



Cinvestav



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Centro de Investigación y Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional**

"Caracterización molecular de cepas oftálmicas de *Pseudomonas aeruginosa* por tipificación multilocus de secuencias (MLST) y presencia de fagos temperados asociados".

Tesis que presenta:

Daniel Cazares López

Para obtener el grado de:

Biólogo

Codirectores de Tesis:

Dr. Gabriel Guarneros Peña

M. en C. Adrian Cazares López

Junio del 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

"Nada en la Biología Tiene Sentido Excepto a la Luz de la Evolución".

Theodosius Dobzhansky

"No sé lo que lo que pareceré a los ojos del mundo, pero a los míos es como si hubiese sido un muchacho que juega en la orilla del mar y se divierte de tanto en tanto encontrando un guijarro más pulido o una concha más hermosa, mientras el inmenso océano de la verdad se extendía, inexplorado frente a mi..."

Isaac Newton

"La mayor motivación, fue el poder entender".

Francis Crick

Este trabajo se realizó bajo la codirección del Dr. Gabriel Guarneros Peña y el M. en C. Adrian Cazares López en el laboratorio 3 del Departamento de Genética y Biología molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología):

Por su apoyo mediante una beca para la realización de este trabajo de tesis de licenciatura que forma parte del proyecto: Genómica estructural de las proteínas de los bacteriófagos (CB-2011/166814).

Índice

Contenido

Resumen	1
1) Introducción	2
2) Antecedentes	6
3) Justificación	9
4) Objetivos	10
4.1 General.....	10
4.2 Particulares.....	10
5) Esquema general de trabajo	11
6) Materiales y Métodos	12
6.1 Obtención y respaldo de las cepas oftálmicas.....	12
6.2 Caracterización de las cepas oftálmicas en los medios específicos: Pseudomonas isolation agar, Pseudomonas agar F y Pseudomonas agar P.....	12
6.3 Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos.....	12
6.4 Extracción y cuantificación del DNA genómico.....	13
6.5 Caracterización molecular por MLST.....	13
6.5.1 Amplificación de los marcadores por PCR.....	13
6.5.2 Purificación y cuantificación de los amplicones.....	14
6.5.3 Secuenciación de los amplicones.....	14
6.5.4 Procesamiento y análisis de las secuencias.....	14
6.5.5 Análisis de los datos de MLST (frecuencias de alelos y pefiles, eBURST, índice de asociación).....	15
6.6 Relación de las cepas oftálmicas a partir de las secuencias de MLST.....	16
6.7 Prueba de producción espontanea de fagos.....	16
6.8 Purificación de las placas líticas y aislamiento de los fagos temperados.....	16
6.9 Titulación de los stocks fágicos.....	17
6.10 Inducción de profagos de las cepas oftálmicas mediante tratamiento con mitomicina C.....	17
7) Resultados	19
7.1 Obtención de las cepas oftálmicas, información clínica y antibiograma de los aislados.....	19

7.2 Caracterización bioquímica de las cepas oftálmicas mediante crecimiento en los medios específicos: Pseudomonas agar F, Pseudomonas agar P y Pseudomonas isolation agar.....	22
7.3 Extracción y cuantificación del DNA genómico.....	23
7.4 Amplificación de los marcadores de MLST.....	24
7.5 Purificación de los amplicones.....	24
7.6 Identificación de los alelos y ST de las cepas oftálmicas.....	26
7.7 Análisis de los datos de MLST.....	27
7.8 Relación de las cepas oftálmicas a partir de las secuencias de MLST.....	29
7.9 Pruebas de producción espontánea de fagos en las cepas indicadoras y oftálmicas.....	30
7.10 Inducción de profagos con mitomicina C en las cepas oftálmicas.....	31
7.11 Morfología de placa lítica y títulos de los stocks de los fagos aislados a partir de las cepas oftálmicas.....	32
8) Discusión.....	35
9) Conclusiones.....	42
10) Perspectivas.....	43
11) Anexos.....	44
12) Referencias.....	54

Resumen

P. aeruginosa es un patógeno oportunista capaz de causar una variedad de afecciones. Queratitis es una de ellas y se caracteriza por ser rápidamente progresiva y potencialmente cegadora, además clones específicos son los reportados como principales responsables. Por otra parte, se asume que la versatilidad de *P. aeruginosa* recae sobre su amplia gama de factores de virulencia con los que cuenta. Interesantemente se ha demostrado que los fagos asociados pueden codificar factores de virulencia diferentes a los de su *core* genómico y que a través de la transducción y la conversión lisogénica contribuyen a su patogenicidad. Adicionalmente los fagos pueden de transferir horizontalmente dichos factores de virulencia entre las cepas. Por estos motivos, el objetivo de este trabajo fue la caracterización molecular de un conjunto de cepas clínicas de queratitis de *P. aeruginosa* con una técnica de tipificación de alto poder discriminatorio como lo es la MLST, además de la búsqueda y el aislamiento de fagos temperados asociados para explorar esta fructífera relación que resulta en cepas potencialmente más patógenas. En dicha caracterización se encontraron 4 alelos y 7 tipos de secuencia (ST) nuevos, además de evidencia nula de una relación clonal entre este grupo de aislados o la asociación de un complejo clonal (CC) particular con esta patología oftálmica. Los resultados de los ensayos de producción espontánea e inducción de profagos realizados en estas cepas, revelaron su asociación con fagos. El hecho de que un alto porcentaje de las cepas (72%) demostrara ser lisógena y que el perfil de infección de los fagos asociados fuera similar o igual, podría sugerir que los fagos albergados son del mismo tipo y que contribuyen a la virulencia de sus cepas hospederas en esta enfermedad. Experimentos adicionales de caracterización de estos fagos podrían dilucidar si estos contribuyen a la virulencia de las cepas oftálmicas.

