+
Pa36ma	+	+
Pa36mb	+	+
Pa36mc	+	+
Pa37ma	+	+
Pa37mb	+	+
Pa39m	+	+
Pa39r	+	+
Pa47r	+	+
Pa50ma	+	+

Pa50mb	+	+
Pa50mc	+	+
Pa51ma	+	+
Pa51mb	+	+
Pa53m	+	+
Pa53ra	+	+
Pa53rb	+	+
Pa54ma	+	+
Pa54mb	+	+
Pa54ra	+	+
Pa54rb	+	+
Pa57r	+	+
Pa58m	+	+
Pa58ra	+	+
Pa58rb	Negativo	Negativo
Pa59r	+	+
Pa60m	+	+
Pa60r	+	+
Pa64m	+	+
Pa65r	+	+
Pa70m	+	+
Pa70r	+	+
Pa73r	Negativo	+
Pa77ma	+	+
Pa77mb	+	+
Pa77r	+	+
Pa78r	+	+
Pa82ma	+	Negativo
Pa82mb	+	+
Pa82r	+	+
Pa83ma	+	+
Pa83mb	+	+
Pa83r	+	+
Pa84ra	+	+
Pa84rb	+	+
Pa84rc	+	+
Pa88ma	+	+
Pa88mb	+	+
Pa88ra	+	+
Pa88rb	+	+
Pa90m	+	+
Pa91ra	+	+
Pa91rb	+	+
Pa91rc	+	+
Pa94r	+	+

Pa98ra	Negativo	Negativo
Pa98rb	+	+
Pa99ra	+	+
Pa99rb	+	+
Pa100r	+	+
Pa102m	+	+
Pa102ra	+	+
Pa102rb	+	+
Pa102rc	Negativo	Negativo
Pa102rd	+	+
Pa102re	+	+
Pa106ra	Negativo	Negativo
Pa106rb	Negativo	Negativo
Pa106rc	Negativo	Negativo
Pa107r	Negativo	Negativo
Pa111m	+	+
Pa112ma	+	+
Pa112mb	+	+
Pa112r	+	+
Pa114ra	Negativo	Negativo
Pa114rb	Negativo	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	+	+
--------	---	---

Pie de tabla: + = Visualización del amplicón con el peso molecular esperado; Filas sombreadas= Cepas excluidas del estudio.

○ Anexo 5. Antibiograma de las cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

No.	CEPA	Resistencia	Px	Familia de antibióticos																		
				PEN		CEF				MON	CARB		AMG			FLQ				POL		
				CRB	PIP	CTX	CAZ	CRO	FEP	AZM	IPM	MEM	AN	CN	NET	LVX	CIP	OFX	NOR	CL	PB	
1	Pa01r	DR1	Px01	S	I	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	Pa02m	MDR	Px02	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	I	S	I	S	S	S	S
3	Pa03m	XDR	Px16	I	R	R	S	R	R	R	I	R	S	S	I	R	I	R	R	S	S	S
4	Pa05r	MDR	Px19	S	S	R	S	R	S	I	R	I	S	S	S	I	I	I	R	S	S	S
5	Pa06r	MDR	Px23	S	I	R	S	R	S	R	R	R	I	S	I	R	S	S	S	S	S	S
6	Pa12r	DR1	Px06	I	I	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	Pa17ma	DR1	Px24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
8	Pa17mb	DR2	Px24	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	I	R	I	S	S	S
9	Pa21ma	DR1	Px19	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	I	R	S	S	S	S
10	Pa21mb	DR2	Px19	S	S	R	S	I	S	R	S	S	S	S	S	I	I	I	S	S	S	S
11	Pa22r	DR1	Px12	S	S	R	S	I	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	Pa25r	MDR	Px23	R	I	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	I	S	R	S	S	S	S
13	Pa26r	MDR	Px19	I	I	R	S	R	S	I	I	S	R	I	S	I	S	R	S	S	S	S
14	Pa27ma	MDR	Px02	S	R	R	I	R	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
15	Pa27mb	MDR	Px02	S	I	R	S	I	R	S	S	S	R	R	R	R	I	R	S	S	S	S
16	Pa27r	MDR	Px02	S	R	I	S	S	I	S	S	S	I	R	R	I	S	R	S	S	S	S
17	Pa28m	MDR	Px02	R	R	R	S	S	I	I	S	S	R	R	R	I	S	R	S	S	S	S
18	Pa29ma	MDR	Px02	S	I	R	S	R	R	S	S	S	R	R	R	I	I	S	S	S	S	S
19	Pa29mb	MDR	Px02	S	I	R	S	R	S	S	S	R	I	I	I	I	S	S	S	S	S	S
20	Pa32r	DR2	Px13	S	I	R	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
21	Pa33ra	DR2	Px21	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
22	Pa34m	DR2	Px19	S	S	R	S	I	S	S	S	S	I	I	I	I	S	S	S	S	S	S
23	Pa34r	DR2	Px19	S	I	R	S	I	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
24	Pa35ma	MDR	Px19	S	S	R	S	R	S	S	I	I	R	R	R	I	S	I	S	S	S	S
25	Pa35mb	MDR	Px19	S	I	I	I	R	S	S	S	I	R	R	R	I	S	S	S	S	S	S
26	Pa35r	MDR	Px19	S	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	I	S	S	S	S	S	S
27	Pa36ma	XDR	Px19	I	I	R	R	R	I	I	S	I	S	S	R	R	I	R	R	S	S	S
28	Pa36mb	MDR	Px19	R	R	R	I	I	S	R	S	S	R	R	R	R	I	R	I	S	S	S

29	Pa36mc	MDR	Px19	S	S	R	S	R	S	R	S	I	R	R	R	I	S	S	S	S	S		
30	Pa37ma	DR2	Px19	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S		
31	Pa37mb	MDR	Px19	I	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	I	I	I	S	S	S		
32	Pa39m	DR2	Px19	S	I	I	S	I	S	S	S	S	R	I	I	S	S	S	S	S	S		
33	Pa39r	MDR	Px19	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	I	R	S	S	S		
34	Pa47r	MDR	Px05	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S		
35	Pa50ma	PanS	Px24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
36	Pa50mb	DR1	Px24	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S		
37	Pa50mc	DR2	Px24	S	S	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S		
38	Pa51ma	MDR	Px24	S	I	I	S	S	S	S	I	S	I	I	S	I	S	R	S	S	S		
39	Pa51mb	MDR	Px24	S	I	I	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S		
40	Pa53m	MDR	Px03	S	I	R	S	R	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
41	Pa53ra	DR1	Px03	S	S	I	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
42	Pa53rb	DR2	Px03	I	I	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S		
43	Pa54ma	PanS	Px04	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
44	Pa54mb	MDR	Px04	R	I	I	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S		
45	Pa54ra	MDR	Px04	S	I	R	S	I	S	I	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S		
46	Pa54rb	PanS	Px04	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
47	Pa57r	PanS	Px04	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
48	Pa58m	PanS	Px03	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
49	Pa58ra	DR2	Px03	S	I	I	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
50	Pa59r	MDR	Px12	R	I	I	S	I	S	S	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S		
51	Pa60m	DR1	Px03	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
52	Pa60r	DR1	Px03	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
53	Pa64m	PanS	Px20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
54	Pa65r	DR1	Px18	S	S	I	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
55	Pa70m	XDR	Px10	R	I	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	
56	Pa70r	XDR	Px10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	
57	Pa77ma	MDR	Px08	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	
58	Pa77mb	DR2	Px08	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	
59	Pa77r	MDR	Px08	S	S	R	S	S	I	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	
60	Pa78r	DR2	Px25	S	I	R	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
61	Pa82mb	XDR	Px10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
62	Pa82r	XDR	Px10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S

63	Pa83ma	XDR	Px10	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	
64	Pa83mb	XDR	Px10	R	I	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
65	Pa83r	XDR	Px10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
66	Pa84ra	MDR	Px19	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	
67	Pa84rb	MDR	Px19	S	I	R	S	I	I	S	S	S	R	I	I	S	S	S	S	S	S	
68	Pa84rc	MDR	Px19	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	
69	Pa88ma	XDR	Px09	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
70	Pa88mb	XDR	Px09	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
71	Pa88ra	MDR	Px09	I	I	I	S	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
72	Pa88rb	MDR	Px09	R	R	I	S	I	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
73	Pa90m	PanS	Px24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
74	Pa91ra	PanS	Px19	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
75	Pa91rb	MDR	Px19	S	I	I	S	S	S	I	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
76	Pa91rc	MDR	Px19	S	I	R	S	I	I	I	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S
77	Pa94r	DR2	Px07	S	S	R	S	I	S	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
78	Pa98rb	MDR	Px04	S	S	I	S	I	R	I	R	I	I	R	I	S	S	S	S	S	S	S
79	Pa99ra	DR2	Px11	S	S	I	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
80	Pa99rb	DR2	Px11	S	S	R	S	I	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
81	Pa100r	DR2	Px14	I	I	R	S	I	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
82	Pa102m	PanS	Px22	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
83	Pa102ra	DR1	Px22	I	I	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
84	Pa102rb	DR1	Px22	I	I	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
85	Pa102rd	DR1	Px22	R	I	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
86	Pa102re	PanS	Px22	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
87	Pa111m	PanS	Px13	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
88	Pa112ma	DR2	Px17	S	I	I	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
89	Pa112mb	DR2	Px17	S	I	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
90	Pa112r	MDR	Px17	R	R	R	I	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S
91	Pa115m	PanS	Px19	S	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
92	Pa115ra	DR1	Px19	S	I	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
93	Pa115rb	DR1	Px19	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
94	Pa115rc	DR2	Px19	S	I	R	S	I	S	S	S	S	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S
95	Pa116m	DR1	Px01	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
96	Pa116ra	DR1	Px01	S	I	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

97	Pa116rb	<i>DR1</i>	Px01	S	I	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
98	Pa116rc	<i>PanS</i>	Px01	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
99	Pa117ma	<i>MDR</i>	Px19	S	I	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S
100	Pa117mb	<i>MDR</i>	Px19	S	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S
101	Pa117mc	<i>MDR</i>	Px19	S	R	R	S	I	I	S	S	S	S	S	S	R	I	R	I	S	S
102	Pa117ra	<i>MDR</i>	Px19	S	R	R	S	R	S	I	S	R	S	S	S	I	R	R	S	S	S
103	Pa117rb	<i>MDR</i>	Px19	S	R	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	I	I	R	I	S	S
104	Pa117rc	<i>DR2</i>	Px19	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S
105	Pa118ma	<i>MDR</i>	Px19	S	I	I	S	I	I	S	S	S	S	S	S	I	I	R	S	S	S
106	Pa118mb	<i>MDR</i>	Px19	S	S	I	S	S	I	S	I	S	I	S	R	S	S	S	S	S	S
107	Pa118mc	<i>MDR</i>	Px19	S	I	R	S	I	I	S	S	S	S	S	S	I	I	R	S	S	S
108	Pa119r	<i>DR2</i>	Px21	S	S	I	S	I	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
109	Pa120ma	<i>MDR</i>	Px19	S	I	R	S	I	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	I	S	S
110	Pa120mb	<i>MDR</i>	Px19	S	I	R	S	R	I	S	S	S	I	I	S	R	R	R	I	S	S
111	Pa120ra	<i>MDR</i>	Px19	S	I	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
112	Pa120rb	<i>MDR</i>	Px19	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S
113	Pa120rc	<i>XDR</i>	Px19	S	I	R	S	I	R	I	R	I	R	R	R	I	I	I	S	S	S
114	Pa122r	<i>MDR</i>	Px12	S	I	R	S	R	S	I	S	S	R	R	R	I	S	S	S	S	S
115	Pa124ra	<i>XDR</i>	Px19	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
116	Pa124rb	<i>XDR</i>	Px19	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
117	Pa124rc	<i>XDR</i>	Px19	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S
118	Pa125r	<i>MDR</i>	Px15	S	R	R	R	R	R	R	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S

Pie de tabla: No.= Número consecutivo de cepa; Px= Paciente; S= Sensibilidad al antibiótico; I= Resistencia intermedia; R = Resistencia. En las familias de antibióticos: PEN= Penicilinas; CEF= Cefalosporinas; MON= Monobactámicos; CARB= Carbapenémicos; AMG= Aminoglucósidos; FLQ= Fluoroquinolonas y POL= Polimixinas. Los antibióticos sugeridos por el CLSI [140] fueron: PIP= Piperacilina; CAZ= Ceftazidime; FEP= Cefepime; AZM= Aztreonam; IPM= Imipenem; MEM= Meropenem; AN= Amikacina; CN= Gentamicina; NET= Netilmicina; LVX= Levofloxacin; CIP= Ciprofloxacina; OFX= Ofloxacina; CL= Colistina y PB= Polimixina B. **Columnas sombreadas**= Antibióticos adicionales y no sugeridos por el CLSI [140]: **CRB= Carbenicilina; CTX= Cefotaxime; CRO= Ceftriaxona y NOR= Norfloxacina.**

○ Anexo 6. Cepas clínicas de *P. aeruginosa* seleccionadas para la evaluación del establecimiento de biopelículas.

No.	CEPA	FENOTIPO COLONIAL	RESISTENCIA	PACIENTE	CLUSTER DE SIMILITUD
1	Pa01r	No-mucoide	<i>DR1</i>	Px01	29
2	Pa02m	Mucoide	<i>MDR</i>	Px02	46
3	Pa03m	Mucoide	<i>XDR</i>	Px16	7
4	Pa06r	No-mucoide	<i>MDR</i>	Px23	37
5	Pa12r	No-mucoide	<i>DR1</i>	Px06	39
6	Pa17mb	Mucoide	<i>DR2</i>	Px24	32
7	Pa21ma	Mucoide	<i>DR1</i>	Px19	10
8	Pa21mb	Mucoide	<i>DR2</i>	Px19	9
9	Pa22r	No-mucoide	<i>DR1</i>	Px12	42
10	Pa25r	No-mucoide	<i>MDR</i>	Px23	38
11	Pa27ma	Mucoide	<i>MDR</i>	Px02	44
12	Pa27mb	Mucoide	<i>MDR</i>	Px02	45
13	Pa27r	No-mucoide	<i>MDR</i>	Px02	45
14	Pa28m	Mucoide	<i>MDR</i>	Px02	1
15	Pa29ma	Mucoide	<i>MDR</i>	Px02	2
16	Pa32r	No-mucoide	<i>DR2</i>	Px13	3
17	Pa33ra	No-mucoide	<i>DR2</i>	Px21	5
18	Pa34r	No-mucoide	<i>DR2</i>	Px19	11
19	Pa35mb	Mucoide	<i>MDR</i>	Px19	14
20	Pa36ma	Mucoide	<i>XDR</i>	Px19	13
21	Pa36mb	Mucoide	<i>MDR</i>	Px19	17
22	Pa36mc	Mucoide	<i>MDR</i>	Px19	15
23	Pa37ma	Mucoide	<i>DR2</i>	Px19	16
24	Pa37mb	Mucoide	<i>MDR</i>	Px19	16
25	Pa47r	No-mucoide	<i>MDR</i>	Px05	6
26	Pa50ma	Mucoide	<i>PanS</i>	Px24	32
27	Pa50mb	Mucoide	<i>DR1</i>	Px24	32
28	Pa51mb	Mucoide	<i>MDR</i>	Px24	32
29	Pa53m	Mucoide	<i>MDR</i>	Px03	19
30	Pa53rb	No-mucoide	<i>DR2</i>	Px03	19
31	Pa54ma	Mucoide	<i>PanS</i>	Px04	33
32	Pa54mb	Mucoide	<i>MDR</i>	Px04	35
33	Pa54ra	No-mucoide	<i>MDR</i>	Px04	34
34	Pa57r	No-mucoide	<i>PanS</i>	Px04	33
35	Pa58m	Mucoide	<i>PanS</i>	Px03	40
36	Pa60m	Mucoide	<i>DR1</i>	Px03	40
37	Pa60r	No-mucoide	<i>DR1</i>	Px03	40
38	Pa64m	Mucoide	<i>PanS</i>	Px20	8
39	Pa65r	No-mucoide	<i>DR1</i>	Px18	21
40	Pa77ma	Mucoide	<i>MDR</i>	Px08	31
41	Pa77mb	Mucoide	<i>DR2</i>	Px08	31

42	Pa77r	No-mucoide	<i>MDR</i>	Px08	31
43	Pa82mb	Mucoide	<i>XDR</i>	Px10	22
44	Pa83r	No-mucoide	<i>XDR</i>	Px10	22
45	Pa84rc	No-mucoide	<i>MDR</i>	Px19	9
46	Pa88ma	Mucoide	<i>XDR</i>	Px09	36
47	Pa88ra	No-mucoide	<i>MDR</i>	Px09	36
48	Pa88rb	No-mucoide	<i>MDR</i>	Px09	36
49	Pa91ra	No-mucoide	<i>PanS</i>	Px19	15
50	Pa94r	No-mucoide	<i>DR2</i>	Px07	23
51	Pa98rb	No-mucoide	<i>MDR</i>	Px04	26
52	Pa99rb	No-mucoide	<i>DR2</i>	Px11	24
53	Pa100r	No-mucoide	<i>DR2</i>	Px14	25
54	Pa102m	Mucoide	<i>PanS</i>	Px22	41
55	Pa102rd	No-mucoide	<i>DR1</i>	Px22	41
56	Pa102re	No-mucoide	<i>PanS</i>	Px22	41
57	Pa111m	Mucoide	<i>PanS</i>	Px13	4
58	Pa112ma	Mucoide	<i>DR2</i>	Px17	27
59	Pa112r	No-mucoide	<i>MDR</i>	Px17	27
60	Pa115m	Mucoide	<i>PanS</i>	Px19	17
61	Pa115rb	No-mucoide	<i>DR1</i>	Px19	17
62	Pa115rc	No-mucoide	<i>DR2</i>	Px19	17
63	Pa116m	Mucoide	<i>DR1</i>	Px01	29
64	Pa116ra	No-mucoide	<i>DR1</i>	Px01	30
65	Pa116rb	No-mucoide	<i>DR1</i>	Px01	20
66	Pa116rc	No-mucoide	<i>PanS</i>	Px01	20
67	Pa117ma	Mucoide	<i>MDR</i>	Px19	17
68	Pa117mb	Mucoide	<i>MDR</i>	Px19	9
69	Pa117rc	No-mucoide	<i>DR2</i>	Px19	9
70	Pa120mb	Mucoide	<i>MDR</i>	Px19	13
71	Pa120rb	No-mucoide	<i>MDR</i>	Px19	12
72	Pa120rc	No-mucoide	<i>XDR</i>	Px19	17
73	Pa122r	No-mucoide	<i>MDR</i>	Px12	43
74	Pa124ra	No-mucoide	<i>XDR</i>	Px19	18
75	Pa124rb	No-mucoide	<i>XDR</i>	Px19	12
76	Pa125r	No-mucoide	<i>MDR</i>	Px15	28

○ Anexo 7. Establecimiento de biopelículas de cepas de referencia de *P. aeruginosa*.

Tiempo	Ensayo	Repetición	Valores de absorbancia a OD_{540}			
			Control Negativo	Cepas de referencia de <i>P. aeruginosa</i> (ATCC®)		
				27853™	27855™	15692™

24h	1	1	0.0004	0.4117	0.3287	0.1601
		2	0.0006	0.4382	0.3858	0.1515
		3	0.0008	0.4982	0.3875	0.1618
		4	0.0006	0.4732	0.3468	0.1885
	2	1	0.0002	0.3626	0.3849	0.1566
		2	0.0001	0.3876	0.4751	0.1594
		3	0.0004	0.3772	0.3726	0.1458
		4	0.0006	0.4506	0.4126	0.1631
	3	1	0.0018	0.3663	0.3046	0.1429
		2	0.0002	0.4179	0.3551	0.1612
		3	0.0001	0.4196	0.3121	0.1736
		4	6E-05	0.3694	0.3741	0.1599

48h	1	1	0.0005	0.6148	0.1265	0.1088
		2	0.0004	0.5768	0.1182	0.1051
		3	0.0006	0.6157	0.1315	0.1064
		4	0.0003	0.61	0.1325	0.0825
	2	1	0.0006	0.5719	0.6202	0.0916
		2	0.0004	0.6292	0.6619	0.0882
		3	0.0004	0.5476	0.7457	0.1141
		4	0.0009	0.6209	0.7349	0.1004
	3	1	0.0005	0.6542	0.6902	0.0942
		2	0.0008	0.5598	0.6703	0.0839
		3	0.0008	0.6205	0.6526	0.1002
		4	0.0011	0.5545	0.6079	0.1045

72h	1	1	0.0006	0.3571	0.54	0.1621
		2	0.0007	0.3667	0.4963	0.1408
		3	0.0003	0.3844	0.5853	0.1405
		4	0.0003	0.3684	0.635	0.1705
	2	1	0.0003	0.4717	0.5987	0.1766
		2	0.0007	0.3737	0.5476	0.1796
		3	0.0003	0.4517	0.3993	0.1153
		4	0.0003	0.431	0.4059	0.0939
	3	1	0.0007	0.5694	0.4467	0.1457
		2	0.0004	0.618	0.4809	0.1488
		3	0.0006	0.6333	0.7982	0.1528
		4	6.00E-05	0.5063	0.8005	0.1405

○ Anexo 8. Establecimiento de biopelículas de cepas clínicas de *P. aeruginosa* (24 h).