Caracterización molecular de cepas oftálmicas de *Pseudomonas aeruginosa* por tipificación multilocus de secuencias (MLST) y presencia de fagos temperados asociados.

Principales abreviaturas utilizadas: MLST (tipificación multilocus de secuencias), CC (complejo clonal), ST (tipo de secuencia), LC (lentes de contacto).

1) Introducción

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa de amplia distribución ambiental con una remarcable habilidad de adaptación a una variedad de condiciones ecológicas, incluyendo la escasez de nutrientes [1]. Para el humano esta bacteria representa un patógeno oportunista de importancia nosocomial que, acorde a su versatilidad, es capaz de causar una variedad de afecciones [2]. Entre ellas se encuentran los casos de queratitis que se caracterizan por ser rápidamente progresivos y potencialmente cegadores [3].

Entre los grupos más vulnerables a este tipo de infección se encuentran las personas inmunocomprometidas a nivel local por haber sufrido algún traumatismo ocular y los usuarios de lentes de contacto [4]. En el caso del segundo grupo se ha sugerido que la causa de infección radica en la frecuente contaminación por *P. aeruginosa* de las gotas oculares y soluciones en las que se almacenan dichas lentes. En ambos casos, un daño ocular pequeño y superficial como un rasguño es suficiente para afectar localmente los mecanismos de inmunidad y exponer los receptores (crípticos en una persona saludable) que facilitan la adherencia de la bacteria al epitelio corneal [5-7].

La versatilidad de *P. aeruginosa* recae en su amplia gama de factores de virulencia [2], por lo cual su patogenicidad asociada a una enfermedad específica es probablemente multifactorial [8]. No obstante, factores descritos como particularmente importantes en las infecciones oftálmicas ya han sido reportados. Entre ellos se encuentra el gen *pilA* que codifica la subunidad estructural principal de los pili tipo IV, implicados en la motilidad Twitching y la adhesión a la superficie

ocular [9]. Adicionalmente, las exotoxinas producidas por la expresión de los genes *exoS* y *exoT* del sistema de secreción tipo III, inducen la apoptosis de los neutrófilos encargados de la eliminación de la infección [10], mientras que *exoU* codifica una potente fosfolipasa que causa la inflamación y destrucción del tejido [11]. La secreción de esta última enzima se ha visto asociada a los casos de queratitis más severos (queratitis ulcerativa) [12].

Tales factores de virulencia y otros como el flagelo, la proteasa alcalina, la proteasa IV, la antiestafilolisina (LasR), las elastasas, las hemolisinas, las exotoxinas A y Y, etc. [13-19], no representan en su mayoría la capacidad de causar queratitis. Esto ha sido inferido a partir de la observación de que prácticamente cualquier cepa de *P. aeruginosa* carente de varios de ellos puede causar infección corneal si se presentan las condiciones de predisposición antes mencionadas. No obstante, si algunos de estos factores funcionan de manera combinada pueden mejorar el potencial patogénico de las cepas que los portan, agravando así la enfermedad y llegando incluso a causar la infección corneal en personas sanas y sin antecedentes de daño ocular [20].

En los últimos años, el desarrollo y la aplicación de técnicas de tipificación molecular para el estudio poblacional de *P. aeruginosa* ha permitido reconocer su compleja estructura epidémica. Dicha población se caracteriza por tener eventos de recombinación frecuentes que conducen a la evolución de clones epidémicos exitosos, posiblemente como consecuencia de la incorporación combinada de genes de virulencia y/o patrones diferenciales de expresión génica que los capacitan mejor para el desarrollo de alguna enfermedad específica. Tal es el caso de los aislados de pacientes con queratitis en los que clones con estas propiedades ya han sido reportados [20, 21].

Hasta ahora, los estudios sobre este patógeno han generado una cantidad importante de conocimiento sobre él, sin embargo, aún hay cuestiones que no han sido suficientemente atendidas. Una de ellas son los detalles sobre su epidemiología molecular ya que dichos trabajos no son tan abundantes como en otras bacterias. Esto se debe en parte a que los métodos moleculares con tal

enfoque son relativamente recientes [22, 23, 24]. Entre ellos se encuentra la tipificación de secuencias multilocus (Multilocus sequence typing o MLST) que ha demostrado ser eficiente para la caracterización no ambigua de microorganismos a nivel de especie y cepa. Este método se basa en el uso de información de secuencia proveniente de fragmentos internos de siete genes constitutivos que son particularmente seleccionados para cada especie [25, 26]. En consecuencia, la estrategia de aplicación de dicho método consiste en la amplificación y secuenciación de las regiones intragénicas seleccionadas. Posteriormente, un número identificador de la secuencia resultante es asignado para cada alelo de los siete loci. Los aislados bacterianos son entonces caracterizados por el patrón de sus alelos y la similitud que guardan con aquellos ya reportados, constituyendo así su tipo de secuencia (ST) o perfil alélico.

El método de MLST es ampliamente utilizado para la caracterización de bacterias patógenas por su alta sensibilidad para detectar clones epidémicos entre los aislados y porque permite establecer la relación evolutiva entre ellos [27]. Adicionalmente, la reproducibilidad, portabilidad y fácil exportación y acceso de los datos a través de bases de datos *on line*, son las principales ventajas del MLST sobre otros métodos de tipificación con enfoques similares (electroforesis de enzimas multilocus o MLEE, electroforesis en gel de campos pulsados o PFGE, ensayos inmunológicos, etc.) [27, 28, 29]. En contraste, una clara desventaja de este método es que no toma en cuenta el material genómico accesorio caracterizado por ser altamente dinámico y del cual los profagos y elementos “phage-like” constituyen un componente significativo [30, 31].

De manera interesante, se ha demostrado que dichos profagos y elementos “phage-like” pueden codificar factores de virulencia en *P. aeruginosa* adicionales a los de su *core* genómico y que a través de la transducción y la conversión lisogénica contribuyen a su patogenicidad [32]. Tal es el caso del fago D3 que dirige la conversión del antígeno O5 a O16 en PAO1, el cual permite evadir el sistema inmune del hospedero [33, 34]. Otros ejemplos son la infección del fago ϕ CTX en PAS10 que resulta en su conversión a una cepa toxigénica [35, 36] y el

de los profagos LES que se ha sugerido contribuyen a la competitividad *in vivo* de sus bacterias hospederas [37].

Adicionalmente, los profagos inducibles representan una parte sustancial del DNA móvil de sus hospederos y pueden transferir horizontalmente material genético entre las cepas de la población, incluyendo los factores antes mencionados, promoviendo así variantes cada vez más virulentas [38, 39]. Curiosamente, la cepa oftálmica 39016 de *P. aeruginosa* que alberga varios profagos en su genoma es considerada una de las cepas más virulentas, no obstante a la fecha no se ha demostrado que dichos profagos participen en la virulencia de esta cepa [40].

A pesar del papel clave que los bacteriófagos han jugado en la virulencia y patogenicidad de varias especies bacterianas, hasta ahora aún son escasos los trabajos que evidencien la asociación entre cepas clínicas de *P. aeruginosa* y la presencia de fagos temperados. Esto limita la realización de estudios enfocados a elucidar la posible participación de este tipo de fagos en la evolución patogénica de *P. aeruginosa*. Como consecuencia, el objetivo de este trabajo fue la caracterización molecular de un conjunto de cepas oftálmicas de *P. aeruginosa* por MLST, además de la búsqueda y el aislamiento de fagos temperados asociados para explorar dicha relación.

2) Antecedentes

En el 2001 Lomholt y colaboradores caracterizaron mediante electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) una colección de 145 aislados de *P. aeruginosa* asociados principalmente a pacientes con queratitis [20]. En dicha colección también fueron incluidos aislados de orina, infecciones de oído, sangre, pulmones, quemaduras, heces, ambientales, endoftalmitis y aislados provenientes de estuches de almacenamiento de lentes de contacto. En este trabajo los autores además identificaron la presencia y características de algunos factores de virulencia utilizando RFLPs, Southern blots y zimografía. A partir de estos análisis ellos sugieren una estructura poblacional epidémica para *P. aeruginosa*, caracterizada por recombinación frecuente en la que un clon particularmente exitoso puede incrementarse, predominar por un tiempo y entonces desaparecer como resultado de la recombinación. De manera interesante, dichos clones fueron encontrados entre los aislados de pacientes con queratitis y se caracterizaron por su alta actividad de elastasa y proteasa alcalina además de la presencia del gen *exoU*. No obstante, los autores aclararon que estos factores de virulencia no eran exclusivos de cepas causantes de queratitis [20].

Posteriormente, Pirnay y colaboradores en 2002, usaron un enfoque polifásico en el cual combinaron los datos de tipificación provenientes de la identificación del serotipo y tipo de pioverdina, los patrones de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y la secuencia de los genes *oprI*, *oprL* y *oprD* que codifican proteínas de membrana externa. Dichas estrategias de tipificación fueron aplicadas para estudiar una colección de 73 aislados clínicos y ambientales de *P. aeruginosa* recolectados en todo el mundo [21]. Los autores observaron un mosaicismo claro entre los resultados de asociación que es característico de una población panmíctica. A pesar de la falta de congruencia entre los resultados obtenidos de los diferentes métodos de tipificación, se lograron identificar algunos complejos clonales caracterizados por tener un conjunto de datos casi idéntico. Basados en estas observaciones, Pirnay y colaboradores sugirieron una estructura poblacional epidémica para *P. aeruginosa*, que es superficialmente clonal pero con

recombinación frecuente, en la que ocasionalmente surgen clones epidémicos altamente exitosos y que es comparable con la estructura poblacional de *Neisseria meningitidis* [21].

En concordancia con esta conclusión, Curran y sus colegas confirmaron en el 2004 que *P. aeruginosa* exhibe una estructura poblacional epidémica no clonal, puntuada por genotipos cercanamente relacionados o complejos clonales. Dicho estudio se basó en la tipificación de 143 aislados clínicos y ambientales mediante MLST [26].

En el caso particular de infecciones oftálmicas, Winstanley y colaboradores en 2005, usaron serotipificación y amplificación al azar de DNA polimórfico (RAPD) para caracterizar una colección de 63 aislados de *P. aeruginosa* asociados con queratitis ulcerativa y recolectados de varios centros hospitalarios de Inglaterra. Los resultados de dicha caracterización no mostraron evidencia de un clon común entre los aislados, no obstante la mayoría de los aislados poseían el gen *exoU* (59%) y exhibieron actividad twitching (98%) [41].