Muestra	Valores de absorbancia a OD_{540}											
	Ensayo 1				Ensayo 2				Ensayo 3			
	Repetición				Repetición				Repetición			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Control negativo	0.0004	0.0006	0.0008	0.0006	0.0002	0.0001	0.0004	0.0006	0.0018	0.0002	0.0001	6E-05
Pa01r	0.2006	0.2109	0.2222	0.2052	0.2163	0.2026	0.2046	0.2206	0.2187	0.2297	0.2277	0.2384
Pa02m	0.0227	0.0192	0.0209	0.0216	0.0156	0.0199	0.0156	0.0176	0.0251	0.0254	0.0204	0.0204
Pa03m	0.0211	0.0267	0.0244	0.0214	0.0396	0.0302	0.0316	0.0212	0.0079	0.0066	0.0086	0.0113
Pa06r	0.0491	0.0511	0.0447	0.0474	0.0462	0.0502	0.0512	0.0536	0.0423	0.0423	0.0449	0.0446
Pa12r	0.1397	0.1341	0.1541	0.1277	0.1432	0.1322	0.1319	0.1399	0.1289	0.1279	0.1219	0.1179
Pa17mb	0.1711	0.1837	0.1714	0.1792	0.0922	0.1332	0.1639	0.1846	0.1589	0.1319	0.1286	0.1649
Pa21ma	0.0144	0.0176	0.0159	0.0182	0.0149	0.0172	0.0169	0.0163	0.0111	0.0137	0.0184	0.0191
Pa21mb	0.0861	0.0704	0.0787	0.0831	0.0982	0.0822	0.0959	0.0889	0.0859	0.0846	0.0753	0.0743
Pa22r	0.0524	0.0381	0.0504	0.0514	0.0959	0.0869	0.0782	0.1019	0.0729	0.0856	0.0703	0.0853
Pa25r	0.0697	0.0714	0.0684	0.0731	0.0739	0.0842	0.0636	0.0716	0.0589	0.0669	0.0659	0.0596
Pa27ma	0.0021	0.0006	0.0004	0.0014	0.0059	0.0032	0.0029	0.0042	0.0056	0.0011	0.0039	0.0016
Pa27mb	0.0476	0.0426	0.0412	0.0439	0.0369	0.0433	0.0373	0.0429	0.0431	0.0481	0.0497	0.0517
Pa27r	0.0376	0.0372	0.0352	0.0346	0.0356	0.0423	0.0363	0.0329	0.0534	0.0504	0.0491	0.0504
Pa28m	0.0532	0.0416	0.0589	0.0452	0.0636	0.0742	0.0649	0.0769	0.0728	0.0622	0.0768	0.0662
Pa29ma	0.0016	0.0069	0.0152	0.0089	0.0069	0.0066	0.0052	0.0066	0.1348	0.0122	0.0095	0.0082
Pa32r	0.0512	0.0642	0.0789	0.0706	0.0822	0.0916	0.0829	0.0946	0.0942	0.0972	0.0982	0.0995
Pa33ra	0.0039	0.0012	0.0024	0.0016	0.0022	0.0019	0.0016	0.0022	0.0025	0.0022	0.0012	0.0018
Pa34r	0.0722	0.0459	0.0542	0.0642	0.0692	0.0679	0.0726	0.0702	0.0725	0.0938	0.0702	0.0908
Pa35mb	0.0106	0.0229	0.0116	0.0122	0.0406	0.0209	0.0379	0.0292	0.0465	0.0305	0.0648	0.0232
Pa36ma	0.0476	0.0282	0.0432	0.0832	0.1329	0.1449	0.1246	0.1502	0.1738	0.1725	0.1868	0.1928
Pa36mb	0.0054	0.0048	0.0044	0.0048	0.0019	0.0022	0.0042	0.0099	0.0058	0.0062	0.0078	0.0088
Pa36mc	0.0044	0.0044	0.0041	0.0034	0.0021	0.0018	0.0018	0.0011	0.0012	0.0015	0.0002	0.0015
Pa37ma	0.0192	0.0146	0.0219	0.0226	0.0536	0.0416	0.0452	0.0542	0.0498	0.0585	0.0628	0.0755

Pa37mb	0.0028	0.0028	0.0028	0.0018	0.0009	0.0008	0.0072	0.0008	0.0145	0.0035	0.0028	0.0052
Pa47r	0.0056	0.0072	0.0072	0.0082	0.0196	0.0192	0.0216	0.0212	0.0278	0.0222	0.0218	0.1782
Pa50ma	0.0056	0.0036	0.0039	0.0049	0.0162	0.0166	0.0136	0.0169	0.0275	0.0258	0.0222	0.0225
Pa50mb	0.1435	0.1428	0.1395	0.1258	0.1591	0.1561	0.1867	0.1407	0.1034	0.0954	0.0917	0.0754
Pa51mb	0.1065	0.1078	0.1025	0.0938	0.1037	0.1007	0.1297	0.1004	0.0537	0.0641	0.0527	0.0584
Pa53m	0.0592	0.0575	0.0638	0.0702	0.0964	0.0944	0.0907	0.0671	0.0724	0.0561	0.0557	0.0581
PA53rb	0.0592	0.0595	0.0568	0.0598	0.0977	0.0881	0.0891	0.0927	0.0814	0.0704	0.0674	0.0817
Pa54ma	0.0222	0.0198	0.0185	0.0188	0.0304	0.0341	0.0277	0.0231	0.0284	0.0211	0.0301	0.0821
Pa54mb	0.1418	0.1505	0.1375	0.1385	0.1437	0.1444	0.1654	0.1501	0.1217	0.1207	0.1157	0.1347
Pa54ra	0.1865	0.1862	0.1805	0.1862	0.2497	0.2487	0.2497	0.2561	0.2457	0.2294	0.2401	0.2464
Pa57r	0.0148	0.0178	0.0195	0.0215	0.0227	0.0217	0.0241	0.0241	0.0224	0.0197	0.0224	0.0274
Pa58m	0.0028	0.0035	0.0025	0.0015	0.0013	0.0026	0.0019	0.0081	0.0021	0.0046	0.0019	0.0021
Pa60m	0.0018	0.0028	0.0022	0.0012	0.0027	0.0007	0.0033	0.0019	0.0016	0.0053	0.0151	0.0033
Pa60r	0.0018	0.0015	0.0008	0.0015	0.0057	0.0034	0.0041	0.0074	0.0124	0.0117	0.0124	0.0144
Pa64m	0.0978	0.1278	0.0875	0.0982	0.1314	0.1454	0.1474	0.1644	0.0951	0.0984	0.1221	0.1694
Pa65r	0.0282	0.0465	0.0378	0.0302	0.0437	0.0494	0.0447	0.0444	0.0547	0.0651	0.0351	0.0394
Pa77ma	0.0002	0.0028	0.0035	0.0048	0.0024	0.0024	0.0024	0.0034	0.0019	0.0033	0.0023	0.0061
Pa77mb	0.0155	0.0098	0.0065	0.0178	0.0261	0.0258	0.0221	0.0244	0.0486	0.0542	0.0536	0.0476
Pa77r	0.0055	0.0322	0.0132	0.0665	0.0144	0.0161	0.0178	0.0128	0.0292	0.0259	0.0276	0.0252
Pa82mb	0.0008	0.0012	0.0025	0.0042	0.0009	0.0008	0.0008	0.0016	0.0018	0.0016	0.0002	0.0021
Pa83r	0.2875	0.2838	0.2685	0.3288	0.2754	0.3091	0.2814	0.2968	0.2939	0.2866	0.3059	0.3052
Pa84rc	0.0018	0.0015	0.0048	0.0018	0.0021	0.0028	0.0021	0.0021	0.0022	0.0029	0.0036	0.0026
Pa88ma	0.3835	0.4498	0.4178	0.4252	0.3018	0.3054	0.3111	0.3274	0.3322	0.3239	0.3166	0.3266
Pa88ra	0.0062	0.0078	0.0082	0.0068	0.0151	0.0194	0.0164	0.0154	0.0182	0.0159	0.0159	0.0169
Pa88rb	0.0605	0.0352	0.0332	0.0355	0.0548	0.0638	0.0534	0.0641	0.0462	0.0509	0.0416	0.0442
Pa91ra	0.4772	0.4328	0.4402	0.4538	0.3294	0.3531	0.3581	0.3678	0.3386	0.3346	0.3352	0.3332
Pa94r	0.3075	0.2938	0.2798	0.2972	0.2874	0.2808	0.2838	0.3324	0.2886	0.2856	0.2872	0.2946
Pa98rb	0.2502	0.2448	0.2428	0.2465	0.2664	0.2378	0.2274	0.2454	0.2802	0.2669	0.2846	0.2606
Pa99rb	0.2292	0.2168	0.2155	0.2198	0.2488	0.2768	0.2488	0.3404	0.2552	0.2456	0.2412	0.2476
Pa100r	0.2508	0.2422	0.2335	0.2338	0.2421	0.2444	0.2424	0.2361	0.2509	0.2552	0.2509	0.2536
Pa102m	0.0502	0.0445	0.0448	0.0482	0.0524	0.0638	0.0618	0.0518	0.0602	0.0529	0.0409	0.0382

Pa102rd	0.0818	0.0905	0.0868	0.0908	0.0932	0.0892	0.0976	0.0872	0.0528	0.0441	0.0514	0.0578
Pa102re	0.0558	0.0665	0.0692	0.0618	0.0436	0.0562	0.0519	0.0662	0.0301	0.0368	0.0368	0.0314
Pa111m	0.0498	0.0485	0.0508	0.0532	0.0496	0.0476	0.0509	0.0456	0.0318	0.0314	0.0254	0.0271
Pa112ma	0.0238	0.0312	0.0265	0.0252	0.0212	0.0176	0.0166	0.0156	0.0134	0.0131	0.0134	0.0118
Pa112r	0.1525	0.1342	0.1488	0.1372	0.1749	0.1712	0.1372	0.1476	0.1688	0.1684	0.1658	0.1514
Pa115m	0.0088	0.0085	0.0068	0.0078	0.0132	0.0109	0.0106	0.0139	0.0044	0.0051	0.0051	0.0061
Pa115rb	0.3468	0.3485	0.3535	0.3402	0.3692	0.3819	0.3746	0.3902	0.3884	0.3731	0.3784	0.3734
Pa115rc	0.0818	0.0755	0.0852	0.0788	0.0702	0.0676	0.0712	0.0672	0.0421	0.0524	0.0431	0.0528
Pa116m	0.0255	0.0328	0.0332	0.0245	0.0266	0.0242	0.0242	0.0329	0.0111	0.0101	0.0088	0.0068
Pa116ra	0.0618	0.0718	0.0735	0.0622	0.0602	0.0659	0.0632	0.0679	0.0511	0.0488	0.0484	0.0478
Pa116rb	0.0455	0.0505	0.0488	0.0585	0.0539	0.0626	0.0446	0.0549	0.0381	0.0401	0.0408	0.0418
Pa116rc	0.0812	0.0865	0.0858	0.0802	0.0786	0.0702	0.0762	0.0822	0.0691	0.0728	0.0668	0.0694
Pa117ma	0.0015	0.0008	0.0008	0.0038	0.0016	0.0022	0.0009	0.0009	0.0026	0.0029	0.0029	0.0008
Pa117mb	0.0058	0.0098	0.0065	0.0135	0.0116	0.0086	0.0102	0.0156	0.0141	0.0128	0.0098	0.0114
Pa117rc	0.0031	0.0021	0.0024	0.0009	0.0011	0.0004	0.0004	0.0006	0.0049	0.0059	0.0063	0.0063
Pa120mb	0.0186	0.0176	0.0179	0.0169	0.0233	0.0256	0.0206	0.0183	0.0154	0.0194	0.0161	0.0141
Pa120rb	0.0064	0.0061	0.0061	0.0058	0.0044	0.0047	0.0031	0.0041	0.0069	0.0076	0.0073	0.0079
Pa120rc	0.0016	0.0022	0.0001	0.0019	0.0029	0.0019	0.0013	0.0033	0.0033	0.0016	0.0011	0.0016
Pa122r	0.0509	0.0502	0.0502	0.0582	0.0513	0.0493	0.0546	0.0513	0.0431	0.0411	0.0404	0.0434
Pa124ra	0.0038	0.0034	0.0028	0.0006	0.0066	0.0019	0.0043	0.0006	0.0036	0.0067	0.0311	0.0121
Pa124rb	0.0038	0.0011	0.0011	0.0072	0.0029	0.0089	0.0036	0.0023	0.0081	0.0147	0.0261	0.0091
Pa125r	0.0096	0.0072	0.0066	0.0099	0.0103	0.0096	0.0096	0.0116	0.0054	0.0067	0.0081	0.0091

○ Anexo 9. Establecimiento de biopelículas de cepas clínicas de *P. aeruginosa* (48 h).

Muestra	Valores de absorbancia a OD_{540}											
	Ensayo 1				Ensayo 2				Ensayo 3			
	Repetición				Repetición				Repetición			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Control negativo	0.0005	0.0004	0.0006	0.0003	0.0006	0.0004	0.0004	0.0009	0.0005	0.0008	0.0008	0.0011
Pa01r	0.0377	0.0454	0.0431	0.0367	0.0272	0.0339	0.0229	0.0914	0.0378	0.0328	0.0342	0.0322
Pa02m	0.0365	0.0315	0.0308	0.0308	0.0286	0.0392	0.0499	0.0396	0.0396	0.1169	0.0116	0.0362
Pa03m	0.1455	0.0708	0.0008	0.0665	0.0034	0.0031	0.0132	0.0044	0.0048	0.0048	0.0041	0.0044
Pa06r	0.0258	0.0275	0.0225	0.0215	0.0256	0.0246	0.0242	0.0269	0.0346	0.0312	0.0289	0.0219
Pa12r	0.1558	0.1458	0.1182	0.1438	0.1086	0.1109	0.1296	0.1362	0.0822	0.0859	0.0972	0.1009
Pa17mb	0.5561	0.5474	0.4607	0.3265	0.3876	0.6371	0.5314	0.3012	0.5546	0.4726	0.5285	0.5832
Pa21ma	0.0241	0.0274	0.0197	0.0224	0.0026	0.0026	0.0264	0.0247	0.0085	0.0092	0.0112	0.0122
Pa21mb	0.2022	0.1962	0.2018	0.1088	0.1992	0.0936	0.1009	0.1742	0.1082	0.1376	0.1122	0.1442
Pa22r	0.0378	0.0312	0.0315	0.0312	0.0252	0.0286	0.0266	0.0316	0.0249	0.0289	0.0292	0.0272
Pa25r	0.0242	0.0245	0.0275	0.2698	0.0306	0.0302	0.0326	0.0319	0.0289	0.0246	0.0272	0.0292
Pa27ma	0.0012	0.0008	0.0002	0.0042	0.0008	0.0011	0.0018	0.0022	0.0028	0.0024	0.0021	0.0016
Pa27mb	0.0944	0.0951	0.0994	0.0904	0.1009	0.1179	0.0731	0.0521	0.1032	0.0888	0.0935	0.1065
Pa27r	0.0547	0.0687	0.0534	0.0711	0.0341	0.0444	0.0341	0.0331	0.0682	0.0632	0.0548	0.0485
Pa28m	0.4323	0.4617	0.4873	0.518	0.2271	0.2198	0.2084	0.2348	0.1675	0.1772	0.1732	0.1818
Pa29ma	0.0197	0.0067	0.0013	0.002	0.0251	0.0084	0.0078	0.0061	0.0162	0.0148	0.0048	0.0095
Pa32r	0.1003	0.0987	0.0973	0.113	0.0901	0.0931	0.0938	0.0974	0.0885	0.0832	0.0965	0.0918
Pa33ra	0.0047	0.0037	0.0037	0.0047	0.0228	0.0184	0.0174	0.0238	0.0255	0.0435	0.0398	0.0408
Pa34r	0.6237	0.5087	0.5453	0.565	0.4771	0.6471	0.6298	0.6268	0.6135	0.4878	0.6782	0.7002
Pa35mb	0.618	0.5987	0.6387	0.636	0.7334	0.6131	0.6298	0.6221	0.5558	0.5598	0.4558	0.3892
Pa36ma	0.4967	0.5587	0.6057	0.5727	0.3771	0.3471	0.3688	0.3498	0.3352	0.3428	0.3222	0.3918
Pa36mb	0.1127	0.079	0.149	0.1197	0.1044	0.1074	0.1131	0.1471	0.1085	0.1265	0.1182	0.1375
Pa36mc	0.0003	0.0013	0.0003	0.002	0.0011	0.0011	0.0024	0.0028	0.0055	0.0052	0.0015	0.0028
Pa37ma	0.139	0.1583	0.151	0.149	0.1394	0.1734	0.1621	0.1634	0.1788	0.1722	0.1755	0.1775
Pa37mb	0.0017	0.0013	0.003	0.0027	0.0124	0.0148	0.0164	0.0254	0.0315	0.0255	0.0305	0.0248

Pa47r	0.0363	0.0303	0.0283	0.0257	0.0314	0.0408	0.0438	0.0354	0.0315	0.0365	0.0385	0.0372
Pa50ma	0.008	0.0143	0.0117	0.0127	0.0464	0.0474	0.0518	0.0704	0.0842	0.0915	0.0872	0.1065
Pa50mb	0.1951	0.1524	0.1944	0.1934	0.2057	0.159	0.1757	0.232	0.1793	0.1783	0.1679	0.1989
Pa51mb	0.1141	0.1288	0.1518	0.1838	0.1313	0.1263	0.142	0.1767	0.1053	0.1003	0.1013	0.1489
Pa53m	0.1001	0.1064	0.1058	0.1054	0.0797	0.0797	0.078	0.0943	0.0743	0.0903	0.0763	0.1616
PA53rb	0.1121	0.0921	0.0984	0.0984	0.0897	0.082	0.0877	0.0863	0.0923	0.0819	0.0923	0.1049
Pa54ma	0.1268	0.1221	0.1648	0.1414	0.1393	0.0267	0.0683	0.0893	0.1589	0.1086	0.1216	0.1219
Pa54mb	0.1178	0.1261	0.1128	0.1181	0.1357	0.1327	0.1403	0.1357	0.1333	0.1173	0.1393	0.1343
Pa54ra	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pa57r	0.1568	0.1738	0.1904	0.1818	0.0687	0.094	0.1113	0.1183	0.1256	0.1406	0.1576	0.1639
Pa58m	0.0048	0.1564	0.0451	0.0034	0.122	0.1363	0.1397	0.0203	0.1356	0.1676	0.0063	0.0011
Pa60m	0.0029	0.0284	0.0414	0.0228	0.035	0.0407	0.0513	0.0267	0.0323	0.0029	0.0326	0.0233
Pa60r	0.0334	0.0344	0.0381	0.0528	0.0017	0.0013	0.0027	0.0047	0.0039	0.0086	0.0153	0.0103
Pa64m	0.6141	0.5598	0.5101	0.4761	0.3673	0.7643	0.6337	0.4967	0.5286	0.4739	0.2953	0.6153
Pa65r	0.0291	0.0324	0.0268	0.0231	0.022	0.0337	0.035	0.0357	0.0203	0.0573	0.0273	0.0369
Pa77ma	0.0044	0.0221	0.0228	0.0068	0.0107	0.0173	0.005	0.025	0.0176	0.0043	0.0159	0.0053
Pa77mb	0.0324	0.0274	0.0268	0.0191	0.0441	0.0461	0.0331	0.0304	0.0812	0.0548	0.0748	0.0368
Pa77r	0.1598	0.1231	0.1058	0.0818	0.2237	0.1721	0.1541	0.1501	0.1895	0.1808	0.1688	0.1505
Pa82mb	0.2311	0.2328	0.2064	0.1694	0.2484	0.2311	0.2101	0.1661	0.3722	0.3165	0.2892	0.2638
Pa83r	0.4421	0.3584	0.3794	0.2854	0.2641	0.4437	0.3744	0.2881	0.5382	0.4728	0.4535	0.3652
Pa84rc	0.0011	0.0018	0.0011	0.0021	0.0063	0.0043	0.0053	0.0053	0.0012	0.0012	0.0015	0.0008
Pa88ma	0.3151	0.2651	0.2431	0.2401	0.2371	0.2451	0.2361	0.2347	0.2378	0.2195	0.2372	0.2248
Pa88ra	0.1714	0.1621	0.1508	0.1381	0.1887	0.2484	0.1941	0.1911	0.1855	0.1928	0.1955	0.1565
Pa88rb	0.3884	0.3731	0.3374	0.2348	0.3131	0.3157	0.2874	0.2054	0.2468	0.2178	0.1805	0.4455
Pa91ra	0.2394	0.2438	0.2471	0.2634	0.2174	0.2277	0.2491	0.2311	0.2162	0.2142	0.2228	0.2128
Pa94r	0.4928	0.3181	0.2728	0.3871	0.1981	0.1821	0.2034	0.2344	0.4005	0.5008	0.4925	0.3875
Pa98rb	0.1661	0.1641	0.1644	0.1604	0.1674	0.1597	0.1741	0.1604	0.2078	0.1915	0.1948	0.2772
Pa99rb	0.1688	0.2318	0.2584	0.1618	0.1564	0.1601	0.1594	0.1591	0.2552	0.2542	0.2522	0.1805
Pa100r	0.1584	0.1551	0.1628	0.1624	0.1501	0.1571	0.1624	0.1627	0.1622	0.1635	0.1655	0.1668
Pa102m	0.0038	0.0034	0.0038	0.0041	0.0057	0.0061	0.0061	0.0724	0.0132	0.0105	0.0112	0.0138
Pa102rd	0.0302	0.0286	0.0252	0.0332	0.0226	0.0196	0.0173	0.0219	0.0226	0.0236	0.0212	0.0286

Pa102re	0.0189	0.0112	0.0156	0.0109	0.0133	0.0169	0.0096	0.0133	0.0132	0.0132	0.0152	0.0199
Pa111m	0.0789	0.0792	0.0769	0.0879	0.0539	0.0573	0.0393	0.0449	0.0399	0.0309	0.0319	0.0282
Pa112ma	0.0146	0.0126	0.0092	0.0129	0.1069	0.0166	0.0143	0.0146	0.0236	0.0202	0.0399	0.0449
Pa112r	0.2252	0.2619	0.2146	0.2386	0.2269	0.1909	0.2056	0.2123	0.2786	0.2772	0.2619	0.2909
Pa115m	0.0979	0.0832	0.0786	0.0869	0.0753	0.0736	0.0759	0.0769	0.0349	0.0412	0.0319	0.0402
Pa115rb	1	1	1	1	0.8913	0.9359	0.8906	1	0.8942	0.9486	0.8946	0.8259
Pa115rc	0.4129	0.4022	0.3996	0.4142	0.5899	0.7109	0.9499	0.4236	0.7579	0.8756	0.8359	0.7692
Pa116m	0.0526	0.0696	0.0789	0.0826	0.0489	0.0666	0.0703	0.0893	0.0486	0.0529	0.0489	0.0562
Pa116ra	0.0566	0.0566	0.0522	0.0629	0.0549	0.0473	0.0463	0.0656	0.0519	0.0552	0.0506	0.0569
Pa116rb	0.0142	0.0136	0.0152	0.0146	0.0096	0.0173	0.0143	0.0099	0.0162	0.0169	0.0119	0.0136
Pa116rc	0.0469	0.0479	0.0522	0.0439	0.0416	0.0376	0.0416	0.0396	0.0419	0.0442	0.0482	0.0459
Pa117ma	0.0586	0.0982	0.0786	0.0646	0.0313	0.0356	0.0476	0.0489	0.0096	0.0202	0.0106	0.0332
Pa117mb	0.1709	0.1799	0.1652	0.1672	0.1819	0.1463	0.1903	0.1309	0.1726	0.2562	0.2549	0.2422
Pa117rc	0.5604	0.0557	0.0574	0.0554	0.0581	0.0454	0.0414	0.0401	0.0392	0.0262	0.0208	0.0258
Pa120mb	0.0734	0.0814	0.0804	0.0831	0.0781	0.0941	0.0867	0.0931	0.0525	0.0655	0.0782	0.0948
Pa120rb	0.0036	0.0026	0.0023	0.0026	0.0029	0.0036	0.0016	0.0019	0.0025	0.0052	0.0035	0.0015
Pa120rc	0.0014	0.0007	0.0014	0.0021	0.0013	0.0016	0.0301	0.0013	0.0028	0.0022	0.0032	0.0025
Pa122r	0.1207	0.0984	0.0881	0.1077	0.0209	0.0209	0.0206	0.0206	0.0542	0.0528	0.0515	0.0558
Pa124ra	0.0009	0.0013	0.0009	0.0009	0.0019	0.0013	0.0013	0.0007	0.0015	0.0012	0.0025	0.0008
Pa124rb	0.0016	0.0013	0.0024	0.0009	0.0007	0.0021	0.0014	0.0007	0.0008	0.0012	0.0005	0.0022
Pa125r	0.0247	0.0307	0.0407	0.0371	0.0261	0.0264	0.0311	0.0301	0.0085	0.0108	0.0065	0.0088

○ Anexo 10. Establecimiento de biopelículas de cepas clínicas de *P. aeruginosa* (72 h).