Unos años más tarde Stewart y colaboradores (2011) identificaron, mediante un sistema portable de genotipificación por microarreglos de DNA (clondiag AT), una subpoblación de *P. aeruginosa* con características distintivas y mejor adaptada para causar la infección corneal [40]. Dicho estudio reveló que esta subpoblación es clonal y porta varias islas genómicas. La secuenciación de su aislado 39016, que fue el más representativo, también reveló la presencia de una cantidad significativa de genoma accesorio (comparado con PAO1) incluyendo varios profagos putativos. Algunos de estos profagos compartieron similitud extensa con fagos Mu-like que son considerados de transducción generalizada [40].

Por su parte, Yamaguchi y colaboradores en 2014, caracterizaron 34 aislados de *P. aeruginosa* provenientes de infecciones oculares mediante MLST y análisis del sistema de secreción tipo III, identificando una prevalencia del alelo 5 de *aroE* entre los aislados de queratitis. No obstante, en su análisis con el programa eBURST los genotipos de los aislados oculares no se agruparon, con excepción

de algunos aislados de queratitis relacionados a lentes de contacto (queratitis-LC) [42]. En dicho estudio los autores también reportaron que el genotipo *exoS* (*exoU*-negativo) era predominante entre los aislados de infecciones oculares, incluyendo los de queratitis. Sin embargo, la proporción de *exoU* era mayor entre los aislados de queratitis-LC que en los demás tipos de aislados oculares. En consecuencia, se concluyó que el genotipo *exoU* podría estar asociado con aislados de queratitis-LC. Además, este último tipo de aislados fue agrupado en un árbol filogenético utilizando los datos obtenidos del MLST [42].

3) Justificación

P. aeruginosa es un patógeno oportunista capaz de causar una variedad de afecciones. La queratitis es una de ellas y se caracteriza por ser severa, además de ser clones específicos los reportados como principales responsables. Por tal motivo, el uso de una técnica de tipificación molecular con un alto poder discriminatorio, como el MLST, podría proporcionar datos valiosos en la caracterización de aislados exclusivamente oftálmicos. Dichos datos ayudarían a aclarar la cuestión sobre la clonalidad de este tipo de aislados mejorando así el conocimiento actual sobre la relación evolutiva entre las cepas asociadas a queratitis. Por otra parte, considerando el papel destacado de los fagos como motores de la evolución intraespecífica de *P. aeruginosa* hacia cepas potencialmente más patógenas, es de vital importancia generar mayor evidencia sobre esta relación biológica que posteriormente pueda ser estudiada a detalle para discernir los mecanismos mediante los cuales los fagos pueden impactar en el éxito evolutivo de esta bacteria.

4) Objetivos

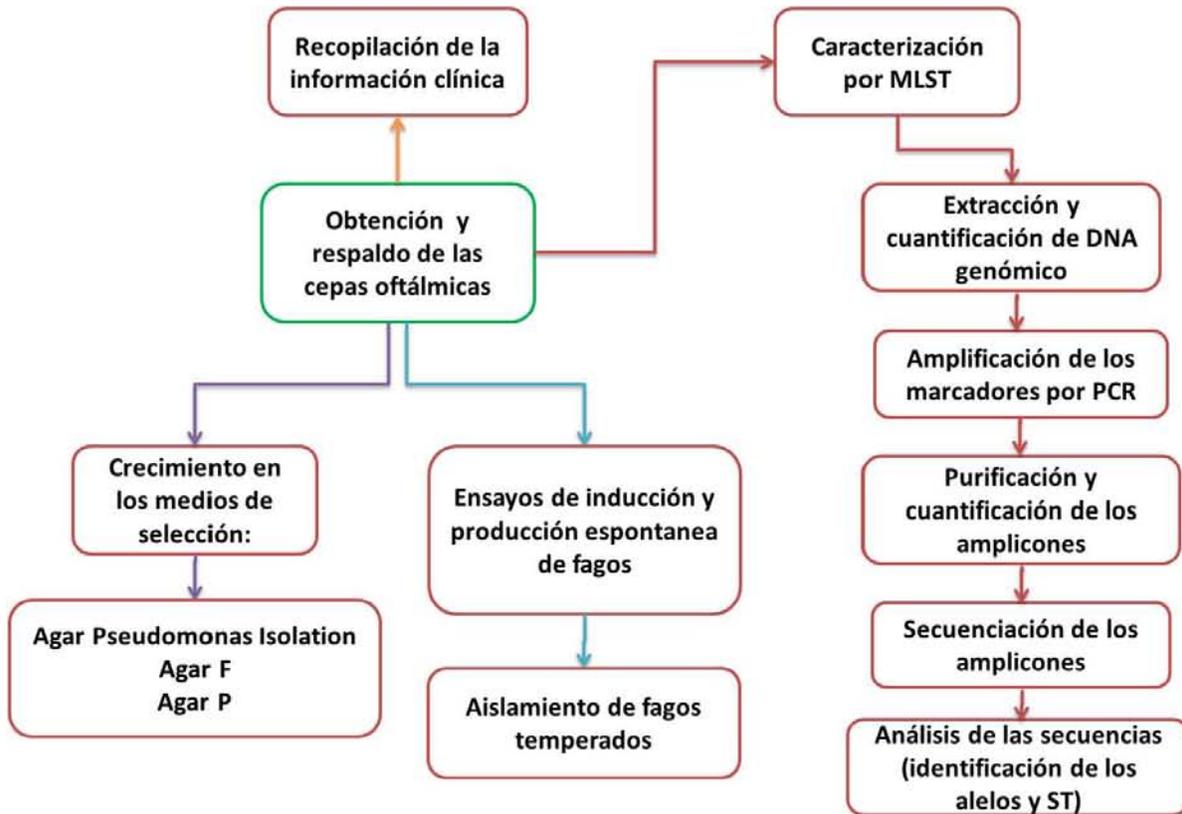
4.1 General

- Caracterizar un grupo de cepas oftálmicas de *P. aeruginosa* mediante MLST y la presencia de bacteriófagos temperados asociados.