Muestra	Valores de absorbancia a OD_{540}											
	Ensayo 1				Ensayo 2				Ensayo 3			
	Repetición				Repetición				Repetición			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Control negativo	0.0006	0.0007	0.0003	0.0003	0.0003	0.0007	0.0003	0.0003	0.0007	0.0004	0.0006	6E-05
Pa01r	0.0137	0.0134	0.0163	0.0094	0.009	0.0107	0.0998	0.1082	0.0124	0.1167	0.0117	0.0107
Pa02m	0.1377	0.1474	0.1457	0.0287	0.1603	0.1527	0.1497	0.1587	0.2093	0.165	0.16	0.1563
Pa03m	0.0023	0.0017	0.0014	0.0009	0.002	0.0037	0.003	0.002	0.0013	0.005	0.0087	0.004
Pa06r	0.0287	0.0171	0.0264	0.0254	0.0257	0.029	0.028	0.022	0.0247	0.027	0.026	0.0323
Pa12r	0.2111	0.1994	0.2074	0.2177	0.204	0.2277	0.264	0.2243	0.2433	0.1953	0.2297	0.259
Pa17mb	0.3104	0.2134	0.2821	0.2474	0.277	0.2707	0.217	0.221	0.3227	0.2817	0.36	0.38
Pa21ma	0.2717	0.267	0.2697	0.2717	0.4002	0.3975	0.4342	0.4845	0.1774	0.2747	0.2094	0.4344
Pa21mb	0.1461	0.2087	0.1851	0.2087	0.1327	0.1417	0.1623	0.1317	0.1777	0.17	0.167	0.1583
Pa22r	0.0434	0.0394	0.0417	0.0301	0.0273	0.0247	0.0313	0.2437	0.0377	0.0263	0.04	0.027
Pa25r	0.0687	0.0647	0.0527	0.0861	0.0533	0.053	0.0457	0.052	0.0383	0.0403	0.0423	0.0363
Pa27ma	0.0013	0.0021	0.0024	0.0014	0.0017	0.0017	0.0027	0.0027	0.005	0.004	0.004	0.007
Pa27mb	0.237	0.2767	0.269	0.283	0.2573	0.2738	0.2735	0.2388	0.2551	0.2331	0.2251	0.0283
Pa27r	0.0274	0.0263	0.0347	0.021	0.0245	0.0258	0.0308	0.0298	0.0321	0.0341	0.0211	0.0451
Pa28m	0.2344	0.2447	0.2441	0.2421	0.1034	0.1101	0.1044	0.1421	0.1294	0.1304	0.1528	0.1478
Pa29ma	0.0083	0.0083	0.0076	0.0086	0.0304	0.0084	0.0029	0.0033	0.1464	0.1938	0.1121	0.1668
Pa32r	0.1394	0.1327	0.1091	0.1527	0.1374	0.1391	0.1044	0.1341	0.1518	0.1661	0.1571	0.1311
Pa33ra	0.0324	0.0384	0.0371	0.0347	0.0954	0.0039	0.0397	0.0951	0.1541	0.1504	0.1378	0.1388
Pa34r	0.3951	0.4031	0.2721	0.3281	0.3704	0.3054	0.3147	0.3144	0.4831	0.4941	0.3754	0.5168
Pa35mb	0.6551	0.6371	0.7464	0.7294	0.7597	0.7791	0.7441	0.7731	0.7054	0.7314	0.6438	0.7341
Pa36ma	0.1101	0.1317	0.1581	0.1611	0.1917	0.1977	0.2167	0.2151	0.2801	0.2884	0.2488	0.2528
Pa36mb	0.1611	0.1094	0.1024	0.1111	0.1001	0.1057	0.1237	0.1311	0.1331	0.1691	0.1478	0.1548
Pa36mc	0.0151	0.1361	0.0307	0.0467	0.1374	0.0707	0.1284	0.1414	0.1564	0.2144	0.1351	0.2061
Pa37ma	0.1707	0.1857	0.1454	0.1264	0.1241	0.1537	0.1061	0.1447	0.1658	0.1771	0.1318	0.1771
Pa37mb	0.0964	0.0984	0.0724	0.0847	0.1234	0.2494	0.2684	0.4091	0.1951	0.2634	0.2234	0.2884

Pa47r	0.0311	0.0681	0.0617	0.0771	0.0664	0.0664	0.0747	0.0614	0.0548	0.0664	0.1081	0.1058
Pa50ma	0.0901	0.0764	0.0597	0.0637	0.1857	0.1467	0.1907	0.2284	0.3094	0.3111	0.3241	0.3271
Pa50mb	0.1173	0.1063	0.1453	0.1337	0.1219	0.1169	0.1049	0.1283	0.1202	0.1086	0.1039	0.1649
Pa51mb	0.103	0.162	0.182	0.2587	0.1916	0.1616	0.2876	0.1856	0.3102	0.1626	0.2149	0.2659
Pa53m	0.0863	0.0647	0.0943	0.0903	0.1243	0.0976	0.1109	0.0949	0.0652	0.0852	0.1039	0.1516
PA53rb	0.05	0.058	0.052	0.0583	0.0796	0.0879	0.0766	0.0873	0.0889	0.0922	0.0936	0.0899
Pa54ma	0.0267	0.0273	0.0167	0.053	0.0699	0.0549	0.0936	0.0496	0.0196	0.0246	0.0266	0.0409
Pa54mb	0.091	0.097	0.0947	0.0967	0.0669	0.0863	0.0836	0.0973	0.0659	0.1052	0.0879	0.1066
Pa54ra	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pa57r	0.056	0.0673	0.064	0.0853	0.0869	0.1009	0.1073	0.1309	0.1652	0.1596	0.1756	0.1969
Pa58m	0.1857	0.0957	0.1613	0.0603	0.1409	0.1496	0.1599	0.2553	0.2319	0.2142	0.1006	0.0242
Pa60m	0.0563	0.0177	0.0047	0.0073	0.0649	0.0469	0.0543	0.0473	0.0479	0.0946	0.0892	0.1309
Pa60r	0.0233	0.007	0.0173	0.027	0.0659	0.0633	0.0546	0.6169	0.0469	0.0552	0.0689	0.8262
Pa64m	0.4957	0.5517	0.3867	0.6037	0.6776	0.6943	0.7389	0.7283	0.6012	0.7982	0.6452	0.7879
Pa65r	0.044	0.051	0.0583	0.06	0.0436	0.0436	0.0476	0.0486	0.0292	0.0302	0.0496	0.0299
Pa77ma	0.0067	0.0093	0.0093	0.0137	0.0039	0.0039	0.0083	0.0049	0.0116	0.0082	0.0099	0.0109
Pa77mb	0.0038	0.0041	0.0095	0.0081	0.0053	0.0039	0.0099	0.0049	0.0161	0.0175	0.0141	0.0165
Pa77r	0.2038	0.1608	0.1361	0.0915	0.1596	0.1763	0.0973	0.0686	0.2308	0.2055	0.1655	0.1151
Pa82mb	0.2608	0.2005	0.2065	0.2315	0.2573	0.2326	0.2409	0.2366	0.2345	0.2245	0.2288	0.2478
Pa83r	0.2155	0.2941	0.2661	0.2035	0.2549	0.2493	0.2716	0.2646	0.1901	0.2048	0.2045	0.2065
Pa84rc	0.0035	0.0055	0.0045	0.0221	0.0014	0.0017	0.0011	0.0011	0.0011	0.0001	0.0001	0.0015
Pa88ma	0.3478	0.3851	0.2688	0.3625	0.2463	0.2813	0.2749	0.2723	0.3435	0.2425	0.3125	0.2535
Pa88ra	0.4521	0.5111	0.4861	0.4368	0.3863	0.4339	0.3713	0.3986	0.5121	0.3448	0.4188	0.4171
Pa88rb	0.7171	0.6231	0.4088	0	0.8029	0.5333	0.3499	0.2879	0.6188	0.4725	0.4038	0.3751
Pa91ra	0.4735	0.4311	0.5011	0.4465	0.3193	0.4099	0.3306	0.3466	0.3791	0.3755	0.3405	0.3621
Pa94r	0.3378	0.3861	0.4035	0.5411	0.3223	0.2639	0.3086	0.3483	0.3275	0.3611	0.3581	0.2535
Pa98rb	0.1541	0.1488	0.1598	0.1421	0.1599	0.1553	0.1653	0.1689	0.1728	0.1765	0.1788	0.1831
Pa99rb	0.1755	0.2208	0.3018	0.1578	0.3209	0.1949	0.1983	0.2409	0.1678	0.1775	0.1608	0.1785
Pa100r	0.3331	0.3171	0.3218	0.3285	0.1776	0.1879	0.1956	0.1863	0.1511	0.1575	0.1655	0.1841
Pa102m	0.0278	0.0241	0.0338	0.0271	0.0079	0.0086	0.0129	0.1033	0.0045	0.0045	0.0055	0.0105
Pa102rd	0.061	0.0473	0.0473	0.054	0.0463	0.0407	0.0383	0.037	0.1015	0.0975	0.0692	0.0582

Pa102re	0.0037	0.0037	0.004	0.004	0.02	0.0213	0.0017	0.0097	0.0098	0.0152	0.0568	0.0395
Pa111m	0.088	0.0793	0.0733	0.0697	0.09	0.064	0.086	0.0767	0.1072	0.0995	0.0905	0.0928
Pa112ma	0.0867	0.009	0.009	0.0133	0.0217	0.0127	0.025	0.0287	0.0808	0.0608	0.0562	0.0682
Pa112r	0.3763	0.384	0.5057	0.3657	0.2917	0.2437	0.3087	0.5087	0.5512	0.4665	0.3372	0.5768
Pa115m	0.1013	0.0833	0.083	0.081	0.2173	0.1243	0.0807	0.055	0.0228	0.0085	0.0295	0.0212
Pa115rb	1	1	1	1	0.5283	1	1	1	0.6462	0.8415	0.8212	1
Pa115rc	0.8483	0.9023	0.827	0.869	0.0723	0.1097	0.1027	0.1433	1	1	1	1
Pa116m	0.135	0.164	0.1487	0.1807	0.0637	0.073	0.065	0.0727	0.0772	0.1392	0.1488	0.1478
Pa116ra	0.0533	0.0523	0.058	0.0693	0.016	0.0153	0.0153	0.0207	0.0805	0.0772	0.0705	0.0782
Pa116rb	0.0123	0.0157	0.0143	0.0167	0.06	0.0467	0.038	0.043	0.0138	0.0145	0.0188	0.0155
Pa116rc	0.0257	0.0163	0.018	0.0137	0.105	0.0927	0.1107	0.122	0.0622	0.0472	0.0688	0.0605
Pa117ma	0.1047	0.1307	0.1413	0.1447	0.1153	0.1137	0.1137	0.113	0.0905	0.1195	0.1145	0.1145
Pa117mb	0.103	0.101	0.091	0.0857	0	0	0	0	0.1312	0.1398	0.1128	0.1762
Pa117rc	0.165	0.1397	0.1573	0.143	0.1275	0.1155	0.1152	0.1248	0.0397	0.0277	0.0304	0.0854
Pa120mb	0.1717	0.2043	0.197	0.2127	0.2085	0.1852	0.2022	0.1962	0.2074	0.1644	0.1931	0.1021
Pa120rb	0.0023	0.0013	0.008	0.0073	0.0055	0.0022	0.0012	0.0028	0.0021	0.0034	0.0004	0.0026
Pa120rc	0.0007	0.003	0.006	0.0007	0.0015	0.0012	0.0005	0.0022	0.0007	0.0007	0.0011	0.0014
Pa122r	0.2683	0.2397	0.2477	0.2523	0.2635	0.2442	0.2445	0.2602	0.2031	0.2441	0.1784	0.2014
Pa124ra	0.001	0.001	0.0013	0.0007	0.0025	0.0018	0.0008	0.0032	0.0016	0.0013	0.0016	0.0016
Pa124rb	0.0013	0.002	0.0007	0.0007	0.0008	0.0018	0.0012	0.0022	0.0019	0.0019	0.0009	0.0004
Pa125r	0.2007	0.205	0.2233	0.198	0.1302	0.2192	0.3688	0.1815	0.2134	0.0504	0.0327	0.4547

○ Anexo 11. Significancias estadísticas de los análisis comparativos del establecimiento de biopelículas de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* y las cepas de referencia de *P. aeruginosa*.

Cepa clínica	Valor de significancia (p de Dunn)								
	Cepas de referencia de <i>P. aeruginosa</i> (ATCC®)								
	ATCC® 27853™			ATCC® 27855™			ATCC® 15692™		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Pa01r	1	<.0001*	<.0001*	1	0.0025*	<.0001*	1	1	0.3393
Pa02m	<.0001*	<.0001*	0.3527	<.0001*	0.0023*	0.158	0.0069*	1	1
Pa03m	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.0051*	0.2856	0.0022*
Pa06r	0.0068*	<.0001*	<.0001*	0.0121*	<.0001*	<.0001*	0.8493	1	0.2145
Pa12r	1	0.3219	1	1	1	1	1	1	1
Pa17mb	1	1	1	1	1	1	1	0.2476	1
Pa21ma	<.0001*	<.0001*	1	<.0001*	<.0001*	1	0.0016*	0.1539	1
Pa21mb	1	1	1	1	1	0.5903	1	1	1
Pa22r	0.339	<.0001*	<.0001*	0.525	0.0003*	<.0001*	1	1	1
Pa25r	0.3382	<.0001*	<.0001*	0.5238	0.0011*	<.0001*	1	1	1
Pa27ma	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.0015*	0.0024*
Pa27mb	0.0029*	0.0588	1	0.0053*	0.7031	1	0.4705	1	1
Pa27r	0.0019*	0.0008*	<.0001*	0.0036*	0.0209*	<.0001*	0.3523	1	0.3092
Pa28m	0.1323	1	0.748	0.2127	1	0.3548	1	1	1
Pa29ma	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.0002*	0.0445*	1
Pa32r	1	0.07	0.1856	1	0.8093	0.0794	1	1	1
Pa33ra	<.0001*	<.0001*	0.0006*	<.0001*	<.0001*	0.0002*	<.0001*	0.4505	1
Pa34r	0.3454	1	1	0.5345	1	1	1	0.0972	0.8768
Pa35mb	<.0001*	1	1	0.0002*	1	1	0.0352*	0.1016	0.07
Pa36ma	1	1	1	1	1	1	1	0.4125	1
Pa36mb	<.0001*	0.3752	0.1024	<.0001*	1	0.0421*	<.0001*	1	1
Pa36mc	<.0001*	<.0001*	0.0263*	<.0001*	<.0001*	0.0099*	<.0001*	0.0020*	1
Pa37ma	0.0030*	1	0.4812	0.0055*	1	0.2206	0.4829	1	1
Pa37mb	<.0001*	<.0001*	1	<.0001*	<.0001*	0.9315	<.0001*	0.1377	1
Pa47r	<.0001*	<.0001*	0.0003*	<.0001*	0.0013*	0.0001*	0.0075*	1	1
Pa50ma	<.0001*	0.0002*	1	<.0001*	0.0050*	0.6513	0.0006*	1	1
Pa50mb	1	1	0.0627	1	1	0.0250*	1	1	1
Pa51mb	1	0.8929	1	1	1	1	1	1	1
Pa53m	0.3211	0.0625	0.0056*	0.4984	0.7384	0.0019*	1	1	1
PA53rb	0.5627	0.0546	0.0005*	0.8529	0.6621	0.0002*	1	1	1
Pa54ma	0.0001*	0.2234	<.0001*	0.0003*	1	<.0001*	0.0503	1	0.8041
Pa54mb	1	0.6679	0.0027*	1	1	0.0009*	1	1	1
Pa54ra	1	1	1	1	1	1	1	0.0156*	0.0241*
Pa57r	<.0001*	1	0.0295*	<.0001*	1	0.0112*	0.0103*	1	1
Pa58m	<.0001*	0.0007*	0.2542	<.0001*	0.0170*	0.1112	<.0001*	1	1
Pa60m	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.0001*	<.0001*	<.0001*	1	1
Pa60r	<.0001*	<.0001*	0.0009*	<.0001*	<.0001*	0.0003*	<.0001*	0.1959	1
Pa64m	1	1	1	1	1	1	1	0.1831	0.1093
Pa65r	0.0030*	<.0001*	<.0001*	0.0055*	0.0004*	<.0001*	0.4862	1	1
Pa77ma	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.1008	0.0155*
Pa77mb	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.0002*	0.0028*	<.0001*	0.0365*	1	0.0186*
Pa77r	<.0001*	1	0.3971	<.0001*	1	0.1795	0.0102*	1	1
Pa82mb	<.0001*	1	1	<.0001*	1	1	<.0001*	1	1
Pa83r	1	1	1	1	1	1	1	0.5521	1
Pa84rc	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.0027*	0.0015*
Pa88ma	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pa88ra	<.0001*	1	1	<.0001*	1	1	0.0005*	1	0.4158
Pa88rb	0.0102*	1	1	0.0179*	1	1	1	1	1
Pa91ra	1	1	1	1	1	1	1	1	0.6872
Pa94r	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Pa98rb	1	1	1	1	1	0.5766	1	1	1
Pa99rb	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pa100r	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pa102m	0.0153*	<.0001*	<.0001*	0.0266*	<.0001*	<.0001*	1	0.0698	0.0928
Pa102rd	0.5405	<.0001*	<.0001*	0.8207	<.0001*	<.0001*	1	0.8667	1
Pa102re	0.0152*	<.0001*	<.0001*	0.0265*	<.0001*	<.0001*	1	0.1247	0.0350*
Pa111m	0.0030*	0.0007*	0.0016*	0.0056*	0.0176*	0.0005*	0.4867	1	1
Pa112ma	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.0039*	0.8778	0.5435
Pa112r	1	1	1	1	1	1	1	1	0.736
Pa115m	<.0001*	0.0031*	0.0003*	<.0001*	0.0626	<.0001*	<.0001*	1	1
Pa115rb	1	1	1	1	1	1	1	0.0205*	0.0353*
Pa115rc	0.1701	1	1	0.2709	1	1	1	0.1058	1
Pa116m	<.0001*	0.0037*	0.0364*	<.0001*	0.0731	0.0140*	0.0074*	1	1
Pa116ra	0.086	0.0018*	<.0001*	0.1406	0.0390*	<.0001*	1	1	1
Pa116rb	0.0088*	<.0001*	<.0001*	0.0156*	<.0001*	<.0001*	1	0.1217	0.1772
Pa116rc	0.7384	0.0004*	<.0001*	1	0.0107*	<.0001*	1	1	1
Pa117ma	<.0001*	<.0001*	0.0427*	<.0001*	0.0028*	0.0166*	<.0001*	1	1
Pa117mb	<.0001*	1	<.0001*	<.0001*	1	<.0001*	0.0002*	1	1
Pa117rc	<.0001*	0.0009*	0.0117*	<.0001*	0.0215*	0.0042*	<.0001*	1	1
Pa120mb	<.0001*	0.0157*	1	<.0001*	0.2408	1	0.0039*	1	1
Pa120rb	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.0048*	0.0023*
Pa120rc	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.0040*	0.0007*
Pa122r	0.0096*	0.0006*	1	0.0169*	0.0156*	1	1	1	1
Pa124ra	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.0008*	0.0008*
Pa124rb	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.0008*	0.0006*
Pa125r	<.0001*	<.0001*	1	<.0001*	<.0001*	1	<.0001*	0.8304	1

Pie de tabla: Valor anaranjado= Diferencia significativa moderada; Valor rojo= Diferencia significativa pronunciada

- Anexo 12. Categorización de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* basado en el establecimiento de biopelículas a las 24 h.

Categoría I								
Cepa clínica	OD ₅₄₀		Cepa clínica	OD ₅₄₀		Cepa clínica	OD ₅₄₀	
	\bar{X}	SD		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
Pa82mb	0.0015	0.0011	Pa88ra	0.0135	0.0048	Pa06r	0.0473	0.0037
Pa117ma	0.0018	0.001	Pa50ma	0.0149	0.0087	Pa116rb	0.0483	0.0079
Pa120rc	0.0019	0.0009	Pa21ma	0.0161	0.0023	Pa88rb	0.0486	0.0111
Pa33ra	0.0021	0.0007	Pa29ma	0.0185	0.0368	Pa122r	0.0487	0.0055
Pa36mc	0.0023	0.0014	Pa120mb	0.0186	0.0033	Pa102re	0.0505	0.0143
Pa84rc	0.0025	0.0009	Pa112ma	0.0191	0.0063	Pa102m	0.0508	0.0081
Pa27ma	0.0027	0.0019	Pa02m	0.0204	0.0031	Pa116ra	0.0602	0.0092
Pa117rc	0.0029	0.0024	Pa03m	0.0209	0.0105	Pa28m	0.063	0.0117
Pa58m	0.0029	0.0019	Pa57r	0.0215	0.0032	Pa115rc	0.0657	0.0147
Pa77ma	0.003	0.0015	Pa116m	0.0217	0.0099	Pa25r	0.0689	0.0069
Pa60m	0.0035	0.0038	Pa77r	0.0239	0.0157	Pa53m	0.0701	0.0153
Pa37mb	0.0038	0.0039	Pa35mb	0.0292	0.0161	Pa34r	0.0703	0.0131
Pa36mb	0.0055	0.0024	Pa77mb	0.0293	0.0171	Pa22r	0.0724	0.0203
Pa120rb	0.0059	0.0015	Pa54ma	0.0297	0.0173	Pa53rb	0.0753	0.0148
Pa60r	0.0064	0.005	Pa47r	0.03	0.0473	Pa116rc	0.0766	0.0068
Pa124ra	0.0065	0.0084	Pa27r	0.0412	0.0075	Pa102rd	0.0769	0.0194
Pa124rb	0.0074	0.0071	Pa111m	0.0426	0.0104	Pa21mb	0.0836	0.0083
Pa115m	0.0084	0.0032	Pa65r	0.0433	0.0103	Pa32r	0.0838	0.0153
Pa125r	0.0086	0.0018	Pa37ma	0.0433	0.0196	Pa51mb	0.0895	0.0255
Pa117mb	0.0108	0.003	Pa27mb	0.044	0.0046			

Categoría II								
Cepa clínica	OD ₅₄₀		Cepa clínica	OD ₅₄₀		Cepa clínica	OD ₅₄₀	
	\bar{X}	SD		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
Pa36ma	0.1234	0.0587	Pa12r	0.1333	0.0098	Pa17mb	0.1553	0.028
Pa64m	0.1237	0.0285	Pa54mb	0.1387	0.0142			
Pa50mb	0.13	0.0326	Pa112r	0.1548	0.0145			

Categoría III								
Cepa clínica	OD ₅₄₀		Cepa clínica	OD ₅₄₀		Cepa clínica	OD ₅₄₀	
	\bar{X}	SD		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
Pa01r	0.2165	0.012	Pa100r	0.2447	0.0076	Pa98rb	0.2545	0.0173
Pa54ra	0.2254	0.0307	Pa99rb	0.2488	0.0339			

Categoría IV								
Cepa clínica	OD ₅₄₀		Cepa clínica	OD ₅₄₀		Cepa clínica	OD ₅₄₀	
	\bar{X}	SD		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
Pa94r	0.2932	0.0146	Pa88ma	0.3518	0.0525	Pa91ra	0.3795	0.0549
Pa83r	0.2936	0.0167	Pa115rb	0.3682	0.0169			

Pie de tabla: \bar{X} = Media de los valores obtenidos y SD= Desviación estándar

- Anexo 13. Categorización de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* basado en el establecimiento de biopelículas a las 48 h.

Categoría I								
Cepa clínica	OD ₅₄₀		Cepa clínica	OD ₅₄₀		Cepa clínica	OD ₅₄₀	
	\bar{X}	SD		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
Pa124ra	0.0013	0.0005	Pa22r	0.0295	0.0035	Pa53m	0.096	0.0241
Pa124rb	0.0013	0.0006	Pa65r	0.0316	0.0098	Pa54ma	0.1158	0.0389
Pa27ma	0.0018	0.0011	Pa47r	0.0346	0.0053	Pa12r	0.1179	0.0243
Pa36mc	0.0022	0.0017	Pa01r	0.0396	0.0174	Pa36mb	0.1186	0.0196
Pa84rc	0.0027	0.002	Pa02m	0.0409	0.0256	Pa54mb	0.1286	0.0097
Pa120rb	0.0028	0.001	Pa77mb	0.0423	0.0193	Pa51mb	0.1342	0.0277
Pa120rc	0.0042	0.0082	Pa116rc	0.0443	0.0041	Pa57r	0.1402	0.0373
Pa29ma	0.0102	0.0073	Pa117ma	0.0447	0.027	Pa21mb	0.1483	0.0439
Pa102m	0.0128	0.0191	Pa25r	0.0484	0.0698	Pa77r	0.155	0.0381
Pa77ma	0.0131	0.0079	Pa27r	0.0523	0.0139	Pa100r	0.1608	0.0047
Pa116rb	0.0139	0.0025	Pa50ma	0.0527	0.0353	Pa37ma	0.1616	0.0144
Pa102re	0.0143	0.0032	Pa111m	0.0541	0.0216	Pa88ra	0.1813	0.0287
Pa37mb	0.0158	0.0116	Pa116ra	0.0547	0.0057	Pa98rb	0.1823	0.0338
Pa21ma	0.0159	0.0092	Pa122r	0.0594	0.0364	Pa50mb	0.186	0.0219
Pa60r	0.0173	0.0176	Pa116m	0.0638	0.0144	Pa117mb	0.1882	0.0412
Pa33ra	0.0207	0.0149	Pa115m	0.0664	0.0227	Pa99rb	0.1998	0.0455
Pa125r	0.0235	0.0118	Pa58m	0.0782	0.0694	Pa91ra	0.2321	0.0164
Pa102rd	0.0245	0.0047	Pa120mb	0.0801	0.0123	Pa112r	0.2404	0.0328
Pa06r	0.0263	0.0039	Pa117rc	0.0855	0.1501	Pa88ma	0.2446	0.0248
Pa03m	0.0272	0.0448	Pa27mb	0.0929	0.0168	Pa82mb	0.2448	0.0594
Pa112ma	0.0275	0.0274	Pa53rb	0.0932	0.009			
Pa60m	0.0284	0.0144	Pa32r	0.0953	0.0074			

Categoría II								
Cepa clínica	OD ₅₄₀		Cepa clínica	OD ₅₄₀		Cepa clínica	OD ₅₄₀	
	\bar{X}	SD		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
Pa28m	0.2908	0.1389	Pa94r	0.3392	0.1208	Pa36ma	0.4224	0.1049
Pa88rb	0.2955	0.0815	Pa83r	0.3888	0.084	Pa17mb	0.4906	0.1042

Categoría III						
Cepa clínica	OD ₅₄₀		Cepa clínica	OD ₅₄₀		
	\bar{X}	SD		\bar{X}	SD	
Pa64m	0.5279	0.1243	Pa34r	0.5919	0.074	
Pa35mb	0.5875	0.0902	Pa115rc	0.6285	0.2111	

Categoría IV						
Cepa clínica	OD ₅₄₀					
	\bar{X}	SD				
Pa115rb	0.9401	0.0604				
Pa54ra	1	0				

Pie de tabla: \bar{X} = Media de los valores obtenidos y SD= Desviación estándar

- Anexo 14. Categorización de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* con base en el establecimiento de biopelículas a las 72 h.

Categoría I								
Cepa clínica	OD ₅₄₀		Cepa clínica	OD ₅₄₀		Cepa clínica	OD ₅₄₀	
	\bar{X}	SD		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
Pa124rb	0.0013	0.0006	Pa60m	0.0552	0.0369	Pa58m	0.1483	0.0692
Pa124ra	0.0015	0.0007	Pa29ma	0.0581	0.074	Pa37ma	0.1507	0.0252
Pa120rc	0.0016	0.0016	Pa102rd	0.0582	0.0215	Pa77r	0.1509	0.0503
Pa27ma	0.003	0.0017	Pa116rc	0.0619	0.039	Pa60r	0.156	0.2687
Pa03m	0.003	0.0022	Pa47r	0.0702	0.0207	Pa98rb	0.1638	0.0127
Pa120rb	0.0033	0.0024	Pa115m	0.0757	0.0573	Pa28m	0.1655	0.0582
Pa84rc	0.0036	0.0061	Pa53rb	0.0762	0.0168	Pa21mb	0.1658	0.0261
Pa77ma	0.0084	0.0031	Pa117mb	0.0784	0.0627	Pa120mb	0.187	0.0305
Pa77mb	0.0095	0.0053	Pa33ra	0.0798	0.0548	Pa50ma	0.1928	0.1065
Pa102re	0.0158	0.0169	Pa111m	0.0848	0.0126	Pa37mb	0.1977	0.1043
Pa102m	0.0225	0.0274	Pa54mb	0.0899	0.013	Pa36ma	0.2043	0.057
Pa116rb	0.0258	0.0164	Pa53m	0.0974	0.024	Pa125r	0.2065	0.1166
Pa06r	0.026	0.0038	Pa117rc	0.1059	0.0489	Pa51mb	0.2071	0.0615
Pa27r	0.0294	0.0067	Pa57r	0.1163	0.048	Pa99rb	0.208	0.0542
Pa01r	0.036	0.0437	Pa116m	0.118	0.0438	Pa12r	0.2236	0.0225
Pa112ma	0.0393	0.0292	Pa117ma	0.118	0.0149	Pa100r	0.2255	0.0748
Pa54ma	0.0419	0.0232	Pa36mc	0.1182	0.0645	Pa82mb	0.2335	0.0179
Pa65r	0.0446	0.0103	Pa50mb	0.1227	0.0182	Pa83r	0.2355	0.0348
Pa116ra	0.0506	0.0265	Pa36mb	0.1291	0.0243	Pa122r	0.2373	0.0279
Pa22r	0.051	0.061	Pa32r	0.1379	0.0181	Pa27mb	0.2376	0.0687
Pa25r	0.0528	0.0145	Pa02m	0.1476	0.0414			

Categoría II								
Cepa clínica	OD ₅₄₀		Cepa clínica	OD ₅₄₀		Cepa clínica	OD ₅₄₀	
	\bar{X}	SD		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
Pa17mb	0.2819	0.0541	Pa94r	0.351	0.0743	Pa112r	0.4097	0.1091
Pa88ma	0.2992	0.0491	Pa34r	0.381	0.0807	Pa88ra	0.4308	0.053
Pa21ma	0.3244	0.1	Pa91ra	0.393	0.0591	Pa88rb	0.4661	0.2147

Categoría III								
Cepa clínica	OD ₅₄₀		Cepa clínica	OD ₅₄₀		Cepa clínica	OD ₅₄₀	
	\bar{X}	SD		\bar{X}	SD		\bar{X}	SD
Pa64m	0.6424	0.1223	Pa115rc	0.6562	0.4105	Pa35mb	0.7199	0.0493

Categoría IV			
Cepa clínica	OD ₅₄₀		
	\bar{X}	SD	
Pa115rb	0.9031	0.163	
Pa54ra	1	0	

Pie de tabla: \bar{X} = Media de los valores obtenidos y SD= Desviación estándar

○ Anexo 15. Intensidad de fluorescencia identificada en las cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

Cepa clínica	Ensayo	Intensidad de fluorescencia									
		Campo									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pa01r	1	29.242	26.129	24.357	23.156	21.972	21.372	20.855	20.057	19.123	18.461
	2	17.900	17.449	17.086	16.696	16.429	16.014	15.660	15.333	14.952	14.606
	3	14.270	14.000	13.857	13.647	13.481	13.324	13.000	12.741	12.452	12.000
Pa06r	1	20.621	20.160	19.684	19.070	18.442	17.743	17.415	17.037	16.618	16.311
	2	15.929	15.458	15.152	14.949	14.750	14.385	14.167	14.000	13.846	13.462
	3	30.267	28.714	26.955	24.867	23.294	22.775	22.300	21.826	21.534	21.250
Pa12r	1	13.551	12.707	12.131	11.423	11.144	10.786	10.493	10.345	10.109	9.833
	2	20.099	19.316	18.815	17.754	16.904	16.315	15.811	15.389	14.546	13.887
	3	9.648	9.500	9.385	9.188	9.000	8.818	8.605	8.364	8.250	8.182
Pa17mb	1	36.472	33.130	32.058	31.439	30.203	29.600	28.989	28.379	28.114	27.308
	2	22.304	21.608	21.094	20.738	19.795	18.827	18.178	16.821	15.696	13.909
	3	26.797	26.097	25.648	24.980	24.656	23.952	23.632	23.162	22.959	22.561
Pa21mb	1	27.018	26.271	25.969	25.544	25.143	24.667	24.250	23.825	23.574	23.295
	2	22.800	22.350	21.821	21.424	21.149	20.333	20.079	19.739	19.438	19.042
	3	36.667	34.340	32.918	31.901	30.887	30.051	29.534	28.875	28.091	27.792
Pa32r	1	31.752	29.856	28.840	27.897	27.500	26.814	26.282	25.868	25.519	25.343
	2	20.538	20.067	19.346	18.874	18.415	17.725	17.033	15.444	14.681	13.714
	3	24.809	24.250	23.804	23.485	23.238	22.691	22.196	21.959	21.364	20.954
Pa35mb	1	44.070	42.679	41.207	40.745	40.309	39.910	39.416	39.274	39.042	38.870
	2	38.518	38.453	38.380	38.225	37.885	37.442	37.060	36.959	36.826	36.108
	3	35.591	35.133	34.832	34.290	33.857	33.425	32.914	32.082	30.918	28.905
Pa36ma	1	33.707	32.813	31.935	31.345	30.255	28.781	28.517	27.819	27.456	24.550
	2	37.358	37.073	36.773	36.330	36.015	35.469	35.149	34.922	34.478	34.073
	3	41.955	41.493	41.324	41.015	39.850	39.526	38.969	38.288	37.991	37.544
Pa37ma	1	30.959	30.544	29.144	28.663	28.197	28.185	28.069	27.950	27.736	27.136
	2	26.670	26.467	26.080	26.014	25.644	25.130	23.818	23.455	22.331	19.850
	3	36.135	35.024	34.699	33.955	33.472	33.053	32.457	31.744	31.599	31.370
Pa50mb	1	21.237	20.225	19.774	19.580	19.169	18.896	18.452	18.037	17.651	17.318
	2	31.313	29.589	28.161	27.360	26.016	24.733	23.753	23.039	22.252	21.881
	3	16.980	16.795	16.317	16.029	15.658	15.277	14.756	14.455	14.154	13.424
Pa51mb	1	40.857	40.742	40.481	40.399	40.042	39.929	39.664	39.544	39.364	39.057
	2	45.684	44.084	43.477	43.253	42.271	41.892	41.808	41.333	41.296	41.043
	3	38.855	38.701	38.350	38.146	38.086	37.833	37.333	37.012	36.557	35.900
Pa54mb	1	43.138	42.268	41.004	40.053	39.657	39.326	38.888	38.735	38.497	38.138
	2	34.058	33.463	32.836	32.313	31.544	30.918	29.133	28.714	27.690	23.026
	3	37.780	37.322	37.034	36.780	36.571	36.281	35.295	35.161	34.806	34.317
Pa54ra	1	31.175	30.588	29.965	29.578	29.198	29.009	28.710	28.439	28.125	27.571
	2	24.261	23.774	23.296	22.357	21.368	20.343	19.613	18.978	18.049	17.774
	3	27.357	27.234	26.847	26.602	26.355	26.160	25.798	25.222	24.855	24.549
Pa58m	1	24.800	24.410	24.047	23.727	23.694	23.135	22.605	22.526	21.904	21.471
	2	21.189	20.926	20.325	19.625	19.479	19.250	18.946	18.400	17.469	16.833
	3	29.726	28.404	28.194	27.714	27.441	27.084	26.613	26.194	26.095	25.874

Pa60m	1	18.308	17.840	17.430	17.126	16.700	16.400	16.226	15.938	15.545	15.226
	2	39.346	26.030	24.414	23.000	22.190	21.381	20.600	19.970	19.159	18.636
	3	14.991	14.611	14.421	14.171	13.909	13.714	13.560	13.316	13.056	12.684
Pa64m	1	44.973	44.057	43.581	43.118	42.368	41.731	41.241	40.782	40.210	39.710
	2	39.000	38.533	38.121	37.667	37.250	36.615	36.143	35.571	35.063	34.643
	3	55.968	52.974	51.229	50.385	49.346	48.458	47.809	47.132	46.338	45.543
Pa82mb	1	32.637	32.556	32.247	32.079	31.797	31.653	31.057	30.540	30.158	29.442
	2	38.850	38.053	37.644	37.416	36.977	36.699	36.448	36.050	35.842	35.712
	3	35.389	35.212	34.829	34.613	34.543	34.132	33.840	33.665	33.120	32.878
Pa83r	1	27.519	27.147	26.698	26.569	26.260	26.000	25.693	25.406	25.172	24.783
	2	24.567	24.138	23.947	23.678	23.400	22.865	22.070	21.667	21.050	19.154
	3	33.158	32.043	31.507	30.707	29.913	29.375	29.156	28.627	28.314	27.902
Pa88ma	1	13.883	13.495	13.407	13.207	12.893	12.680	12.354	12.054	11.761	11.511
	2	18.693	17.014	16.508	16.188	15.749	15.353	14.719	14.580	14.408	14.089
	3	11.284	10.668	10.341	9.972	9.513	9.292	8.833	8.558	7.849	7.500
Pa88ra	1	30.189	24.524	23.514	22.950	22.510	22.000	21.676	21.465	21.176	20.929
	2	17.747	17.452	17.200	16.916	16.574	16.414	16.077	15.725	15.294	14.857
	3	20.645	20.356	20.140	19.810	19.470	19.264	18.980	18.656	18.298	17.942
Pa88rb	1	25.913	25.607	25.185	25.091	24.877	24.700	24.300	24.071	24.000	23.778
	2	40.034	37.452	36.157	34.570	34.182	33.419	32.119	31.130	30.537	30.164
	3	29.726	29.210	28.965	28.500	28.191	27.619	27.437	26.949	26.642	26.167
Pa91ra	1	20.548	18.313	17.656	16.576	16.108	15.573	15.059	14.644	14.244	13.846
	2	13.519	13.155	12.806	12.481	12.206	11.870	11.480	11.300	11.119	10.853
	3	10.477	10.184	9.886	9.647	9.457	9.118	8.839	8.600	8.421	8.273
Pa94r	1	27.358	27.144	26.538	25.805	25.537	25.310	24.803	24.259	23.846	23.432
	2	35.595	33.360	32.524	31.585	31.129	30.333	29.716	29.152	28.556	27.720
	3	22.825	22.175	21.707	21.176	20.810	20.316	19.917	19.391	18.765	18.222
Pa98rb	1	19.360	19.185	18.900	18.667	18.375	18.167	17.884	17.552	17.313	16.615
	2	22.975	22.330	22.000	21.694	21.294	21.015	20.692	20.455	20.120	19.772
	3	36.189	31.339	28.698	27.928	26.683	26.022	25.115	24.698	24.028	23.636
Pa100r	1	38.212	37.630	37.302	36.714	36.472	36.026	35.347	34.850	34.312	34.108
	2	44.214	43.554	43.075	42.062	41.411	41.182	40.568	40.011	39.264	38.560
	3	33.865	33.435	32.420	31.881	31.279	30.291	28.653	27.676	26.879	23.400
Pa112r	1	23.990	23.766	23.128	22.800	22.060	21.781	21.500	21.125	20.964	20.471
	2	20.268	20.121	19.559	19.053	18.571	18.097	17.519	16.824	16.262	14.897
	3	38.343	30.237	28.749	28.002	26.949	26.014	25.644	25.116	24.750	24.394
Pa115rb	1	34.205	33.736	33.520	33.178	33.090	32.382	31.491	30.842	30.265	29.211
	2	40.527	40.369	40.237	39.932	39.053	38.892	38.349	38.113	37.819	37.484
	3	36.961	36.539	36.462	36.254	35.851	35.739	35.273	35.046	34.663	34.417
Pa115rc	1	37.962	37.306	36.079	35.223	34.663	34.113	33.736	33.030	32.138	31.564
	2	24.430	23.810	23.434	22.938	22.068	21.382	20.314	19.306	17.241	15.647
	3	31.060	29.940	29.684	29.297	28.602	28.159	27.814	27.075	25.798	25.192
Pa122r	1	25.152	24.651	24.251	23.606	23.195	22.694	22.250	21.737	21.463	20.825
	2	40.034	37.221	35.928	35.019	34.140	33.524	32.798	31.755	30.901	30.358
	3	29.917	29.274	28.892	28.355	27.699	27.351	26.745	26.304	26.080	25.569
Pa125r	1	30.667	30.384	29.932	29.679	29.522	29.310	28.941	28.785	28.146	27.838
	2	27.274	27.148	26.473	26.172	25.423	24.857	24.283	22.985	22.286	20.588
	3	38.275	36.757	35.957	34.663	34.051	33.146	32.395	31.894	31.481	31.062

- Anexo 16. Detección de F23~AgNPs en el sobrenadante 1 de los ensayos de interacción con cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

Cepa clínica	Ensayo	OD ₄₀₂ Medición		
		1	2	3
Pa01r	1	0.0050	0.0040	0.0060
	2	0.0050	0.0050	0.0060
	3	0.0060	0.0050	0.0050
Pa06r	1	0.0090	0.0070	0.0090
	2	0.0070	0.0070	0.0090
	3	0.0080	0.0060	0.0080
Pa12r	1	0.0080	0.0080	0.0060
	2	0.0060	0.0080	0.0060
	3	0.0090	0.0090	0.0070
Pa17mb	1	0.0080	0.0060	0.0090
	2	0.0070	0.0070	0.0090
	3	0.0090	0.0070	0.0060
Pa21mb	1	0.0120	0.0100	0.0120
	2	0.0050	0.0110	0.0100
	3	0.0110	0.0110	0.0100
Pa32r	1	0.0060	0.0070	0.0080
	2	0.0070	0.0070	0.0070
	3	0.0070	0.0060	0.0060
Pa35mb	1	0.0090	0.0100	0.0120
	2	0.0120	0.0100	0.0120
	3	0.0110	0.0090	0.0110
Pa36ma	1	0.0080	0.0100	0.0090
	2	0.0100	0.0080	0.0090
	3	0.0080	0.0090	0.0100
Pa37ma	1	0.0070	0.0080	0.0100
	2	0.0090	0.0080	0.0090
	3	0.0220	0.0090	0.0070
Pa50mb	1	0.0060	0.0060	0.0080
	2	0.0080	0.0060	0.0080
	3	0.0060	0.0070	0.0060
Pa51mb	1	0.0100	0.0090	0.0120
	2	0.0100	0.0090	0.0110
	3	0.0110	0.0100	0.0110
Pa54mb	1	0.0620	0.0140	0.0110
	2	0.0110	0.0150	0.0011
	3	0.0130	0.0130	0.0130
Pa54ra	1	0.0140	0.0150	0.0140
	2	0.0150	0.0160	0.0130
	3	0.0150	0.0160	0.0140
Pa58m	1	0.0080	0.0130	0.0120
	2	0.0110	0.0120	0.0090
	3	0.0120	0.0110	0.0080
Pa60m	1	0.0110	0.0180	0.0140
	2	0.0140	0.0180	0.0130
	3	0.0180	0.0170	0.0110

Pa64m	1	0.0130	0.0140	0.0080
	2	0.0070	0.0130	0.0070
	3	0.0110	0.0130	0.0110
Pa82mb	1	0.0080	0.0090	0.0100
	2	0.0080	0.0090	0.0070
	3	0.0100	0.0100	0.0080
Pa83r	1	0.0080	0.0080	0.0090
	2	0.0080	0.0080	0.0100
	3	0.0070	0.0070	0.0070
Pa88ma	1	0.0170	0.0170	0.0150
	2	0.0100	0.0180	0.0100
	3	0.0140	0.0180	0.0170
Pa88ra	1	0.0140	0.0140	0.0120
	2	0.0120	0.0130	0.0090
	3	0.0100	0.0130	0.0100
Pa88rb	1	0.0070	0.0080	0.0070
	2	0.0090	0.0080	0.0090
	3	0.0090	0.0070	0.0100
Pa91ra	1	0.0110	0.0100	0.0110
	2	0.0110	0.0100	0.0120
	3	0.0100	0.0090	0.0110
Pa94r	1	0.0120	0.0110	0.0130
	2	0.0130	0.0100	0.0120
	3	0.0120	0.0130	0.0110
Pa98rb	1	0.0080	0.0080	0.0060
	2	0.0070	0.0070	0.0100
	3	0.0080	0.0060	0.0120
Pa100r	1	0.0090	0.0080	0.0140
	2	0.0110	0.0100	0.0110
	3	0.0100	0.0130	0.0100
Pa112r	1	0.0110	0.0100	0.0120
	2	0.0090	0.0090	0.0120
	3	0.0120	0.0130	0.0110
Pa115rb	1	0.0110	0.0110	0.0130
	2	0.0120	0.0120	0.0130
	3	0.0110	0.0120	0.0100
Pa115rc	1	0.0060	0.0060	0.0090
	2	0.0080	0.0060	0.0100
	3	0.0060	0.0090	0.0100
Pa122r	1	0.0080	0.0150	0.0100
	2	0.0100	0.0140	0.0090
	3	0.0120	0.0120	0.0090
Pa125r	1	0.0130	0.0150	0.0080
	2	0.0130	0.0150	0.0120
	3	0.0120	0.0080	0.0130

○ Anexo 17. Detección de F23~AgNPs en el sobrenadante 2 de los ensayos de interacción con cepas clínicas de *P. aeruginosa*.