4.2 Particulares

- Obtener aislados oftálmicos de *P. aeruginosa* asociados a queratitis.
- Caracterizar los aislados oftálmicos de *P. aeruginosa* mediante el uso de medios específicos: Pseudomonas isolation agar, Pseudomonas agar F y Pseudomonas agar P.
- Recopilar información clínica relevante correspondiente a cada uno de los aislados de *P. aeruginosa*.
- Amplificar y obtener las secuencias de los genes correspondientes al esquema de MLST de *P. aeruginosa* para los aislados oftálmicos.
- Analizar las secuencias provenientes del MLST para definir la identidad de los alelos y STs de los aislados oftálmicos.
- Realizar pruebas de producción espontánea de fagos e inducción de profagos con mitomicina C en las cepas oftálmicas de *P. aeruginosa* para su posterior aislamiento.

5) Esquema general de trabajo



6) Materiales y Métodos

6.1 Obtención y respaldo de las cepas oftálmicas.

Las cepas oftálmicas de *P. aeruginosa* fueron obtenidas del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana. A partir de sus respectivos respaldos en medio BHI, las cepas fueron estriadas en placas con medio LB e incubadas a 37°C durante toda la noche (Figura 1). Posteriormente, las colonias aisladas resultantes fueron inoculadas en medio LB e incubadas a 37°C durante 12 h en agitación para subsecuentemente realizar respaldos de cada cepa en glicerol al 30%. Todas las cepas fueron respaldadas por triplicado y almacenadas en un ultracongelador a -70°C.

6.2 Caracterización de las cepas oftálmicas en los medios específicos: Pseudomonas isolation agar, Pseudomonas agar F y Pseudomonas agar P.

A partir de los *stocks* en glicerol se hicieron resiembras de las cepas sobre placas con los medios específicos Pseudomonas isolation agar, Pseudomonas agar F y Pseudomonas agar P para descartar bacterias distintas del género *Pseudomonas*, resaltar la producción de fluoresceína y piocianina u otros sideróforos, respectivamente. En dichos ensayos fueron incluidas las cepas DH5 α de *E. coli* y 39016 de *P. aeruginosa* como controles negativo y positivo, respectivamente. La producción de fluoresceína fue evidenciada exponiendo a luz UV los cultivos de las cepas oftálmicas en medio Pseudomonas agar F.

6.3 Pruebas de susceptibilidad a los antibióticos.

Las pruebas de sensibilidad a antibióticos se realizaron en el Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana con el equipo VITEK 2 (sistema 05.04), usando la tarjeta AST-GN25 que evalúa beta-lactámicos, aminoglicósidos, quinolonas, tetraciclinas, furanos y trimetoprima con sulfametoxazol. Los parámetros del AES (sistema experto avanzado) para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) e interpretación de la resistencia natural están sustentados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, <http://clsi.org/>).

6.4 Extracción y cuantificación del DNA genómico.

La extracción del DNA genómico de las cepas oftálmicas y 2 cepas control de *P. aeruginosa* que ya han sido secuenciadas (39016 y PAO1) se realizó siguiendo el método descrito por Chen W. y Kuo T. [43]. Para verificar las extracciones se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% que fue teñido con bromuro de etidio para su visualización. Posteriormente, las extracciones fueron cuantificadas en un espectrofotómetro (Nanodrop®) por absorbancia a 260 nm. Los valores obtenidos fueron utilizados para hacer diluciones del DNA genómico y obtener *stocks* con concentraciones de 20 ng/μl para todas las cepas.

6.5 Caracterización molecular por MLST.

6.5.1 Amplificación de los marcadores por PCR.

La síntesis de los *primers* (para la amplificación y secuenciación) se hizo conforme al diseño del esquema de MLST desarrollado para *P. aeruginosa* y disponible en la base de datos de PubMLST (<http://pubmlst.org/paeruginosa/info/primers.shtml>).

Los 7 genes house-keeping o marcadores del esquema corresponden a:

- 1) *acsA* (Acetil coenzima A sintetasa)
- 2) *aroE* (Shikimato deshidrogenasa)
- 3) *guaA* (GMP sintetasa)
- 4) *mutL* (proteína de reparación del DNA)
- 5) *nuoD* (NADH deshidrogenasa I cadena C, D)
- 6) *ppsA* (fosfoenol piruvato sintetasa)
- 7) *trpE* (Componente I anthralite sintetasa)

La amplificación de los 7 marcadores se realizó de manera individual en cada cepa oftálmica y control (39016 y PAO1). Los 50 μl de volumen final en cada mezcla de reacción incluyeron: 2 μl de DNA genómico (~20 ng/μl), 2 μl de *primer forward* (10 pmol/μl), 2 μl de *primer reverse* (10 pmol/μl), 5 μl de buffer PCR 10x, 10 μl Solución-Q 5x, 1 μl de mezcla de dNTPs (10 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0.25 μl de Taq polimerasa (5 unidades/μl) y 27.75 μl de agua inyectable. El

buffer de PCR, la Solución-Q, la mezcla de dNTPs y la Taq polimerasa fueron tomados del PCR CORE Kit de Qiagen.

Las condiciones de amplificación utilizadas fueron las siguientes: Desnaturalización inicial a 96°C por un minuto, 36 ciclos de: desnaturalización a 96°C por un minuto, hibridación de los primers a 55°C por un minuto, extensión a 72°C por un minuto y un paso de extensión final de 72°C por 10 minutos.