Cepa clínica	Ensayo	OD ₄₀₂ Medición		
		1	2	3
Pa01r	1	0.0360	0.0400	0.0420
	2	0.0360	0.0380	0.0420
	3	0.0330	0.0360	0.0320
Pa06r	1	0.0460	0.0480	0.0450
	2	0.0460	0.0480	0.0450
	3	0.0410	0.0460	0.0400
Pa12r	1	0.0400	0.0430	0.0410
	2	0.0400	0.0430	0.0410
	3	0.0420	0.0400	0.0410
Pa17mb	1	0.0220	0.0250	0.0220
	2	0.0220	0.0240	0.0230
	3	0.0240	0.0240	0.0220
Pa21mb	1	0.0240	0.0260	0.0380
	2	0.0370	0.0280	0.0360
	3	0.0310	0.0380	0.0330
Pa32r	1	0.0520	0.0470	0.0400
	2	0.0390	0.0470	0.0390
	3	0.0270	0.0500	0.0390
Pa35mb	1	0.0200	0.0200	0.0190
	2	0.0210	0.0220	0.0210
	3	0.0210	0.0190	0.0200
Pa36ma	1	0.0290	0.0340	0.0270
	2	0.0320	0.0300	0.0290
	3	0.0280	0.0290	0.0290
Pa37ma	1	0.0260	0.0320	0.0270
	2	0.0260	0.0330	0.0270
	3	0.0330	0.0250	0.0290
Pa50mb	1	0.0310	0.0300	0.0260
	2	0.0270	0.0290	0.0270
	3	0.0280	0.0300	0.0270
Pa51mb	1	0.0350	0.0350	0.0330
	2	0.0310	0.0354	0.0300
	3	0.0300	0.0360	0.0300
Pa54mb	1	0.0300	0.0300	0.0250
	2	0.0260	0.0300	0.0250
	3	0.0270	0.0290	0.0270
Pa54ra	1	0.0180	0.0220	0.0350
	2	0.0340	0.0300	0.0330
	3	0.0330	0.0350	0.0320
Pa58m	1	0.0210	0.0250	0.0200
	2	0.0250	0.0250	0.0210
	3	0.0210	0.0220	0.0210
Pa60m	1	0.0060	0.0080	0.0100
	2	0.0090	0.0090	0.0070
	3	0.0070	0.0100	0.0090

Pa64m	1	0.0050	0.0080	0.0060
	2	0.0070	0.0080	0.0060
	3	0.0060	0.0090	0.0050
Pa82mb	1	0.0090	0.0100	0.0090
	2	0.0080	0.0100	0.0090
	3	0.0080	0.0120	0.0100
Pa83r	1	0.0150	0.0200	0.0170
	2	0.0120	0.0200	0.0190
	3	0.0190	0.0250	0.0190
Pa88ma	1	0.0160	0.0160	0.0180
	2	0.0150	0.0187	0.0140
	3	0.0140	0.0180	0.0150
Pa88ra	1	0.0240	0.0300	0.0290
	2	0.0210	0.0300	0.0290
	3	0.0280	0.0310	0.0250
Pa88rb	1	0.0170	0.0170	0.0250
	2	0.0200	0.0190	0.0220
	3	0.0170	0.0190	0.0220
Pa91ra	1	0.0200	0.0200	0.0180
	2	0.0150	0.0230	0.0190
	3	0.0160	0.0230	0.0190
Pa94r	1	0.0190	0.0240	0.0220
	2	0.0180	0.0240	0.0190
	3	0.0210	0.0220	0.0190
Pa98rb	1	0.0170	0.0200	0.0210
	2	0.0190	0.0200	0.0180
	3	0.0180	0.0230	0.0180
Pa100r	1	0.0210	0.0290	0.0270
	2	0.0210	0.0290	0.0270
	3	0.0270	0.0240	0.0190
Pa112r	1	0.0100	0.0140	0.0150
	2	0.0140	0.0160	0.0120
	3	0.0120	0.0160	0.0120
Pa115rb	1	0.0180	0.0180	0.0220
	2	0.0200	0.0180	0.0220
	3	0.0190	0.0190	0.0220
Pa115rc	1	0.0230	0.0260	0.0280
	2	0.0240	0.0260	0.0220
	3	0.0260	0.0250	0.0220
Pa122r	1	0.0130	0.0150	0.0120
	2	0.0120	0.0150	0.0120
	3	0.0120	0.0160	0.0130
Pa125r	1	0.0180	0.0200	0.0170
	2	0.0170	0.0200	0.0170
	3	0.0160	0.0190	0.0210



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Revisión

Aptámeros acoplados a nanopartículas para el diagnóstico y tratamiento de las infecciones microbianas



Juan Carlos Gutiérrez-Santana^{a,b,*}, Julia Dolores Toscano-Garibay^c, Marisol López-López^d y Victor Rafael Coria-Jiménez^a

^a Laboratorio de Bacteriología Experimental, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México, México

^b Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México, México

^c Unidad de Investigación en Microbiología y Toxicología, Dirección de Investigación, Hospital Juárez de México, Ciudad de México, México

^d Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Ciudad de México, México

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 21 de agosto de 2019

Aceptado el 9 de diciembre de 2019

On-line el 13 de enero de 2020

Palabras clave:

Aptámeros

Nanopartículas

Resistencia a múltiples antimicrobianos

Antibacterianos

RESUMEN

Existen nanopartículas con características antibacterianas destacables y aptámeros capaces de reconocer con gran afinidad y especificidad a determinadas bacterias patógenas. La combinación de ambos sistemas se ha utilizado en el diseño de métodos rápidos de detección bacteriana con excelentes límites de detección. Asimismo, la sinergia entre aptámeros y nanopartículas ha permitido optimizar la actividad antimicrobiana de antibióticos y otras nanoestructuras dotándolos de actividad bacteria-específica, convirtiéndolas en herramientas atractivas y prometedoras frente a las bacterias resistentes a múltiples antimicrobianos.

© 2019 Elsevier España, S.L.U.

y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

Aptamers coupled to nanoparticles in the diagnosis and treatment of microbial infections

ABSTRACT

There are nanoparticles with remarkable antibacterial characteristics and aptamers able to recognize specific pathogenic bacteria with high affinity and specificity. The combination of both systems has been used to design rapid bacterial detection methods with excellent detection limits. Likewise, the synergism between aptamers and nanoparticles have allowed to optimize the antimicrobial activity of antibiotics and other nanostructures providing them with activity bacterium-specific, turning into attractive and promising tools to fight against bacteria resistant to multiple antimicrobials.

© 2019 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

Introducción

La morbimortalidad de las infecciones bacterianas ha aumentado debido al incremento en la frecuencia de bacterias resistentes a múltiples antimicrobianos (MDR)^{1,2}, reduciendo la eficacia de las terapias de erradicación disponibles³ y estableciendo un

importante problema de salud con graves secuelas económicas y sociales^{4,5}.

Esta «crisis de resistencia a los antibióticos»⁶ ha sido generada principalmente por el uso extenso e inadecuado de antibióticos⁴, así como por el diagnóstico convencional realizado mediante cultivo y pruebas bioquímicas (método estándar), que identifica a los agentes infecciosos tras varios días, permitiendo la progresión de la infección. Por ello, es necesario desarrollar métodos rápidos para el diagnóstico bacteriano⁵, diseñar terapias que evadan los mecanismos de resistencia bacteriana^{3,6} y/o mejorar la acción de los

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: biol.jcguierrez@gmail.com (J.C. Gutiérrez-Santana).

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.12.004>

0213-005X/© 2019 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

antibióticos existentes, donde la nanotecnología parece ser una herramienta prometedora⁴.

Aptámeros

Los aptámeros son ácidos nucleicos monocatenarios cortos, seleccionados *in vitro* mediante un proceso denominado evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial (SELEX) para reconocer blancos específicos diversos^{7,8}.

El reconocimiento aptámero-blanco se consigue por compatibilidad estructural y combinación de diversas interacciones no covalentes^{9,10}, estableciendo constantes de disociación usualmente en el rango de pico-nanomolar para dianas con peso molecular alto, y de nano-micromolar para blancos de peso molecular bajo^{9,11}. Los aptámeros son capaces de discriminar entre enantiómeros y moléculas que estructuralmente difieren solamente en un grupo funcional¹². Asimismo, su tamaño y peso molecular pequeño¹¹, síntesis *in vitro*^{7,12}, estabilidad bajo un rango amplio de condiciones^{8,9,11,12}, y nula o baja toxicidad *in vivo*⁹, los han convertido en moléculas atractivas para el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas para agentes infecciosos^{8,9,11,12}.

Adicionalmente, estas biomoléculas se pueden modificar fácilmente para mejorar su bioestabilidad frente a nucleasas^{8,9,11,12}, incrementar su biodisponibilidad, sus propiedades farmacocinéticas y su afinidad, así como para evadir la respuesta inmune⁹ e incluso acoplarlas con moléculas reporteras, grupos funcionales o nanopartículas (NPs) para incrementar su aplicabilidad⁷.

Nanopartículas

Las NPs son una gama de materiales pequeños con al menos una dimensión inferior a 100 nm, cuyas propiedades dependen de su tamaño, forma, distribución y formulación química^{1,2,13}. Su elevada relación superficie-volumen les confiere reactividad elevada e interacciones únicas con sistemas biológicos¹. Adicionalmente, la resonancia de plasmones localizados en superficie (LSPR) manifestada comúnmente por NPs metálicas bajo estímulos fotónicos o electromagnéticos otorga propiedades ópticas equivalentes a 10 fluoróforos¹³, por lo que se podrían utilizar para el desarrollo de herramientas diagnósticas¹³.

Asimismo, existen NPs que a dosis no tóxicas para células humanas poseen cualidades antimicrobianas destacadas frente a diversos patógenos y sus variantes MDR^{1,13}, donde las NPs metálicas figuran como promotoras¹ al producir especies reactivas de oxígeno, liberar constantemente cationes metálicos^{1,3,14} y poseer una carga generalmente positiva, favoreciendo su adhesión y acumulación en la membrana externa bacteriana^{3,14}, disociándola y ocasionando la eliminación del gradiente de protones y la subsiguiente salida del contenido citoplasmático^{1,3,14}.

Además, las NPs más pequeñas y los cationes metálicos pueden internalizarse en las bacterias^{1,3}, añadiendo efectos antimicrobianos trascendentales, como la inhibición de enzimas cruciales para la replicación del ADN y la producción de ATP^{3,14}.

También las NPs no antimicrobianas pueden ser útiles para diseñar estrategias diagnósticas y terapéuticas para infecciones bacterianas, al adecuarlas para el transporte-entrega de compuestos antimicrobianos en sitios específicos (nanoportadores)^{2,4}, acumulando el compuesto sobre la superficie bacteriana y mejorando su farmacocinética^{3,4,13,15}. En esta revisión abordaremos algunos ejemplos de aptámeros selectivos para especies bacterianas patógenas, que han sido utilizados junto con NPs para el diseño de estrategias diagnósticas y/o terapéuticas novedosas frente a patógenos bacterianos (tabla 1).

Aptámeros y nanopartículas para la identificación de patógenos bacterianos

En la actualidad se han seleccionado aptámeros dirigidos a especies bacterianas diversas^{1,7,8,10,12}, principalmente usados como fase estacionaria de captura de moléculas, capaces de identificar bacterias en muestras ambientales y clínicas, con sensibilidades equivalentes o superiores a las de los cultivos convencionales^{8,12}. La sinergia existente entre los aptámeros y las NPs ha evidenciado su potencial para ser empleados en biomedicina¹⁶, al incrementar la afinidad de un aptámero por su diana ocasionado por una densidad elevada de aptámeros sobre las NPs, acrecentando la cantidad de interacciones con el blanco por acción cooperativa (efecto multivalencia)^{7,16}, que a su vez protege a los aptámeros de la digestión por nucleasas¹⁶.

Detección bacteriana basada en aptámeros y quantum dots

Las *quantum dots* (QD's) son un tipo de NPs con propiedades fluorescentes destacables^{10,17}. Se han utilizado en ensayos piloto para el desarrollo de un sistema de detección semicuantitativo para *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Bacillus subtilis* mediante la conjugación de aptámeros a QD's, demostrando ser capaces de reconocer a cada microorganismo mediante variaciones de fluorescencia de las QD's. La detección inicial se evaluó con $\sim 2,8 \times 10^6$ bacterias/mL y la intensidad fluorescente se modificó proporcionalmente al número de bacterias presentes¹⁷, evidenciando su potencialidad para el diagnóstico bacteriano¹⁸. También se ha utilizado un aptámero anti-*Pseudomonas aeruginosa* para desarrollar un método de detección de esta bacteria en agua potable. Mediante el marcaje de aptámeros con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y aptámeros conjugados a QD's, se demostró que estos últimos tuvieron afinidades disminuidas respecto al aptámero marcado con FITC¹⁹, probando que la nanotecnología también puede presentar resultados desfavorables para moléculas de reconocimiento promotoras.

También se han utilizado las *carbon dots* (CD's), que tienen propiedades luminiscentes, tóxicas y de biocompatibilidad promotoras^{10,20}. Se han empleado en conjunto con aptámeros anti-*S. typhimurium* para desarrollar un método de detección basado en fluorescencia, mostrando límites de detección (LDD) de 50 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL en 2 h de incubación con cultivos bacterianos líquidos^{10,21,22} (fig. 1), confirmados por el método de recuento en placa²².

Detección bacteriana a través de aptámeros acoplados a nanopartículas metálicas

Actualmente, las NPs de oro (AuNPs) se utilizan ampliamente para la generación de biosensores bacterianos debido a las características electroquímicas, ópticas y de resonancia de plasmones, entre otras propiedades promotoras que poseen²¹. Estas se han utilizado en conjunto con aptámeros para la detección de *Salmonella enteritidis*, conjugando aptámeros con AuNPs, para posteriormente inmovilizarlos sobre un electrodo de carbono. Esta prueba de concepto demostró que al introducir el electrodo en soluciones con la bacteria, la resistencia eléctrica se incrementó debido a la formación de complejos aptámero-bacteria, permitiendo su medición por espectroscopia de impedancia electroquímica con un LDD de 600 UFC/mL^{10,23}, sentando las bases para desarrollar nuevos métodos basados en este principio, para la detección de diversos microorganismos²³.

También se ha desarrollado un *chip* basado en la inmovilización de AuNPs acopladas a aptámeros anti-*S. typhimurium*, cuyo estudio piloto mostró su utilidad para detectar a este patógeno en líquidos procedentes de lavados de carne de cerdo. Así, al introducir el *chip*

Tabla 1

Empleo de aptámeros y nanopartículas utilizados para el diseño de estrategias diagnósticas y/o terapéuticas frente a patógenos bacterianos

Nanoestructura	Elemento de reconocimiento	Bacteria diana	Utilidad potencial	Referencias
QD's	Aptámero	<i>E. coli</i>	Diagnóstica	17
	Aptámero	<i>S. typhimurium</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>B. subtilis</i>	Diagnóstica	
CD's	Aptámero	<i>P. aeruginosa</i>	Diagnóstica	18
	Aptámero	<i>S. typhimurium</i>	Diagnóstica	10,19
AuNPs	Aptámero	<i>S. enteritidis</i>	Diagnóstica	10
	Aptámero	<i>S. typhimurium</i>	Diagnóstica	7,10,19,20
	Aptámero	<i>E. coli</i>	Diagnóstica	7,10,19
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	19,36
	Aptámero	<i>C. jejuni</i>	Diagnóstica	37
	Aptámero	<i>C. coli</i>	Diagnóstica	37
	Aptámero	<i>L. acidophilus</i>	Diagnóstica	
Au-silica NPs	Aptámero	<i>S. typhimurium</i>	Diagnóstica	12,21,22
MNPs	Aptámero	<i>P. aeruginosa</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>S. typhimurium</i>	Diagnóstica	23
MBs y AuNPs	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	7,19,21,24,25
	Aptámero	<i>S. typhimurium</i>	Diagnóstica	10,26,27
MNPs y UCNPs	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	10,26,27
	Aptámero	<i>V. parahemolyticus</i>	Diagnóstica	10,27
MNPs	Aptámero marcado con FAM	<i>S. typhimurium</i>	Diagnóstica	5,10
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	28
MNPs y nano keepers unidos a oligonucleótidos marcados con FAM	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	29
MBs, AuNCs y vancomicina	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	30
MBs	Anticuerpo y aptámero marcado con FITC	SARM	Diagnóstica	31
SWNTs	Aptámero modificado con DNazima	<i>S. paratyphi A</i>	Diagnóstica	32
FNPs	Aptámero	<i>E. coli</i>	Diagnóstica	
	Aptámero marcado con FAM	<i>V. parahemolyticus</i>	Diagnóstica	
CNPs	Aptámero marcado con CY3	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	10,33
	Aptámero marcado con ROX	<i>S. typhimurium</i>	Diagnóstica	
	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Diagnóstica	34
AuNCs, vancomicina y AuNPs	Aptámero	<i>E. coli</i>	Diagnóstica	35
AuNPs y UCNPs unidos a ADNc del aptámero	Aptámero modificado con con fGmH	<i>S. aureus</i>	Terapéutica	40
AgNPs	Aptámero	<i>S. aureus</i>	Terapéutica	41
Nano keepers con vancomicina	Tres aptámeros	<i>E. coli</i>	Terapéutica	42
TiO ₂ NPs	Aptámero marcado con histidina	<i>S. typhimurium</i>	Terapéutica	43

A3-APO^{HIS}: péptidos antimicrobianos marcados con hexahistidina; ADNc: ADN complementario; AgNPs: nanopartículas de plata; AuNCs: nano-agrupaciones de oro; AuNPs: nanopartículas de oro; CD's: carbon dots; CNPs: nanopartículas de carbono; CPX: ciprofloxacino; CY3: colorante 3 de cianina; FAM: carboxifluoresceína; fGmH: 2'-F-dG, 2'-OMe-dA/dC/dU; FITC: isotiocianato de fluoresceína; FNPs: nanopartículas fluorescentes; MBs: perlas magnéticas; MNPs: nanopartículas magnéticas; NPs: nanopartículas; QD's: quantum dots; ROX: 6-carboxi-X-rodamina; SARM: *S. aureus* resistentes a metilina; SWNTs: nanotubos de carbono; TiO₂NPs: nanopartículas de dióxido de titanio; UCNPs: nanopartículas de conversión ascendente.

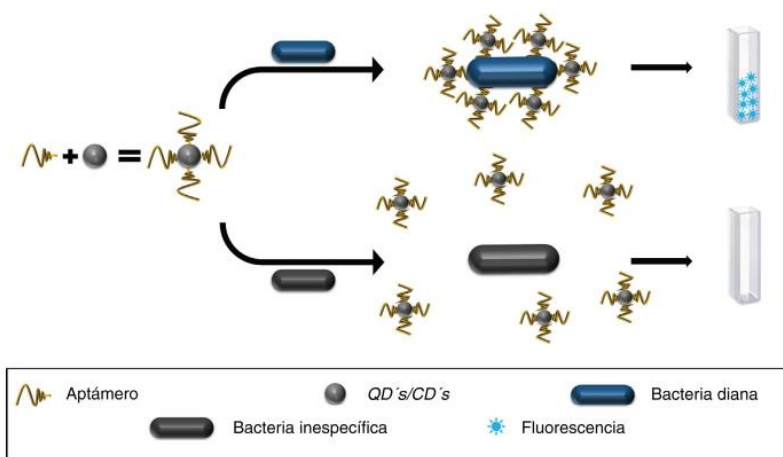


Figura 1. Acoplamiento entre aptámeros y QD's/CD's. El aptámero permite la agrupación de QD's/CD's sobre el microorganismo de interés favoreciendo la emisión de fluorescencia, a diferencia de QD's/CD's dispersos en muestras sin presencia de la bacteria diana. CD's: carbon dots; QD's: quantum dots.

en el líquido, el aptámero adquiere un cambio estructural al ligar a la bacteria, modificando la absorbancia basal de la LSPR de las AuNPs que se detectó por espectrofotometría UV/visible (fig. 2). La principal limitación de este método es la necesidad de establecer matrices diferentes para los diferentes alimentos antes de comercializar este tipo de tecnología²⁴.

Del mismo modo, un estudio piloto basado en aptámeros inmovilizados sobre NPs de sílica cubiertas con oro (Au-silica NPs) ha permitido desarrollar un sensor multiplex para *Lactobacillus acidophilus*, *S. typhimurium* y *P. aeruginosa*, logrando discriminar entre cada patógeno con un LDD de 3UFC por ensayo, gracias al reconocimiento de cada aptámero a su diana,

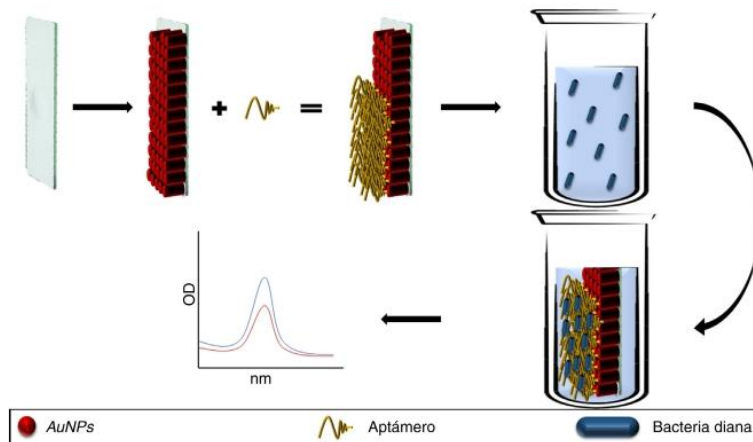


Figura 2. Aptámeros conjugados a AuNPs e inmovilizados sobre una placa de vidrio (*chip*). El aptámero une a las bacterias diana modificando los picos de absorción de las AuNPs. En soluciones sin el patógeno los picos de absorción se mantienen idénticos al pico de absorción basal de las AuNPs.
AuNPs: nanopartículas de oro.

alterando de manera particular la LSPR de las NPs para cada especie bacteriana^{12,25,26}.

Aptámeros y moléculas magnéticas para la detección de bacterias

Las NPs magnéticas (MNPs) pueden ocasionar cambios de coloración de una solución en presencia de un sustrato colorimétrico como 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y H₂O₂, de manera similar a la peroxidasa. Esta propiedad se ha utilizado para detectar *S. typhimurium* mediante un estudio de prueba de concepto, donde se observó que aptámeros anti-*S. typhimurium* en solución con MNPs inhibían la acción enzimática de estas últimas, pero al añadir 7,5 × 10⁵ UFC/mL de la bacteria, el aptámero se unió al patógeno desprotegiendo las MNPs y permitiendo su acción enzimática²⁷.

Adicionalmente, las perlas magnéticas (MBs) y las MNPs se pueden usar en conjunto con los aptámeros para desarrollar métodos de captura-separación magnética de patógenos presentes en una muestra, para concentrarlos^{7,21,25,28–30} y posteriormente detectarlos por estrategias diversas, consiguiendo LDD de 1–682 UFC/mL validados por el método de recuento en placa^{29,31–33}, como sigue:

- (i) A partir de la variación en la señal eléctrica ocasionada por la excitación fotónica de AuNPs acopladas a aptámeros anti-*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) al ligar a dicho patógeno^{7,25,28}.
- (ii) Por la medición de iones de plata (Ag⁺) en solución, producidos por NPs de plata (AgNPs) acopladas a aptámeros anti-*S. aureus*, donde la concentración de Ag⁺ es directamente proporcional a la densidad de la bacteria en una muestra^{21,29}.
- (iii) Mediante la detección de la fluorescencia específica de NPs de conversión ascendente (UCNPs) unidas a aptámeros específicos anti-*S. typhimurium*, anti-*S. aureus* y anti-*Vibrio parahaemolyticus*^{10,30,31}.
- (iv) De manera similar, a partir de la detección de fluorescencia de aptámeros selectivos para *S. typhimurium* modificados con carboxifluoresceína (FAM)^{5,10,34}.
- (v) Por medio de la identificación de enzimas específicas producidas por un patógeno en particular, como las nucleasas micrococales (MN) de *S. aureus*, que mediante la adición de *nano keepers*, constituidos por oligonucleótidos marcados con FAM específicamente susceptibles a las MN, se inmovilizan en los poros de NPs de sílica mesoporosas (MSNs) para inhibir la fluorescencia de FAM, pero al estimular la producción de MN, los oligonucleótidos se degradan, permitiendo la emisión de fluorescencia³².

- (vi) Mediante la interacción específica de antimicrobianos con patógenos concretos, como la vancomicina y *S. aureus*, comportamiento que ha sido útil para la detección de este patógeno mediante la incubación con nano-agrupaciones de oro (AuNCs) con propiedades fluorescentes, las cuales se inhiben por la vancomicina, pero en presencia de *S. aureus*, la vancomicina interactúa con el patógeno permitiendo la emisión de fluorescencia de las AuNCs³³.

También hay evidencia del uso combinado de anticuerpos y aptámeros para la detección fluorométrica de determinados microorganismos, tales como *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) utilizando MBs cubiertas con anticuerpos anti-proteína A de *S. aureus* (SpA) para capturar al patógeno. El método consiste en lisar a la bacteria e incubarla en presencia de un aptámero anti-PBP2a (proteína específica de SARM) modificado con FITC e hibridado con tres ADN cortos para eliminar la emisión de fluorescencia. Cuando el aptámero se une a la proteína PBP2a, se rehabilita la emisión de fluorescencia de FITC, logrando LDD de 1,38 × 10³ UFC/mL, confirmados por métodos microbiológicos convencionales³⁵.

Detección bacteriana basada en aptámeros acoplados a nanoestructuras

Se han utilizado aptámeros modificados con deoxiribozima (DNazima) inmovilizados sobre nanotubos de carbono (SWNTs) para la detección de *Salmonella paratyphi A*, donde el complejo aptámero-*S. paratyphi A* genera un cambio conformacional del extremo modificado con DNazima, permitiéndole formar complejos con heminas (adicionadas a la solución) que, en presencia de luminol (también adicionado al sistema), catalizan la generación de quimioluminiscencia en presencia de H₂O₂ con LDD de 10³ UFC/mL³⁶.

Asimismo, se han diseñado sistemas más elaborados para la detección de patógenos, como la plataforma de optofluidos construida para detectar la señal fluorescente de aptámeros anti-*E. coli* acoplados a NPs fluorescentes (FNPs), donde el microflujo de cultivos a través del microcanal del sistema permitió identificar ~100 células de *E. coli* por segundo mediante la señal fluorescente de las FNPs unidas a ellas, resultados que fueron confirmados por recuento en placa³⁷.

También se han diseñado sistemas multiplex para la detección de patógenos, como la inmovilización de aptámeros anti-*S. typhi*

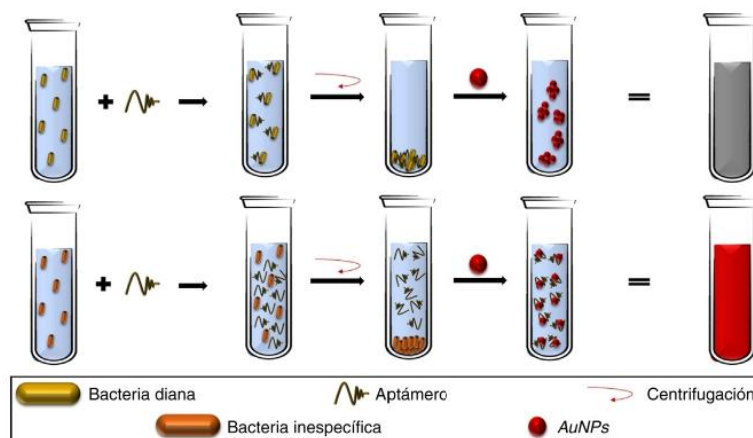


Figura 3. Los aptámeros adicionados a un caldo bacteriano ligan con especificidad a las bacterias diana, por lo que, al recuperar el botón celular mediante centrifugación, no hay aptámeros libres en la solución, permitiendo la agregación de AuNPs. Por otra parte, la ausencia de la bacteria específica permite la presencia de aptámeros libres, que mantienen dispersadas a las AuNPs.

AuNPs: nanopartículas de oro.

murium, anti-*V. parahemolyticus* y anti-*S. aureus* modificados con fluorocromos diferentes (FAM, colorante 3 de cianina (CY3) y 6-carboxi-X-rodamina (ROX)) para detectar cada patógeno mediante fluorescencia. Los aptámeros fueron inmovilizados en NPs de carbono (CNPs) que permiten el ensamble de colorantes inhibiendo su fluorescencia, pero cuando los aptámeros reconocieron a su patógeno diana se disociaron de las CNPs resultando en la emisión y detección de fluorescencia^{10,38} con LDD de 50, 25 y 50 UFC/mL, respectivamente, validados por recuento en placa³⁸.

Por otro lado, también se ha utilizado la relación entre vancomicina y *S. aureus* para el estudio piloto de una estrategia de detección mediante la variación en la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), utilizando AuNCs conjugadas a la vancomicina como elemento donador de energía y aptámeros anti-*S. aureus* inmovilizados sobre AuNPs como elemento receptor de energía, constituyendo las unidades de reconocimiento dual basado en FRET (DRU-FRET). Ambos sistemas son atraídos en presencia del patógeno, ocasionando la variación de FRET y habilitando LDD de 10 UFC/mL³⁹.

Existen otras evidencias de estudios piloto sobre estrategias basadas en elementos donadores y receptores de energía, como el uso de aptámeros anti-*E. coli* inmovilizados sobre AuNPs (elemento receptor de energía) y UCNP acoplados a un oligonucleótido de ADN complementario (ADNC) a la secuencia del aptámero (elemento donador de energía), los cuales al ser hibridados inhiben la producción de fluorescencia de las UCNP, pero en presencia del patógeno, el aptámero lo liga disociando su interacción con las UCNP y ocasionando la emisión de fluorescencia con LDD de 3 UFC/mL⁴⁰.

Estrategias de detección bacteriana basadas en aptámeros no acoplados a nanopartículas

Los aptámeros y las NPs se pueden utilizar sin conjugar para la detección de microorganismos específicos. Algunas propiedades, tales como la interacción natural entre aptámeros y AuNPs, han sido útiles para diseñar métodos de detección para *E. coli*, *S. typhimurium* y *S. aureus*. Los estudios de pruebas de concepto han demostrado que los aptámeros libres inhiben la agregación de las AuNPs, pero en presencia de los patógenos blanco, los aptámeros ligan a las bacterias permitiendo la agregación de las AuNPs (produciendo cambio de coloración de la solución)^{7,10,21,41}.

Así también, los aptámeros se pueden utilizar como elementos de reconocimiento y captura de microorganismos, como los métodos de detección descritos para *S. aureus*⁴², *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*⁴³, donde al adicionar aptámeros a soluciones bacterianas, los aptámeros se unen específicamente a su patógeno objetivo, siendo eliminados al descartar el botón celular y permitiendo la agregación de las AuNPs (adicionadas al sobrenadante), obteniendo LDD de $5,6 \times 10^5$ UFC/mL (fig. 3), con valores de sensibilidad y especificidad del 80,0% y 93,3%, respectivamente, validados por cultivos suplementados con tazobactam (método estándar)⁴³, abriendo la oportunidad de usar plataformas similares para otras bacterias patógenas, pese a presentar dificultades para reconocer diferentes variantes morfológicas de una misma especie bacteriana⁴³.

Terapéutica basada en aptámeros y nanopartículas

Pese a las prometedoras características antimicrobianas de las NPs y la especificidad de los aptámeros, estos no se han empleado ampliamente para desarrollar estrategias terapéuticas. Sin embargo, su uso como nanoportadores de fármacos ha sido una estrategia atractiva^{2,44,45} para incrementar la eficiencia de los antibióticos disponibles⁴⁵.

Las NPs se pueden administrar por diversas vías⁴⁴ y, actualmente, existen tratamientos antibacterianos como PolyMemSilver®, Acticoat™, SilvaSorb™ y Aquace|®Ag², por mencionar algunos, donde las AgNPs figuran como actores principales.

Algunos estudios sugieren toxicidad de ciertas NPs frente a las células del huésped, aunque se pueden modificar para disminuir ese efecto desfavorable¹⁴, como su conjugación con aptámeros⁴⁵ que, adicionalmente, abre la posibilidad de dirigir NPs y/u otros fármacos al sitio apropiado, a concentraciones y periodos de tiempo adecuados², incrementando su poder antimicrobiano en rangos de 3-250 veces^{2,14}, por lo que han sido útiles para el desarrollo de estrategias terapéuticas novedosas frente a diferentes tipos de cáncer¹⁵.

Estudios in vitro de estrategias potencialmente terapéuticas

Respecto a la terapéutica frente a infecciones bacterianas basada en aptámeros y NPs existe evidencia escasa pero alentadora. Una de ellas es la modificación de un aptámero anti-SpA con fGmH (2'-F-dG, 2'-OME-dA/dC/dU), dotándolo de resistencia a la hidrólisis

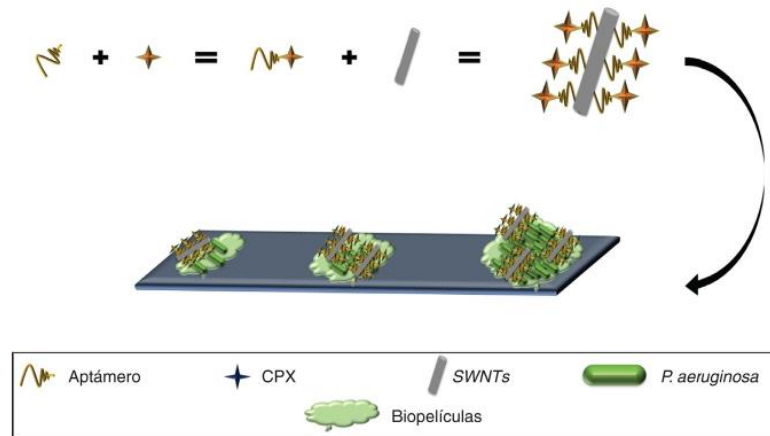


Figura 4. Aptámero anti-*P. aeruginosa* acoplado a CPX, complejo inmovilizado sobre SWNTs, mostrando el reconocimiento y unión a *P. aeruginosa*, inhibiendo el crecimiento bacteriano, formación de biopelículas e incluso la degradación de biopelículas establecidas. CPX: ciprofloxacino; SWNTs: nanotubos de carbono.

alcalina y a nucleasas presentes en suero. Adicionalmente, los aptámeros se conjugan con AgNPs liberando su acción antimicrobiana específica frente a *S. aureus* de manera dependiente de SpA⁴⁶.

El uso de *nano keepers* como nanoportadores de antibióticos ha mostrado su utilidad, como la inmovilización de vancomicina en los poros de MSNs y su posterior conjugación con un aptámero anti-*S. aureus*, depositando el fármaco en el sitio preciso, lo que disminuye su concentración inhibitoria mínima y reduce su toxicidad frente a otras especies relacionadas⁴⁷.

Adicionalmente, el efecto antimicrobiano de las NPs se puede mejorar con el uso de diferentes aptámeros dirigidos frente al mismo patógeno, como lo descrito para *E. coli* donde la inmovilización de tres aptámeros sobre NPs de dióxido de titanio (TiO₂NPs) desactivó al 99,9% de las bacterias en 30 min, en contraste a TiO₂NPs unidas a un aptámero y TiO₂NPs en solitario que las desactivaron en 60 min⁴⁸.

Asimismo, los SWNTs han demostrado poseer actividad frente a biopelículas⁴⁹ (estrategia primaria utilizada por las bacterias para sobrevivir en distintos ambientes)⁵⁰ y se han utilizado para desarrollar un nanocompuesto anti-biopelículas de *P. aeruginosa*, mediante el uso de un aptámero selectivo frente a esta bacteria conjugado con ciprofloxacino (Apt-CPX) y SWNTs (Apt-SWNTs). Adicionalmente se generó una molécula conformada por los tres elementos (Apt-CPX-SWNTs) que en ensayos *in vitro* logró disminuir en un 90% la formación de biopelículas y degradar ~75% de biopelículas establecidas (fig. 4), indicando que estas herramientas se podrían emplear para el tratamiento eficaz de biopelículas⁴⁹.

Ensayos *in vivo* de terapias de erradicación bacteriana

De manera prometedora, se han utilizado aptámeros anti-*S. typhimurium* marcados con histidina y acoplados a AuNPs (AuNP-Apt^{His}), complejo a su vez conjugado a péptidos antimicrobianos marcados con hexahistidina (A3-APO^{His}), para erradicar infecciones intracelulares por *S. typhimurium*, demostrando su funcionamiento *in vitro*, al liberar a A3-APO^{His} dentro de células HeLa infectadas con la bacteria. Asimismo, en ensayos *in vivo* realizados en ratones infectados con dosis que causaban la muerte del animal en 4-5 días, la molécula permitió su supervivencia, al erradicar al patógeno, hecho que se comprobó por la disminución del número de células bacterianas viables en un ~93-98% en cultivos procedentes de los órganos infectados de cada ratón⁵¹, sugiriendo que el uso combinado de aptámeros, NPs e incluso otros compuestos

antimicrobianos puede ser útil para el desarrollo de terapias eficaces frente a infecciones causadas por bacterias.

Conclusiones

En los últimos años, la biomedicina nanométrica ha venido posicionándose como una herramienta prometedora para el diagnóstico, prevención y tratamiento de diversas enfermedades, donde los aptámeros y las NPs han demostrado su aplicabilidad para el diagnóstico y tratamiento de diferentes enfermedades. En las infecciones bacterianas, las pruebas de concepto del uso combinado de ambos elementos han permitido detectar células bacterianas individuales de manera rápida y específica, por lo que la implementación en un futuro de esas metodologías podría traducirse en diagnósticos precisos, que mejorarían el pronóstico de los pacientes infectados al recibir terapias específicas y precoces para la erradicación del agente infectante. Asimismo, los estudios *in vivo* de nanoestructuras complejas constituidas por NPs, aptámeros e incluso otros compuestos antimicrobianos han demostrado que podrían constituir una herramienta poderosa frente a la «crisis de resistencia a los antibióticos», permitiendo erradicar infecciones con dosis bajas de antimicrobianos al depositarlos multivalentemente en el sitio adecuado y durante el periodo de tiempo preciso, constituyendo una terapia ideal que no afectaría al microbioma de órganos o tejidos ni a las células del huésped. Estos avances tecnológicos sugieren que próximamente podrían existir herramientas rápidas y específicas basadas en NPs y aptámeros para el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

Financiación

Juan Carlos Gutiérrez Santana es beneficiado con el apoyo de beca 2018-000068-02NACF-28106 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México, agradeciendo a este organismo su apoyo. Este trabajo está financiado por fondos federales, México, del Instituto Nacional de Pediatría, autorización 068/2019.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Siddiqi KS, Husen A, Rao RAK. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J Nanobiotechnology*. 2018;16:14.
- Zazo H, Colino CI, Lanao JM. Current applications of nanoparticles in infectious diseases. *J Control Release*. 2016;224:86–102.
- Khameneh B, Diab R, Ghazvini K, Fazly Bazzaz BS. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microb Pathog*. 2016;95:32–42.
- Parisi OI, Scrivano L, Sinicropi MS, Puoci F. Polymeric nanoparticle constructs as devices for antibacterial therapy. *Curr Opin Pharmacol*. 2017;36:72–7.
- Park KS. Nucleic acid aptamer-based methods for diagnosis of infections. *Biosens Bioelectron*. 2018;102:179–88.
- Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T*. 2015;40:277–83.
- Urmann K, Modrejewski J, Scheper T, Walter JG. Aptamer-modified nanomaterials: principles and applications. *BioNanoMat*. 2017;18, 20160012201600217.
- Davydova A, Vorobjeva M, Pysnyu D, Altman V, Vlassov V, Venyaminova A. Aptamers against pathogenic microorganisms. *Crit Rev Microbiol*. 2016;42:847–65.
- Sun H, Zu YA. Highlight of recent advances in aptamer technology and its application. *Molecules*. 2015;20:11959–80.
- Duan N, Wu S, Dai S, Gu H, Hao L, Ye H, et al. Advances in aptasensors for the detection of food contaminants. *Analyst*. 2016;141:3942–61.
- Sun H, Zhu X, Lu PY, Rosato RR, Tan W, Zu Y. Oligonucleotide aptamers: new tools for targeted cancer therapy. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2014;3:e182.
- Ruscito A, DeRosa MC. Small-molecule binding aptamers: selection strategies, characterization, and applications. *Front Chem*. 2016;4:14.
- Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: properties, applications and toxicities. *Arab J Chem*. 2019;12:908–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabj.2017.05.011>.
- Li J, Tang M, Xue Y. Review of the effects of silver nanoparticle exposure on gut bacteria. *J Appl Toxicol*. 2019;39:27–37. <http://dx.doi.org/10.1002/jat.3729>.
- Benedetto G, Vestal CG, Richardson C. Aptamer-functionalized nanoparticles as 'smart bombs': the unrealized potential for personalized medicine and targeted cancer treatment. *Target Oncol*. 2015;10:467–85.
- Kong RM, Zhang XB, Chen Z, Tan W. Aptamer-assembled nanomaterials for biosensing and biomedical applications. *Small*. 2011;7:2428–36.
- Dwarakanath S, Bruno JG, Shastri A, Phillips T, John A, Kumar A, et al. Quantum dot-antibody and aptamer conjugates shift fluorescence upon binding bacteria. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;325:739–43.
- Fowler CC, Navani NK, Brown ED, Li Y. Aptamers and their potential as recognition elements for the detection of bacteria. In: Zourob M, Sauna E, Turner APF, editors. *Principles of bacterial detection: Biosensors, recognition receptors and microsystems*. New York: Springer-Verlag; 2008. p. 689–714.
- Kim LH, Yu HW, Kim YH, Kim IS, Jang A. Potential of fluorophore labeled aptamers for *Pseudomonas aeruginosa* detection in drinking water. *J Korean Soc Appl Biol Chem*. 2013;56:165–71.
- Ansari N, Yazdian-Robati R, Shahdordizadeh M, Wang Z, Ghazvini K. Aptasensors for quantitative detection of *Salmonella Typhimurium*. *Anal Biochem*. 2017;533:18–25.
- Wang L, Wang R, Wei H, Li Y. Selection of aptamers against pathogenic bacteria and their diagnostics application. *World J Microbiol Biotechnol*. 2018;34:149.
- Wang R, Xu Y, Zhang T, Jiang Y. Rapid and sensitive detection of *Salmonella typhimurium* using aptamer-conjugated carbon dots as fluorescence probe. *Anal Methods*. 2015;7:1701–6.
- Labib M, Zamay AS, Kolovskaya OS, Reshetneva IT, Zamay GS, Kibbee RJ, et al. Aptamer-based impedimetric sensor for bacterial typing. *Anal Chem*. 2012;84:8114–7.
- Oh SY, Heo NS, Shruti S, Cho H-J, Vilian ATE, Kim J, et al. Development of gold nanoparticle-aptamer-based LSPR sensing chips for the rapid detection of *Salmonella typhimurium* in pork meat. *Sci Rep*. 2017;7:10130.
- Yoo SM, Lee SY. Optical biosensors for the detection of pathogenic microorganisms. *Trends Biotechnol*. 2016;34:7–25.
- Yoo SM, Kim DK, Lee SY. Aptamer-functionalized localized surface plasmon resonance sensor for the multiplexed detection of different bacterial species. *Talanta*. 2015;132:112–7.
- Park JY, Jeong HY, Kim MII, Park TJ. Colorimetric detection system for *Salmonella typhimurium* based on peroxidase-like activity of magnetic nanoparticles with DNA aptamers. *J Nanomater*. 2015;2015, 5271265271269.
- Chang YC, Yang C-Y, Sun R-L, Cheng Y-F, Kao W-C, Yang P-C. Rapid single cell detection of *Staphylococcus aureus* by aptamer-conjugated gold nanoparticles. *Sci Rep*. 2013;3:1863.
- Abbaspour A, Norouz-Sarvestani F, Noori A, Soltani N. Aptamer-conjugated silver nanoparticles for electrochemical dual-aptamer-based sandwich detection of *Staphylococcus aureus*. *Biosens Bioelectron*. 2015;68:149–55.
- Duan N, Wu S, Zhu C, Ma X, Wang Z, Yu Y, et al. Dual-color upconversion fluorescence and aptamer-functionalized magnetic nanoparticles-based bioassay for the simultaneous detection of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *Anal Chim Acta*. 2012;723:1–6.
- Wu S, Duan N, Shi Z, Fang C, Wang Z. Simultaneous aptasensor for multiplex pathogenic bacteria detection based on multicolor upconversion nanoparticles labels. *Anal Chem*. 2014;86:3100–7.
- Borsa BA, Tuna BG, Hernandez FJ, Hernandez LI, Bayramoglu G, Arica MY, et al. *Staphylococcus aureus* detection in blood samples by silica nanoparticle-oligonucleotides conjugates. *Biosens Bioelectron*. 2016;86:27–32.
- Cheng D, Yu M, Fu F, Han W, Li G, Xie J, et al. Dual recognition strategy for specific and sensitive detection of bacteria using aptamer-coated magnetic beads and antibiotic-capped gold nanoclusters. *Anal Chem*. 2016;88:820–5.
- Duan N, Wu S, Chen X, Huang Y, Xia Y, Ma X, et al. Selection and characterization of aptamers against *Salmonella typhimurium* using whole-bacterium systemic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). *J Agric Food Chem*. 2013;61:3229–34.
- Qiao J, Meng X, Sun Y, Li Q, Zhao R, Zhang Y, et al. Aptamer-based fluorometric assay for direct identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples. *J Microbiol Methods*. 2018;153:92–8.
- Yang M, Peng Z, Ning Y, Chen Y, Zhou Q, Deng L. Highly specific and cost-efficient detection of *Salmonella Paratyphi A* combining aptamers with single-walled carbon nanotubes. *Sensors*. 2013;13:6865–81.
- Chung J, Kang JS, Jurng JS, Jung JH, Kim BC. Fast and continuous microorganism detection using aptamer-conjugated fluorescent nanoparticles on an optofluidic platform. *Biosens Bioelectron*. 2015;67:303–8.
- Duan N, Gong W, Wang Z, Wu S. An aptasensor based on fluorescence resonance energy transfer for multiplexed pathogenic bacteria determination. *Anal Methods*. 2016;8:1390–5.
- Yu M, Wang H, Fu F, Li L, Li J, Li G, et al. Dual-recognition Förster resonance energy transfer based platform for one-step sensitive detection of pathogenic bacteria using fluorescent vancomycin-gold nanoclusters and aptamer-gold nanoparticles. *Anal Chem*. 2017;89:4085–90.
- Jin B, Wang S, Lin M, Jin Y, Zhang S, Cui X, et al. Upconversion nanoparticles based FRET aptasensor for rapid and ultrasensitive bacteria detection. *Biosens Bioelectron*. 2017;90:525–33.
- Lavu PSR, Mondal B, Ramlal S, Murali HS, Batra HV. Selection and characterization of aptamers using a modified whole cell bacterium SELEX for the detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *ACS Comb Sci*. 2016;18:292–301.
- Chang T, Wang L, Zhao K, Ge Y, He M, Li G. Duplex identification of *Staphylococcus aureus* by aptamer and gold nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol*. 2016;16:5513–9.
- Kim YJ, Kim H-S, Chon J-W, Kim D-H, Hyeon J-Y, Seo K-H. New colorimetric aptasensor for rapid on-site detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken carcass samples. *Anal Chim Acta*. 2018;1029:78–85.
- Kavoosi F, Modaresi F, Sanaei M, Rezaei Z. Medical and dental applications of nanomedicines. *APMIS*. 2018;126:795–803.
- Gao W, Chen Y, Zhang Y, Zhang Q, Zhang L. Nanoparticle-based local antimicrobial drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018;127:46–57.
- Friedman AD, Kim D, Liu R. Highly stable aptamers selected from a 2'-fully modified fGmH RNA library for targeting biomaterials. *Biomaterials*. 2015;36:110–23.
- Kavruk M, Celikbicak O, Ozalp VC, Borsa BA, Hernandez FJ, Bayramoglu G, et al. Antibiotic loaded nanocapsules functionalized with aptamer gates for targeted destruction of pathogens. *Chem Commun*. 2015;51:8492–5.
- Song MY, Jurng J, Park YK, Kim BC. An aptamer cocktail-functionalized photocatalyst with enhanced antibacterial efficiency towards target bacteria. *J Hazard Mater*. 2016;318:247–54.
- Wang S, Mao B, Wu M, Liang J, Deng L. Influence of aptamer-targeted anti-biofilm agents for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2018;111:199–208.
- Flynn KM, Dowell G, Johnson TM, Koestler BJ, Waters CM, Cooper VS. Evolution of ecological diversity in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* by altered cyclic di-guanylate signaling. *J Bacteriol*. 2016;198:2608–18.
- Yeom JH, Lee B, Kim D, Lee J-K, Kim S, Bae J, et al. Gold nanoparticle-DNA aptamer conjugate-assisted delivery of antimicrobial peptide effectively eliminates intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biomaterials*. 2016;104:43–51.