La amplificación de cada uno de los siete marcadores en todas las cepas fue verificada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio para su visualización.

6.5.2 Purificación y cuantificación de los amplicones.

La purificación de los productos de amplificación por PCR se realizó conforme a los protocolos de precipitación de DNA con isopropanol y etanol ya reportados [44]. Posteriormente se hicieron geles de agarosa al 1% para verificar que dichos productos no se hubieran perdido en el proceso. La cuantificación de la concentración y pureza de los amplicones se realizó en un espectrofotómetro de microplacas (Epoch de BioTek®).

6.5.3 Secuenciación de los amplicones.

Los productos de amplificación previamente purificados y cuantificados fueron divididos en dos alícuotas al igual que los *primers* de secuenciación para cada marcador. Las alícuotas de los amplicones y sus *primers* de secuenciación correspondientes fueron enviadas a la empresa MACROGEN (<http://www.macrogen.com/eng/>) en donde se realizaron las reacciones de secuenciación tipo Sanger de terminación de cadena.

6.5.4 Procesamiento y análisis de las secuencias.

Los archivos .abi adquiridos del servicio de secuenciación se utilizaron para exportar las secuencias en formato FASTA (.fasta) con ayuda del programa TraceEdit (<http://www.ridom.de/traceedit/>) y aquellas provenientes de los *primers reverse* (anti-sentido) fueron procesadas para obtener su versión reverso-

complementaria. Las secuencias completas resultantes fueron alineadas con aquella del alelo 1 de su marcador correspondiente (obtenida de la base de datos PubMLST de *P. aeruginosa*) y recortadas posteriormente para eliminar los excedentes (secuencias no informativas) utilizando el programa SeaView (<http://doua.prabi.fr/software/seaview>). Las secuencias obtenidas fueron entonces comparadas con las reportadas en la base de datos de MLST (http://pubmlst.org/perl/bigsgdb/bigsgdb.pl?db=pubmlst_paeruginosa_seqdef&page=sequenceQuery) para identificar los alelos de los siete marcadores de cada cepa. Las secuencias que no coincidieron con las de alelos registrados fueron reconocidas como alelos nuevos posterior a la verificación minuciosa de sus electroferogramas. Los perfiles alélicos de cada cepa (conjunto de números designados por cada uno de los siete marcadores) fueron utilizados para determinar los STs correspondientes (http://pubmlst.org/perl/bigsgdb/bigsgdb.pl?db=pubmlst_paeruginosa_seqdef&page=profiles&scheme_id=1).

6.5.5 Análisis de los datos de MLST (frecuencias de alelos y perfiles, eBURST, índice de asociación).

Después de la asignación de los STs a las cepas oftálmicas de estudio, se hizo una búsqueda de aislados con STs idénticos depositados en la base de datos para explorar información de importancia epidemiológica: origen geográfico, hábitat (ambiental o clínico) y cantidad de aislados reportados. Los datos obtenidos del MLST fueron también analizados con ayuda del programa START2 (<http://pubmlst.org/software/analysis/start2/>) para determinar las frecuencias de los alelos y STs, el contenido de GC y un estimado de sitios polimórficos. La formación de complejos clonales (CCs) entre los aislados oftálmicos y el resto de los aislados registrados en base de datos se exploró por medio del algoritmo de agrupamiento y expansión clonal eBURST (<http://eburst.mlst.net/>). De igual manera, el índice de asociación estandarizado (I_A^S) se calculó por medio del programa START2.

6.6 Relación de las cepas oftálmicas a partir de las secuencias de MLST.

La construcción del dendrograma con las secuencias concatenadas de los siete marcadores para cada cepa se realizó con el criterio de máxima verosimilitud (ML). La aplicación de dicho criterio se hizo mediante el uso del servidor RAxML versión 7.7.1 (<http://embnet.vital-it.ch/raxml-bb/index.php>) utilizando una prueba de bootstrap (1000 réplicas) como procedimiento para evaluar la confianza de las relaciones filogenéticas inferidas. La misma estrategia fue aplicada para construir los dendrogramas de los marcadores individuales.

6.7 Prueba de producción espontánea de fagos.

Las 18 cepas oftálmicas y dos cepas control (39016, lisógena y PAO1, no lisógena) fueron inoculadas en medio LB a partir de sus stocks en glicerol y posteriormente incubadas a 37°C por periodos de 24 y 48 h en ensayos independientes. Posteriormente, los cultivos de ambos periodos fueron centrifugados a 10,000 g por 10 min y sus sobrenadantes fueron recuperados y filtrados con membranas Millipore de 0.45 µm. Para los ensayos de infección, se hicieron diluciones logarítmicas de los sobrenadantes obtenidos (1×10^{-2} , 1×10^{-4} , 1×10^{-6} y 1×10^{-8}) y 5 µl de dichas diluciones fueron goteados sobre tapices de un grupo de cepas de *P. aeruginosa* (integrado por cepas secuenciadas: PA01, PA14, LESB58, 39016 y cepas de la colección del laboratorio: Fc14, Fc76, Ps9, Ps26, Ps33, Ps53) utilizadas como indicadoras de la presencia de fagos. Posterior al goteo, los tapices fueron incubados a 37°C por 24 h. La presencia de fagos en los sobrenadantes fue evidenciada por la formación de *spots* de lisis y la presencia de placas líticas en las zonas de goteo. El mismo procedimiento fue realizado con las cepas indicadoras (a excepción de LESB58; previamente reportada como lisógena) pero incluyendo un periodo adicional de 72 h para la recuperación del sobrenadante.

6.8 Purificación de las placas líticas y aislamiento de los fagos temperados.

Las placas líticas formadas sobre los tapices de las cepas indicadoras fueron picadas con palillos estériles y estriadas sobre el diámetro de placas con medio Tφ. Subsecuentemente, tapices de las cepas indicadoras correspondientes fueron colocados en dichas placas y se incubaron a 37°C por 24 h. Las placas formadas

se seleccionaron nuevamente con palillos y, de ser necesario, fueron separadas por diferencias en su morfología. Este paso de purificación fue repetido tres veces de manera secuencial para cada una de las distintas placas identificadas en los sobrenadantes de las cepas oftálmicas. A partir del último pase de purificación se seleccionaron ~20 placas líticas aisladas y con la ayuda una pipeta Pasteur fueron transferidas a un microtubo conteniendo 1 ml de medio SM. Dicho tubo se mantuvo en agitación por ~3 h a 4°C para la recuperación del fago y fue centrifugado posteriormente a 14,000 g por 10 min para precipitar el debris. Finalmente, el sobrenadante fue transferido a un nuevo microtubo y el stock formado fue almacenado a 4°C en oscuridad.

6.9 Titulación de los stocks fágicos.

Los stocks fágicos fueron diluidos (1×10^{-2} , 1×10^{-4} , 1×10^{-6} y 1×10^{-8}) y 5 μ l de cada dilución se gotearon consecutivamente sobre tapices de las cepas indicadoras a partir de las cuales fueron obtenidos dichos stocks. Los títulos se calcularon utilizando la siguiente fórmula [45]:

$$\left(\frac{\text{No. de placas líticas}}{\text{volumen goteado en ml}} \right) \times (\text{inverso de la última dilución con placas}) = \text{ufp}/\text{m}^{-1}$$

Donde: ufp = unidades formadoras de placas

6.10 Inducción de profagos de las cepas oftálmicas mediante tratamiento con mitomicina C.

Cultivos de siete cepas oftálmicas (PA-Oph-1,-4,-5,-15,-16,-17,-19) y de las dos cepas control (PAO1 y 39016) fueron incubados a 37°C y 220 rpm hasta el comienzo de la fase de crecimiento logarítmica (DO 600nm = 0.5). En este punto, se añadió a cada cultivo el agente de daño al DNA, mitomicina C (MMC), en dos concentraciones (3.0 μ g/ml y 0.5 μ g/ml) de manera independiente. Posterior a la adición de la MMC, los cultivos se mantuvieron bajo las mismas condiciones de incubación y se tomaron muestras cada 30 min que fueron registradas con el espectrofotómetro (DO 600nm) hasta que fuera evidente el decaimiento de los cultivos a través de la absorbancia. Posteriormente, los lisados fueron

centrifugados a 10,000 *g* por 10 min y los sobrenadantes se filtraron con membranas Millipore de 0.45 μm y se almacenaron a 4 °C en oscuridad. Dichos sobrenadantes fueron evaluados para presencia de fagos mediante ensayos de infección sobre el set de cepas indicadoras. Se realizaron diluciones de cada sobrenadante (1×10^{-2} , 1×10^{-4} , 1×10^{-6} y 1×10^{-8}) y 5 μl de cada dilución fueron goteados sobre los tapices de las cepas indicadoras que posteriormente fueron incubados a 37°C por 24 h.

7) Resultados

7.1 Obtención de las cepas oftálmicas, información clínica y antibiograma de los aislados.

Dieciocho cepas clínicas de *P. aeruginosa* asociadas a casos de queratitis fueron obtenidas del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana (Figura 1).

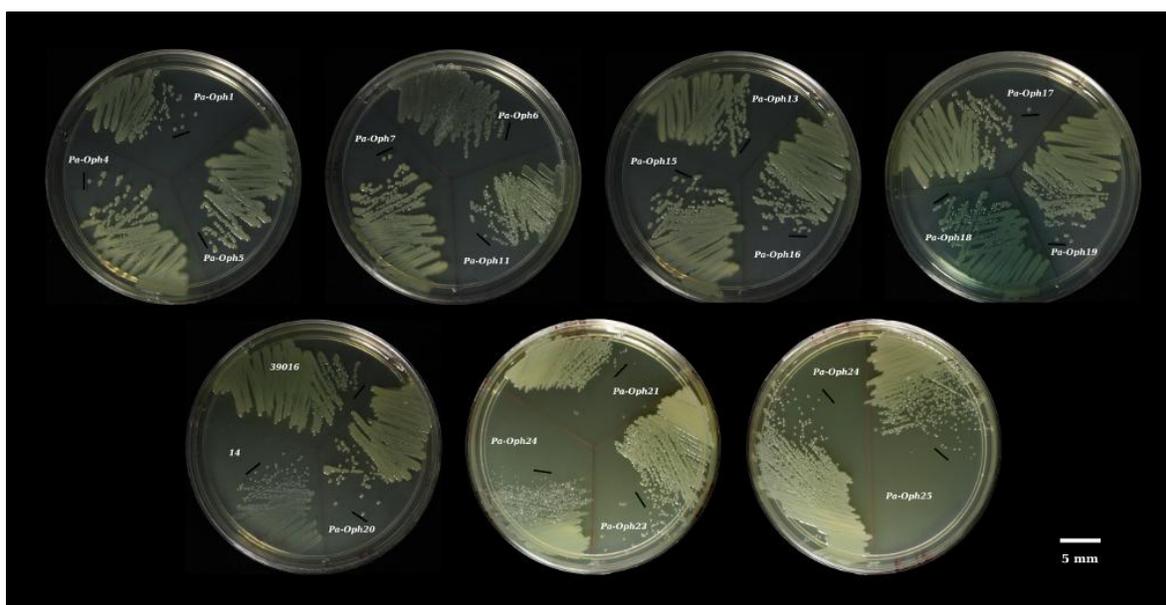


Figura 1. Cultivo de las Cepas oftálmicas en medio LB. Las líneas en color negro equivalen a ~5 mm.