High Rates of Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Children with Cystic Fibrosis

Juan C. Gutiérrez-Santana^{1,2} · Armando Gerónimo-Gallegos² · Mónica B. Martínez-Corona³ · Marisol López-López⁴ · Julia D. Toscano-Garibay⁵ · Francisco Cuevas-Schacht⁶ · Víctor R. Coria-Jiménez²

Received: 30 March 2022 / Accepted: 19 September 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2022

Abstract

Pseudomonas aeruginosa has a high adaptive capacity, favoring the selection of antibiotic-resistant strains, which are currently considered a global health problem. The purpose of this work was to investigate the rate and distribution of extensively drug-resistant (XDR) *P. aeruginosa* in pediatric patients with cystic fibrosis (CF) with recurrent infections and to distinguish the current efficacy of antibiotics commonly used in eradication therapy at a Mexican institute focused on children. A total of 118 *P. aeruginosa* isolates from 25 children with CF (2015–2019) underwent molecular identification, antimicrobial sensitivity tests, and Random Amplified Polymorphic DNA genotyping (RAPD-PCR). The bacterial isolates were grouped in 84 RAPD profiles, revealing a cross-infection between two sisters, whose resistance profile remained unchanged for more than 2 years. Furthermore, 77.1% (91/118) and 51.7% (61/118) of isolates showed in vitro susceptibility to ceftazidime and amikacin, respectively, antibiotics often used in eradication therapy at our institution. As well, 42.4% (50/118) were categorized as multi-drug resistant (MDR) and 12.7% (15/118) were XDR. Of these resistant isolates, 84.6% (55/65) were identified from patients with recurrent infections. The high frequency of XDR strains in children with CF should be considered a caution mark, as such resistance patterns are more commonly found in adult patients. Additionally, amikacin may soon prove ineffective. Careful use of available antibiotics is crucial before therapeutic possibilities are reduced and “antibiotic resistance crisis” worsens.

Introduction

The rapid emergence of resistant pathogens has been considered as a major health problem [1], and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) is among the critical priority pathogens listed by the World Health Organization (WHO) [2].

P. aeruginosa is recognized as an opportunistic pathogen that causes pulmonary infections in patients with CF [3]. A wide number of selective pressures converge in the lungs of CF patients, but *P. aeruginosa* manages to persist due to its high adaptive capacity resulting in a large heterogeneity of *P. aeruginosa* phenotypes [4, 5].

✉ Juan C. Gutiérrez-Santana
biol.jcgutierrez@gmail.com

✉ Víctor R. Coria-Jiménez
coria.rafael@gmail.com

¹ Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico, Mexico

² Laboratory of Experimental Bacteriology, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes sur 3700-C, Col. Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán, C.P. 04530 Mexico, Mexico

³ Department of Man and His Environment, Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Coyoacán, C.P. 04960 Mexico, Mexico

⁴ Department of Biological Systems, Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Quietud, Coyoacán, C.P. 04960 Mexico, Mexico

⁵ Directorate for Planning, Education and Research, Hospital Regional de Alta Especialidad de Ixtapaluca, Carretera Federal México-Puebla Km. 34.5, Pueblo de Zoquiapan, C. P. 56530 Ixtapaluca, Estado de Mexico, Mexico

⁶ Department of Pulmonology and Chest Surgery, Instituto Nacional de Pediatría, Insurgentes Sur 3700-C, Col. Insurgentes Cuicuilco, Coyoacán, C.P. 04530 Mexico, Mexico

The use of molecular tools has become essential for the detection and identification of *P. aeruginosa* [6] and in the control, recognition of transmission routes and prevention of infections among patients with CF [7, 8].

Among the methods commonly used for molecular typing are multi-locus sequence typing (MLST), which has become very popular in molecular evolution studies [6] and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), considered the “gold standard” [8]; the primary disadvantages of these methods are that they are costly and time consuming [6]. On the other hand, Random amplification of polymorphic DNA by PCR (RAPD-PCR), a simple, reproducible, and rapid technique, has demonstrated adequate discriminatory power in the detection of clonal relationships [7, 9].

Patients with CF undergo early, prolonged, and aggressive antibiotic therapy after *P. aeruginosa* is first identified in respiratory secretions, with the aim of slowing or preventing progression to a chronic infection [6], associated with the rapid deterioration of lung function and an increase in morbidity and mortality [8]. However, the broad intrinsic resistance of this bacterium against various antibiotics [10] and its extraordinary adaptive capacity favor the selection of multi-drug-resistant (MDR) strains [9], making the available eradication therapies less effective [10].

In recent years, the incidence of MDR strains of *P. aeruginosa* in patients with CF has been increasing, i.e., from 15.7%, as described in the 2013 annual report of the Cystic Fibrosis Foundation to 31.8%, as reported by several health care centers in 2017 [11].

The objective of this study was to determine the rate and distribution of MDR and extensively drug-resistant (XDR) *P. aeruginosa*, as well as to distinguish the current efficacy of antibiotics commonly used in eradication therapy of *P. aeruginosa* isolates from patients with CF with recurrent infections treated at the Department of Pneumology and Thoracic Surgery of the National Institute of Pediatrics (SNCT-INP, acronym in Spanish) between 2015 and 2019, by changes in resistance patterns from the initial isolates toward their latest identification.

Materials and Methods

Bacteria and Culture Conditions

A total of 118 bacterial isolates from 57 respiratory secretions samples from 25 children with CF treated at the SNCT-INP between April 2015 and July 2019 were identified as *P. aeruginosa* by biochemical tests established at the Laboratory of Experimental Bacteriology at INP (LBE-INP), following the recommendations of the American Society for Microbiology (ASM) [12]. More than one colony was selected from some samples depending

on the diversity of the colonial morphology visualized in the initial isolation, and each isolate was classified as “mucoid” or “nonmucoid” based on its colonial phenotype. Three reference strains of *P. aeruginosa* (ATCC® 27853, ATCC® 27855™, and ATCC® 15692™) and three non-*P. aeruginosa* strains (*P. alcaligenes*, *B. cepacia*, and *S. maltophilia*) stored at 4 °C at LBE-INP were used as controls.

The isolates were inoculated in Brain Heart Infusion broth (BHI, Becton Dickinson, USA) and incubated at 37 °C for 24 h. An aliquot of this culture was streaked in MacConkey agar (CMA, Becton Dickinson, USA) and incubated under same conditions. Single colonies were selected, inoculated in BHI broth, incubated, and used to obtain genomic DNA and to identify antibiotic sensitivity profiles.

Molecular Identification of *P. aeruginosa* Isolates

Genomic DNA (gDNA) was extracted from each strain in accordance with the protocol described by Pitcher et al. [13], with the following modifications. Lysis solution contained 60 g of guanidine thiocyanate (GES; Sigma–Aldrich®, USA), 20 mL of 0.5 M EDTA, pH 8.0 (Promega Corporation, USA), and 5 mL of 10% N-lauryl-sarkosyl (Sigma–Aldrich®, USA) [13], plus 5 µL of proteinase K (200 µg/mL) [14]. Two organic extractions were performed using phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) followed by chloroform extraction (both from Sigma–Aldrich®, USA) [14]. Finally, after the gDNA of each isolate was precipitated and washed [13], each pellet was dissolved in 50 µL of nuclease-free water (H₂O_{NF}, Promega®, USA).

The purity and integrity of the extracted gDNA were evaluated with a UV–Vis spectrophotometer (NanoDrop2000, Thermo Fisher Scientific, USA) following the manufacturer’s recommendations and by electrophoresis in 0.5% agarose gels stained with ethidium bromide [13], respectively.

Two independent PCR assays were performed for the molecular identification, using the pairs of species-specific primers for *P. aeruginosa* PA1/PA2 [15] and PA431CF/PA431CR [16] (both pairs from Applied Biosystems®, USA). The reaction mixtures consisted of 12.5 µL of GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation®, USA), 0.1 µM of each primer (except for PA431CF/PA431CR, 0.04 µM), and 20 ng of gDNA from each isolate. The amplification conditions for PA431CF/PA431CR were an initial denaturation step of 3 min at 95 °C, 33 cycles of 60 s at 95 °C, 30 s at 63 °C, and 60 s at 72 °C and for PA1/PA2 were an initial denaturation step of 5 min at 95 °C, 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 58 °C, and 60 s at 72 °C, and a final extension step of 10 min at 72 °C. Both amplifications were performed in an Arktik thermal cycler (Arktik Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific, USA).

Antibiotic Susceptibility Tests and Resistance Categorization

Culture broths of each strain were grown until absorbance reach 0.07–0.08 of OD₆₂₅ (UV–Vis spectrophotometer, DU 640, Beckman, USA), which was equivalent to 0.5 McFarland tube turbidity (1×10^8 CFU mL⁻¹) [17]. Susceptibility profiles toward seven antibiotic families were obtained by disk diffusion method, in accordance with the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute of the USA (CLSI) [18].

The antibiotics evaluated were piperacillin (PIP), ceftazidime (CAZ), aztreonam (ATM), imipenem (IPM), ciprofloxacin (CIP), ofloxacin (OFX), norfloxacin (NOR), and polymyxin B (PB) from Becton Dickinson, USA. Cefotaxime (CTX), ceftriaxone (CRO), cefepime (FEP), amikacin (AK), gentamicin (CN), netilmicin (NET) and levofloxacin (LVX) from Oxoid Ltd., England. Carbenicillin (CRB), meropenem (MEM), and colistin (CL) from Bio-Rad Laboratories, Inc.

Isolates were categorized based on their susceptibility profiles as *pan-susceptible* (PanS) to all the antibiotics tested; non-susceptible to at least one agent of a family of antibiotics (DR1); non-susceptible to at least one agent of two families of antibiotics (DR2); MDR, i.e., not susceptible to at least one agent of three or more families of antibiotics; and as extensively resistant to antibiotics (XDR), when no-susceptibility was found to at least one agent of all families of anti-*Pseudomonas* antibiotics except two families [11, 19].

RAPD-PCR of *P. aeruginosa* Isolates

Genotyping of isolates was performed by two independent random amplification of polymorphic DNA PCR (RAPD-PCR) assays with two different primers: OPY-2 (5'CATCGC CGCA3') [20] and Primer 272 (5'AGCGGGCCAA3') [21] (both from T4OLIGO®, Mexico).

The reaction mixtures consisted of 12.5 µL of GoTaq® Green Master Mix, 3 µM OPY-2 (1.5 µM Primer 272), and 80 ng of gDNA. The amplification conditions comprised an initial denaturation at 96 °C/2 min, a cycle of 95 °C/5 min, 36 °C/5 min, and 72 °C/min, followed by 38 cycles with same temperatures but kept for 30 s.

The RAPD-PCR products were loaded and run in 11% denaturing polyacrylamide gels (acrylamide:bisacrylamide 19:1) containing 6 M urea (Promega®, USA) (Urea-PAGE) as described by Summer et al. [22]. The gels were stained with AgNO₃ using a previously described method [23]. Molecular weight (MW) of each fragment was calculated supported by two different MW standards and the Hames approach [24], and the migration distances (each fragment and dye front) were obtained with the measure tool in GIMP version 2.10 (GNU Image Manipulation Program, [http://](http://www.gimp.org/)

www.gimp.org/, RRID:SCR_003182) avoiding smeared fragments. The dendrogram was generated with combined data of both primers, by means of the Jaccard similarity coefficient using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) [25], and the bioinformatics program PAST (Hammer, Harper, DAT, Ryan, PD 2001, RRID:SCR_019129) version 3.12. Isolates with similarity percentage $\geq 80\%$ were considered the same [21].

Results

Colony Phenotype and Molecular Identification of *P. aeruginosa*

The demographic characteristics of the 25 hosts and 118 *P. aeruginosa* isolates are provided in Table A1 in Supplementary material. In accordance to phenotype displayed at the initial isolation, 45.7% (54/118) and 54.2% (64/118) were mucoid and nonmucoid strains, respectively. A total of 83.3% (45/54) of the mucoid isolates were isolated from eight patients with recurrent infections (patients with two or more *P. aeruginosa* isolates during the time range of this study) and even more, 95.5% (43/45) of them were isolated from six patients with chronic infections according to “Leeds criteria” [26].

All *P. aeruginosa* isolates showed a 181-bp amplicon corresponding to a fragment of the internal transcript spacer (ITS) from 16S-23S rDNA gene, obtained using PA1/PA2 primer pairs and a 232-bp amplicon, obtained through PA431CF/PA431CR primers corresponding to a fragment of acetylase O-antigen gene (Fig. 1).

Antibiotic Resistance and Categorization

The 118 *P. aeruginosa* isolates displayed high in vitro susceptibility to CL and PB (100%), while the susceptibility to the remaining 16 antibiotics was less than 80%; among these, NOR (77.1%, 91/118), CAZ (77.1%, 91/118) and CRB (70.3%, 83/118) were the most effective anti-*Pseudomonas* antibiotics; AK (51.7%, 61/118) had intermediate effectiveness, and PIP (35.6%, 42/118), CRO (22.9%, 27/118) and CTX (9.3%, 11/118) were the least effective against the analyzed isolates.

The isolates were categorized into five groups based on their antibiotic resistance (Table A2 in Supplementary material), corresponding to PanS (11.0%, 13/118), DR1 (15.2%, 18/118), DR2 (18.6%, 22/118), MDR (42.5%, 50/118), and XDR (12.7%, 15/118), respectively. Isolates of the latter two categories accounted for 55% (65/118) of all isolates and 84.6% (55/65) of them were obtained from patients with recurrent infections.

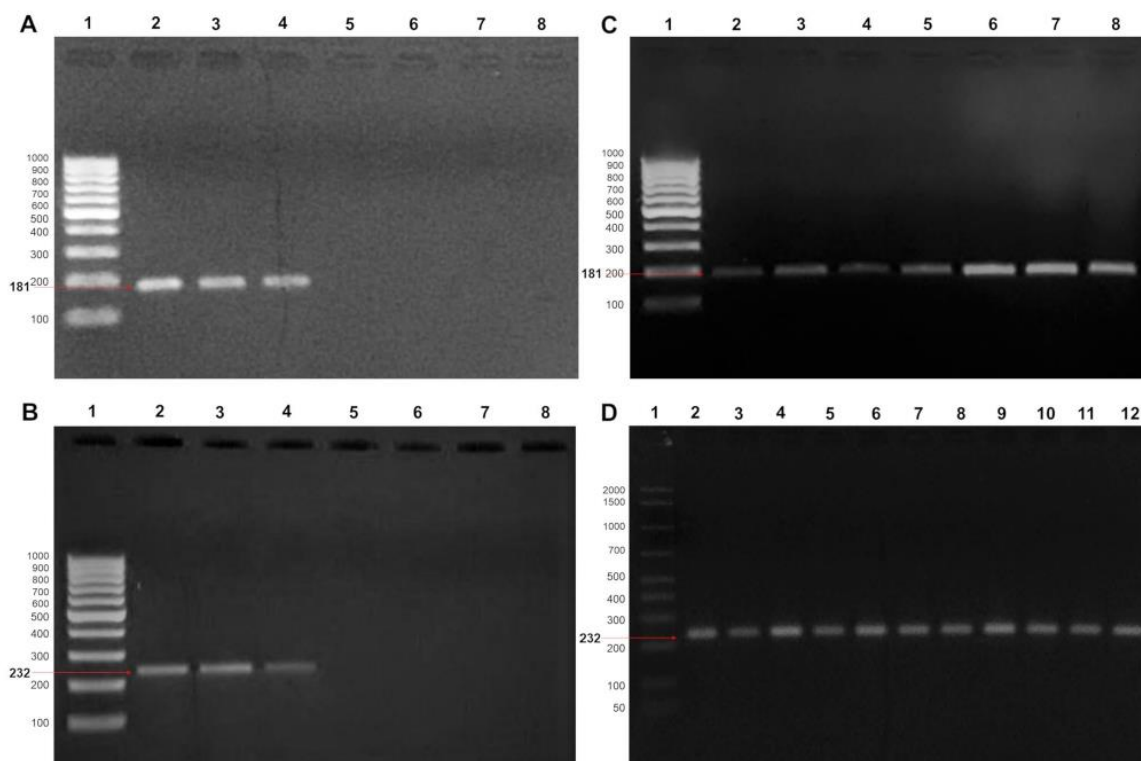


Fig. 1 Molecular identification of clinical isolates of *P. aeruginosa*. Visualization of specific amplicons of genetic regions corresponding to 16S-23S rDNA ITS (A, C) and O-antigen acetylase (B, D). For the gels in A and C, lanes 2–4 are *P. aeruginosa* reference strains (ATCC® 27853™, ATCC® 27855™, and ATCC® 15692™, respectively), lanes 5–7 are non-*P. aeruginosa* strains (*P. alcaligenes*,

B. cepacia, and *S. maltophilia*, respectively), and lane 8 is the negative control. For the gel B, lanes 2–8 are clinical isolates (Pa17mb, Pa21ma, Pa21mb, Pa22r, Pa25r, Pa26r, and Pa27ma), similar to lanes 2–8 in gel D (Pa01r, Pa02m, Pa03m, Pa05r, Pa06r, Pa12r, Pa17ma, Pa17mb, Pa21ma, Pa21mb, and Pa22r). Lane 1 of all gels is the molecular weight marker

Molecular Typing by RAPD-PCR

The combination of genetic fingerprint data obtained with OPY-2 and Primer 272 of 118 isolates, plus the Urea-PAGE technique and AgNO₃ staining along with image manipulation software (Fig. 2), allowed the assembly of a dendrogram with 84 RAPD profiles and 46 RAPD clusters with ≥ 80% similarity (Fig. 3). All isolates showed a similarity value to the reference strains of less than 40%. A total of 97.4% (115/118) of the isolates were distributed in unique patient specific clusters, but three isolates from cluster five (Pa33ra, Pa78r, and Pa119r) exhibited cross-infectivity between two sisters (Patients Px10 and Px19). In detail, initial isolate (Pa33ra) showed a DR2 resistance profile and in vitro resistance to CN, which was used as eradication treatment in Px10. Subsequent isolates (Pa78r from Px19 and Pa119 from Px10) maintained the initial resistance profile for more than 2 years (May 2016–September 2018), but showed in vitro susceptibility to CN, AK, and CAZ; the latter two were used as combined antibiotic treatment of both children (Fig. 4).

Eight patients with recurrent infections presented coinfections with isolates of different clusters throughout the period analyzed (Px01, Px02, Px04, Px05, Px08, Px09, Px12, and Px13) and five of them presented momentary coinfections at a same time (Px01, Px02, Px04, Px12, and Px13). Even more, two *P. aeruginosa* isolates from two different clusters (Pa53m and Pa53r from cluster 18 and 40, respectively) were identified in initial isolation from Px12, exhibiting a rapid elimination of cluster 18 isolates (from 28/10/2016 to 15/11/2016) and the identification of isolates from cluster 40 (Pa60m and Pa60r) toward final isolation (Table A2 in Supplementary material).

Profiles of Antibiotic Resistance of Isolates Over Time

81 isolates from eight patients with recurrent infections were distributed in 13 clusters, and it was noticeable that 17 initial bacterial isolates from such clusters displayed diverse adaptive directions in antibiotic resistance over time. In detail,

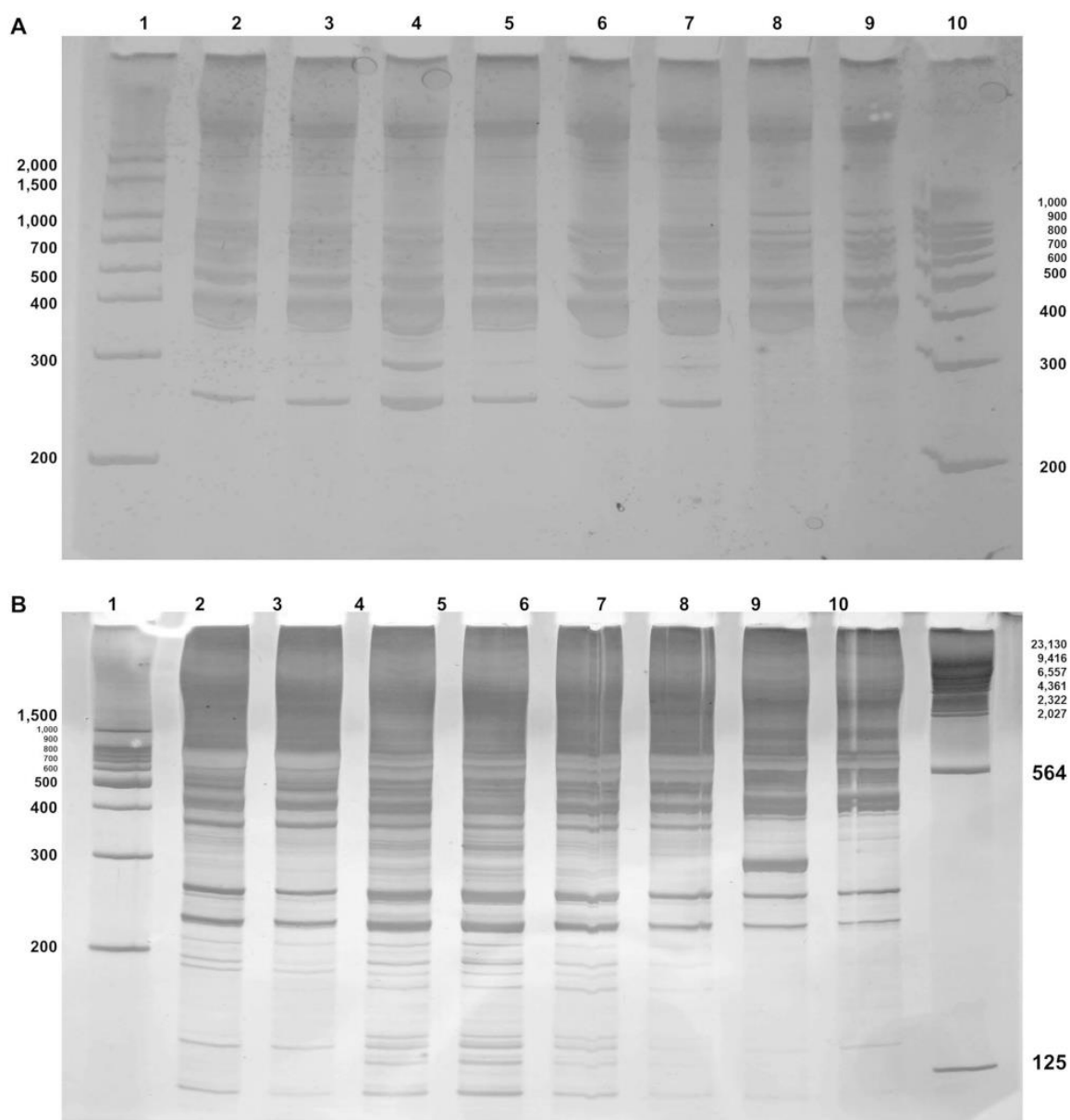


Fig. 2 RAPD-PCR of *P. aeruginosa* isolates. Silver staining of Urea-PAGE gels displaying the genomic fingerprints obtained with **A** Primer OPY-2 of clinical isolates (Pa29ma, Pa29mb, Pa35ma, Pa35mb, Pa35r, Pa36mb, Pa36mc, and Pa37mb) and **B** Primer 272

(Pa112mb, Pa112r, Pa115m, Pa115ra, Pa115rb, Pa115rc, Pa116m, and Pa116ra). Lanes 1 and 10 are two different molecular weight markers, and lanes 2–9 are clinical isolates

23.5% (4/17) exhibited a final antibiotic resistance lower than initially detected (isolates from clusters 12 and 31), 64.7% (11/17) maintained the initial resistance (isolates from clusters 5, 9, 14, 18, 21, 28, 32, 40, and 43), and 11.7% (2/17) increased their resistance (isolates from clusters 11 and 16) (Table A2 in Supplementary material). Fluctuations

were observed in some cases (isolates from clusters 9, 14, 16, 31, and 40) with increases in maintenance and/or loss of susceptibility, which was independent from the last resistance profile obtained.

A total of eight isolates from four patients with recurrent infections showed a PanS phenotype (Pa50ma, Pa90m

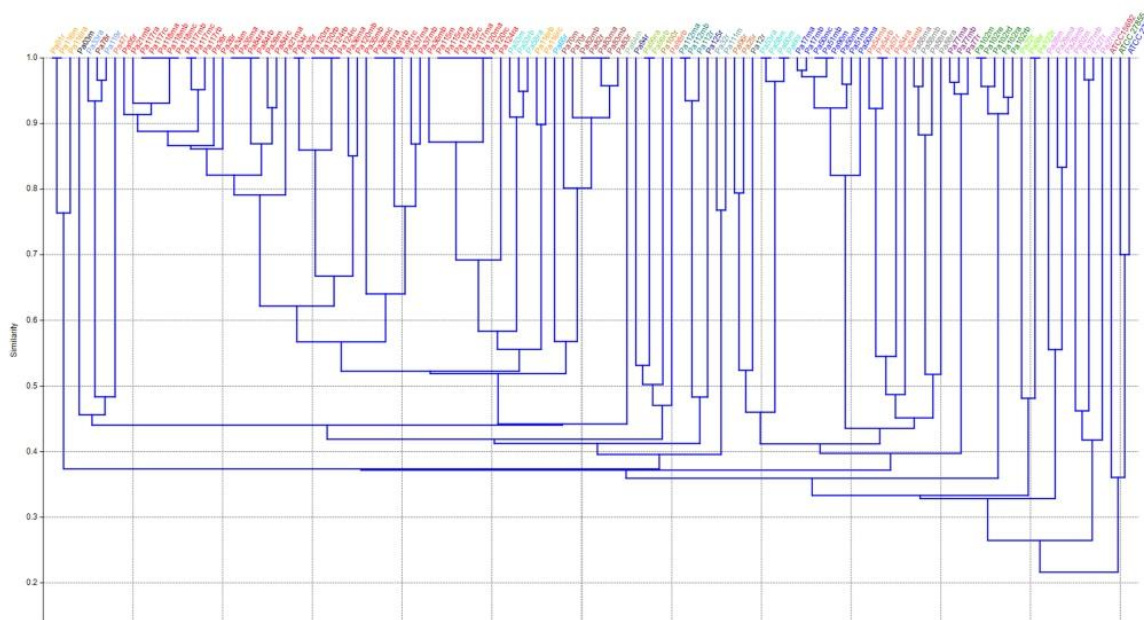


Fig. 3 General dendrogram of *P. aeruginosa* isolates. Dendrogram obtained using the RAPD-PCR amplification products generated with OPY-2/Primer 272 and the grouping of the products based on Jacca-

rd's coefficient of similarity. Each color represents the isolates from different patients and three reference strains

from Px07; Pa91ra and Pa115 from Px04; Pa58m from Px12 and Pa54ma, Pa54rb and Pa57r for Px13) despite of five of them (Pa50ma, Pa57r, Pa58m, Pa91ra, and Pa115m) being isolated from patients under antibiotic treatment.

The first ten isolates from Px04 (individual with the greatest number of clusters and isolates) showed frequencies of MDR and XDR of 50% (5/10) and 10% (1/10), respectively, while the last 10 showed frequencies of 60% (6/10) and 40% (4/10) and in absence of isolates from more susceptible categories (Table 1). Furthermore, their isolates exhibited the adaptive directions of antibiotic resistance and fluctuations described above (Table A2 in Supplementary material). This child was colonized by nine genetically different populations of *P. aeruginosa* across time, four of which were detected only once (isolates from clusters 10, 13, 15, and 17), showing increasingly robust resistance profiles (from DR1 to XDR).

Additionally, five isolates exhibited prolonged infections (from 1.08 to 3.33 years); in cluster 12, Pa36ma and Pa120mb were isolated with a temporal difference of 2.25 years and exhibited a decrease in initial resistance from XDR to MDR, acquiring susceptibility to fluoroquinolones, but exhibited an increase resistance to aminoglycosides, which were used in treatment of this patient [27].

The isolates from clusters 9 and 14 maintained their initial resistance profile (MDR) with some variations, such as fluctuations to DR2 (Pa21ma, Pa34m, Pa39m, and Pa117rc

from cluster 9) and to PanS (Pa91ra from cluster 14). Finally, the isolates from clusters 11 and 16 exhibited increased resistance; Pa34r from cluster 11 increased from DR2 to MDR (Pa35r, Pa120ra, and Pa120rb) and to XDR (Pa124rb and Pa124rc), and in regard to cluster 16, the MDR isolate Pa36mb fluctuated among the five resistance categories of this study over time, with the last isolates being classified as MDR and XDR (Pa120ma and Pa120rc, respectively).

Discussion

There is high heterogeneity among bacterial populations of *P. aeruginosa* within the pulmonary environment of patients with CF, resulting from the cumulative mutations during genomic adaptation processes and from the localization of populations in different pulmonary niches [28]. It is known that lung regions have diverse selective pressures, such as limited nutrients, lower concentration of antibiotics, diverse oxygen gradients, and anaerobe microenvironments, among others [29], all these factors result in diverse phenotypic variants, such as different colonial morphologies or susceptibilities patterns, as well as new genetics variants, such as hypermutant genotypes [4, 29]. Thus, molecular identification based on a single genetic region is insufficient to confirm *P. aeruginosa* by PCR due to its highly polymorphic nature and the tendency for false-negative or false-positive

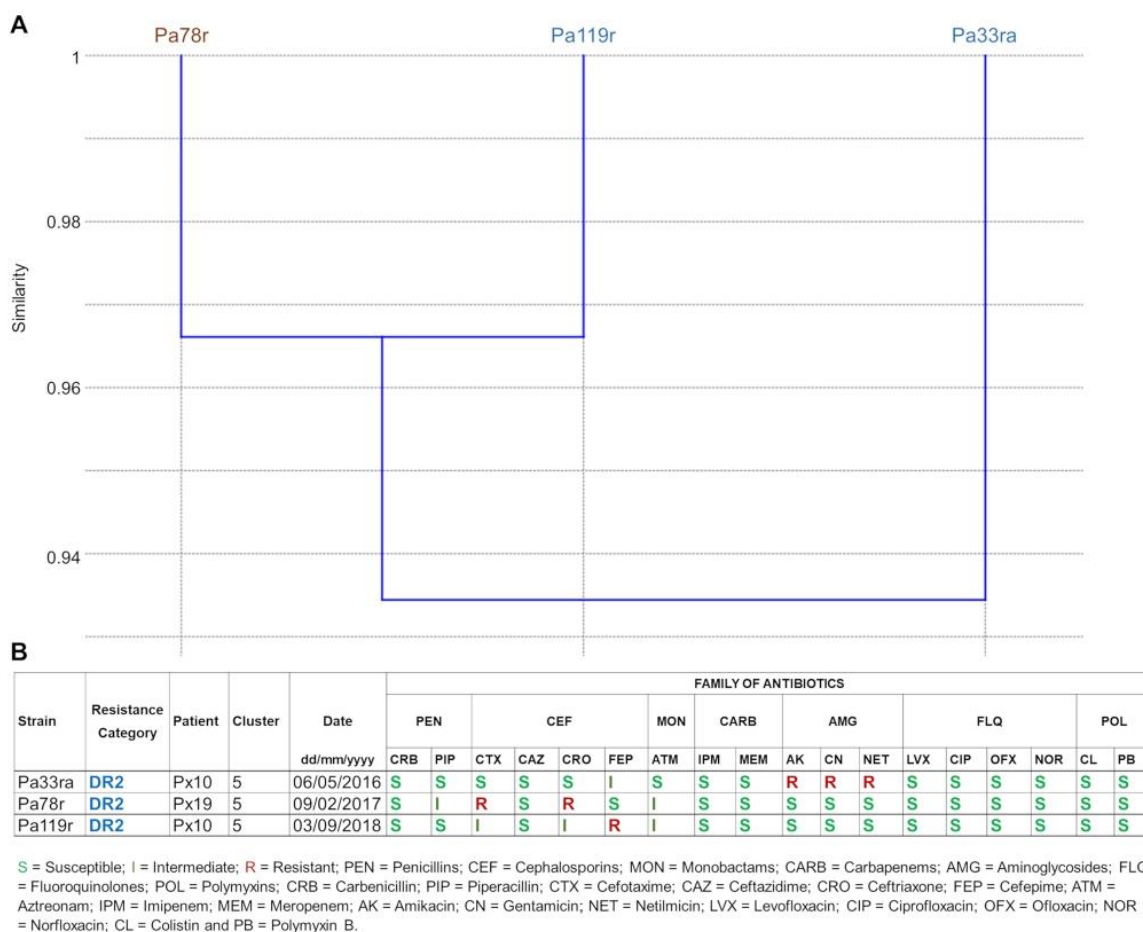


Fig. 4 Cross-infection between two sisters with CF. **A** Dendrogram of isolates with a similarity > 93% identified in two patients with CF (Px10 and Px19) and **B** susceptibility profile of each one

results [16]. Both primer pairs used in this work have demonstrated usefulness for molecular identification of *P. aeruginosa* [15, 16], and the molecular outcomes of this work provide an additional evidence of their performance despite the great genetic variability of analyzed isolates [6].

Furthermore, the use of both primers in RAPD-PCR genotyping, in addition to Urea-PAGE, AgNO₃ staining, and digital analysis demonstrated a higher detection of number of molecular fragment than previously reported in other studies, in which fragments were obtained with a single primer and distinguished in agarose gels [20, 21], demonstrating the advantages of Urea-PAGE [22] and silver staining, which collectively give a sensitivity range of picograms [23] and allow the visualization of 80% more DNA amplicons [30].

The isolates distribution in unique and specific clusters for each patient were consistent with the proposal that

patients are colonized by a single strain of *P. aeruginosa* [8] and demonstrated that the protocol of epidemiological control established in INP is efficient. On the other hand, the cross-infection identified between two patients and the time range among positive samples suggest that the treatments possibly eradicated the infections or decreased bacterial populations in the respiratory tract of these patients; however, they acquired new infections with the same strain in a typically contaminated environment [8], a common situation among patients with CF in the same family [31].

Regarding to colonial morphology and resistance patterns, it has been described that the first strains that infects patients with CF are easier to eradicate; however, they are replaced by others with adequate characteristics to generate long-term infections [32], as mucoid phenotype, which has been associated with eradication failure [33], and their

Table 1 Resistance categories of the first ten *P. aeruginosa* isolates and the last ten isolates from patient Px04

Strain	Resistance category	Patient	Cluster	Date DD/MM/YYYY
Pa05r	MDR	Px04	9	22/05/2015
Pa21ma	DR1	Px04	10	01/11/2015
Pa21mb	DR2	Px04	9	01/11/2015
Pa26r	MDR	Px04	9	25/01/2016
Pa34m	DR2	Px04	9	01/06/2016
Pa34r	DR2	Px04	11	01/06/2016
Pa35ma	MDR	Px04	9	08/06/2016
Pa35mb	MDR	Px04	13	08/06/2016
Pa35r	MDR	Px04	11	08/06/2016
Pa36ma	XDR	Px04	12	15/06/2016
Pa118mb	MDR	Px04	9	03/09/2018
Pa118mc	MDR	Px04	9	03/09/2018
Pa120ma	MDR	Px04	16	26/09/2018
Pa120mb	MDR	Px04	12	26/09/2018
Pa120ra	MDR	Px04	11	26/09/2018
Pa120rb	MDR	Px04	11	26/09/2018
Pa120rc	XDR	Px04	16	26/09/2018
Pa124rb	XDR	Px04	11	16/04/2019
Pa124rc	XDR	Px04	11	16/04/2019
Pa124ra	XDR	Px04	17	16/04/2019

DR1 resistance to one antibiotic family, DR2 resistance to two antibiotic family, MDR multi-drug resistance, XDR extensively drug resistant

identification in children with recurrent infections harmonized with the trend toward chronic infections.

In this work, the frequency of MDR was in line with global increase of MDR in *P. aeruginosa* (from 36% described in 2017 [11] to 42.4% in our institution) and also the frequency of XDR is similar to the reported by certified CF centers [11]; therefore, it should be considered a sign of caution since INP is an institute focused just on infants and it is known that isolates from adults tend to be more resistant than those from children [26]. Additionally, the identification of PanS isolates from patients under antibiotic treatment, and their main mucoid phenotype, could explain their survival in lungs of patients with CF, because such phenotype may promote a biofilm establishment which is a crucial mechanism for persistence [32], in which may converge a diverse bacterial populations with different characteristics [5].

Despite emergence of colistin-resistant *P. aeruginosa* in some countries [34], at INP this antibiotic is still a treatment alternative for pulmonary infections in patients with CF; therefore, it should be used carefully because this bacterium could develop resistance. Furthermore, the main treatment used at INP (AK/CAZ) was effective against most primary infections and, by the time of this publication, it has

not induced important resistances to AK (51.7%, 61/118) nor CAZ; however, the susceptibility to AK is lower than previous works (63.6%) [35] and could become inefficient in a few years, even that treatment tended to be ineffective in patients with recurrent infections. The XDR frequency exhibits the need of a carefully use of available antibiotics, before therapeutic possibilities are reduced and “antibiotic resistance crisis” worsens.

Conclusion

Patients with CF tend to be initially colonized by homogeneous populations of *P. aeruginosa* strains. There may be coinfections with other strains throughout the disease course, but the strain that generates the appropriate adaptations is the one that manages to persist, regardless of its antibiotic resistance. However, the global increase of antibiotic-resistant strains is evident and it is in line with the high rates of XDR strains isolated from pediatric patients with CF reported in this work, which are higher than recent reports from CF centers whose attend children and adult, highlighting the need for the conscious and careful use of still functional antibiotics against this pathogen to slow the progression of “antibiotic resistance crisis.”

Moreover, the host–parasite relationship established between *P. aeruginosa* and the patient with CF is a chronic, dynamic, and evolving relationship that leads to poor quality of life and ultimately to death of the patient. This study highlights the importance of constant surveillance of *P. aeruginosa* infections in these patients due to the heterogeneity of the bacterial populations involved and their individual evolution in each infected host.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03048-4>.

Acknowledgements We thank the members of LBE-INP and the students of Biological and Pharmaceutical Chemistry career track at Metropolitan Autonomous University-Xochimilco, Mexico, i.e., Diana Gloria Contreras Valencia, Pau-Yo Melanie Hernández García, and Miguel Angel González Ortiz, for their support in the extraction of gDNA from the strains included in this study.

Author Contributions All authors contributed to the creation of the article as follows: Conceptualization: JCG-S, and VRCJ; Data curation: JCG-S, and AG-G; Formal analysis and Methodology: MBM-C, AG-G, and JCG-S; Resources: VRCJ, FCS, JDTG, and MLL; Supervision: VRCJ; Writing of the original draft: JCG-S and MBM-C; Writing, reviewing, & editing of the manuscript: VRCJ, JDTG, and MLL. All the authors have reviewed the manuscript and vouch for the accuracy and completeness of the data.

Funding This work was supported by federal funds from the National Institute of Pediatrics, Mexico (authorization 068/2019). Furthermore, J.C.G.S. was supported by scholarship 2018-000068-02NACF-28106

from the National Council of Science and Technology (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [CONACyT]), Mexico.

Data Availability The datasets generated during and/or analyzed during the current study are not publicly available due to confidential information obtained from patients, but the characteristics of hosts and strains are provided in Table A1 in Supplementary material. Additional data can be available from the corresponding author on reasonable request.

Code Availability Software: GNU Image Manipulation Program, RRID: SCR_003182; PAST, RRID: SCR_019129.

Declarations

Competing interest The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could indicate a potential conflict of interest.

Ethical Approval This prospective and observational research is part of a larger project (registration number 068/2019) approved by the Research Committee of the National Institute of Pediatrics (INP). Letters of assent or informed consent were not required by the Ethics Committee of the INP because sampling of respiratory secretions in pediatric patients with CF treated at the SNCT-INP is part of the usual diagnostic and therapeutic regime for these individuals; therefore, they were not subjected to additional risk for this study, and the personal information obtained from the patients remained confidential. The materials, reagents, sample handling and waste disposal, and methodological strategies were approved by the Biosafety Committee of the INP.

Consent to Participate Not applicable.

Consent to Publication Not applicable.

References

- Ventola CL (2015) The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharm Ther* 40:277–283
- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A et al (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 18:318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Sung K, Chon J, Kweon O et al (2021) Dynamic adaptive response of *Pseudomonas aeruginosa* to clindamycin/rifampicin-impregnated catheters. *Antibiotics* 10:752–771. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070752>
- Qin X, Zhou C, Zerr DM et al (2018) Heterogeneous antimicrobial susceptibility characteristics in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *mSphere* 3:e00615-17. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00615-17>
- Camus L, Briaud P, Vandenesch F, Moreau K (2021) How bacterial adaptation to cystic fibrosis environment shapes interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* 12:1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.617784>
- Chen J-W, Lau YY, Krishnan T et al (2018) Recent advances in molecular diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* infection by state-of-the-art genotyping techniques. *Front Microbiol* 9:1104–1112. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01104>
- Auda IG, Al-Kadmy IMS, Kareem SM et al (2017) RAPD- and ERIC-based typing of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J AOAC Int* 100:532–536. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0267>
- Sener Okur D, Yuruyen C, Gungor O et al (2019) Genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Turkish children with cystic fibrosis. *Infect Drug Resist* 12:675–685. <https://doi.org/10.2147/IDR.S183151>
- Vaněrková M, Mališová B, Kotásková I et al (2017) Biofilm formation, antibiotic susceptibility and RAPD genotypes in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from single centre intensive care unit patients. *Folia Microbiol* 62:531–538. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0526-7>
- Kaiser SJ, Muters NT, DeRosa A et al (2017) Determinants for persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in hospitals: interplay between resistance, virulence and biofilm formation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36:243–253. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2792-8>
- Rutter WC, Burgess DR, Burgess DS (2017) Increasing incidence of multidrug resistance among cystic fibrosis respiratory bacterial isolates. *Microb Drug Resist* 23:51–55. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0048>
- Jorgensen JH (2015) Manual of clinical microbiology. ASM Press, Washington. <https://doi.org/10.1128/9781555817381>
- Pitcher DG, Saunders NA, Owen RJ (1989) Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 8:151–156. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>
- da Silva FLV, Levi JE, Oda Bento CN et al (1999) PCR identification of *Pseudomonas aeruginosa* and direct detection in clinical samples from cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol* 48:357–361. <https://doi.org/10.1099/00222615-48-4-357>
- Lavenir R, Jocktane D, Laurent F et al (2007) Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target. *J Microbiol Methods* 70:20–29. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.008>
- Choi HJ, Kim MH, Cho MS et al (2013) Improved PCR for identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:3643–3651. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4709-0>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2018) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI supplement M07, 11th ed. 19087 USA, ISBN:1562388363
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2018) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100, 28th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, 19087 USA, ISBN:1-56238-839-8
- Gill J, Arora S, Khanna S, Kvsh K (2016) Prevalence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and pandrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from a tertiary level Intensive Care Unit. *J Glob Infect Dis* 8:155–159. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.192962>
- Baena del Valle JA, Gomez Alegria CJ, Gomez Camargo DE (2014) Antimicrobial susceptibility and genotypification of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients and other diseases in Cartagena (Colombia). *Salud Uninorte* 30:104–120
- Goli HR, Nahaei MR, Rezaee MA et al (2018) Role of MexAB-OprM and MexXY-OprM efflux pumps and class 1 integrons in resistance to antibiotics in burn and Intensive Care Unit isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Public Health* 11:364–372. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.09.016>
- Summer H, Grämer R, Dröge P (2009) Denaturing urea polyacrylamide gel electrophoresis (Urea PAGE). *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/1485>
- Bassam BJ, Gresshoff PM (2007) Silver staining DNA in polyacrylamide gels. *Nat Protoc* 2:2649–2654. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.330>

24. Hames BD (1998) Gel electrophoresis of proteins: a practical approach, 3rd edn. New York, ISBN:0199636419
25. Mombini S, Rezaatofghi SE, Kiyani L, Motamedi H (2019) Diversity and metallo- β -lactamase-producing genes in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from filters of household water treatment systems. *J Environ Manag* 231:413–418. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.068>
26. Cystic Fibrosis Foundation (2016) Patient Registry Annual Data Report 2015
27. Davies EV, James CE, Brockhurst MA, Winstanley C (2017) Evolutionary diversification of *Pseudomonas aeruginosa* in an artificial sputum model. *BMC Microbiol* 17:3–13. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0916-z>
28. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S (2021) *Pseudomonas aeruginosa*: an audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *Int J Mol Sci* 22:1–37. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
29. Rosales-Reyes R, Vargas-Roldán SY, Lezana-Fernández JL, Santos-Preciado JI (2021) *Pseudomonas aeruginosa*: genetic adaptation, a strategy for its persistence in cystic fibrosis. *Arch Med Res* 52:357–361. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.12.004>
30. Barnini S, Dodi C, Campa M (2004) Enhanced resolution of random amplified polymorphic DNA genotyping of *Pseudomonas aeruginosa*. *Lett Appl Microbiol* 39:274–277. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01576.x>
31. Picard E, Aviram M, Yahav Y et al (2004) Familial concordance of phenotype and microbial variation among siblings with CF. *Pediatr Pulmonol* 38:292–297. <https://doi.org/10.1002/ppul.20111>
32. Bianconi I, D’Arcangelo S, Esposito A et al (2019) Persistence and microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung: a single-patient longitudinal genomic study. *Front Microbiol* 9:3242–3257. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03242>
33. Blanchard AC, Horton E, Stanojevic S et al (2017) Effectiveness of a stepwise *Pseudomonas aeruginosa* eradication protocol in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 16:395–400. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.01.007>
34. Jansen G, Mahrt N, Tueffers L et al (2016) Association between clinical antibiotic resistance and susceptibility of *Pseudomonas* in the cystic fibrosis lung. *Evol Med Public Heal* 2016:182–194. <https://doi.org/10.1093/emph/eow016>
35. Petrova G, Strateva T, Miteva D et al (2016) Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* before and after initiation of inhaled tobramycin in Bulgaria. *J Infect Dev Ctries* 10:1265–1267. <https://doi.org/10.3855/jidc.7658>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.