Basados en la información clínica del total de las cepas, el 44% afecto a usuarios de lentes de contacto y el 55% causó úlceras corneales en los pacientes (Tabla 1). Todas las cepas oftálmicas de *P. aeruginosa*, incluyendo la cepa control 39016, mostraron prácticamente el mismo perfil de susceptibilidad a los antibióticos evaluados (Tabla 2).

Cepa	Fecha de aislamiento	Origen de la muestra	Género / edad del paciente	Padecimiento inmunosupresor o cirugía previa	Usuario de L.C.	Coexistencia con otra bacteria
PA-Oph1	01-02-13	L.C.	H/62 A	SD	✓	<i>Serratia marcescens</i>
PA-Oph4	04-08-12	Corneal	M/57 A	SD	✗	No
PA-Oph5	27-03-13	L.C. y Corneal	M/54 A	Queratotomía radiada	✓	<i>Burkholderia sp.</i>
PA-Oph6	21-02-13	L.C. y Corneal	M/17 A	SD	✓	<i>Klebsiella oxytoca</i>
PA-Oph7	29-04-03	U.C.	H/32 A	SD	✓	No
PA-Oph11	SD	Post mortem	H/34 A	Insuficiencia Renal Crónica	✗	No
PA-Oph13	13-05-13	Conjuntiva	M/58 A	SD	✗	No
PA-Oph15	10-06-13	U.C.	H/21 A	SD	✓	No
PA-Oph16	22-07-13	U.C.	M/20 A	SD	✓	No
PA-Oph17	31-07-13	L.C. y U.C.	H	SD	✓	No
PA-Oph18	16-08-13	U.C.	M/16 A	SD	✓	No
PA-Oph19	23-08-13	U.C.	M/71 A	SD	✗	No
PA-Oph20	23-08-13	Gotas oftálmicas	M/71 A	SD	✗	No
PA-Oph21	11-09-13	U.C.	H/60 A	SD	✗	No
PA-Oph22	02-10-13	Humor vítreo	M/81 A	SD	✗	No
PA-Oph23	04-10-13	U.C.	M/56 A	SD	✗	No
PA-Oph24	07-10-13	U.C.	H/74 A	SD	✗	No
PA-Oph25	14-10-13	U.C.	H/20 A	SD	✗	No

Tabla 1. Información clínica asociada a las cepas oftálmicas caracterizadas en este trabajo. (L.C.-Lentes de contacto, U.C.-Ulcera corneal, S.D.-Sin datos)

Cepas oftálmicas	Antibiótico (CMI µg/ml)														
	Ampicilina / Sulbactam	Cefazolina	Ceftriaxona	Cefepima	Imipenem	Meropenem	Amikacina	Gentamicina	Tobramicina	Ciprofloxacina	Moxifloxacina	Tigeciclina	Nitrofurantoina	Trimetoprima / Sulfametoxazol	Amoxicilina
39016	NE	NE	R (32)	S (2)	S (<=1)	S (1)	S (8)	S (4)	S (<=1)	S (<=0.25)	S (2)	R (>=8)	NE	R (>=320)	R (>=32)
Pa-Oph1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Pa-Oph4	R (>=32)	R (>=64)	R (16)	S (<=1)	S (<=1)	S (<=0.25)	S (<=2)	S (<=1)	S (<=1)	S (<=0.25)	S (1)	R (>=8)	R (>=512)	R (80)	NE
Pa-Oph5	R (>=32)	R (>=64)	R (16)	S (<=1)	S (2)	S (<=0.25)	S (<=2)	S (<=1)	S (<=1)	S (<=0.25)	S (0.5)	R (>=8)	R (>=512)	R (80)	NE
Pa-Oph6	R (>=32)	R (>=64)	R (>=64)	S (2)	S (2)	S (<=0.25)	S (<=2)	S (<=1)	S (<=1)	S (<=0.25)	S (2)	R (>=8)	R (>=512)	R (80)	NE
Pa-Oph7	R (>=32)	R (>=64)	R (>=64)	S (2)	S (2)	S (0.5)	S (<=2)	S (<=1)	S (<=1)	S (<=0.25)	S (1)	R (>=8)	R (>=512)	R (160)	NE
Pa-Oph11	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Pa-Oph13	R (>=32)	R (>=64)	R (>=64)	S (2)	S (2)	S (<=0.25)	S (<=2)	S (<=1)	S (<=1)	S (<=0.25)	S (1)	R (>=8)	R (>=512)	R (160)	NE
Pa-Oph15	R (>=32)	R (>=64)	R (16)	S (<=1)	S (<=1)	S (<=0.25)	S (<=2)	S (<=1)	S (<=1)	S (<=0.25)	S (0.5)	R (4)	R (>=512)	R (160)	NE
Pa-Oph16	R (>=32)	R (>=64)	R (>=64)	S (2)	S (4)	S (0.5)	S (4)	S (2)	S (<=1)	S (<=0.25)	S (2)	R (>=8)	R (>=512)	R (320)	NE
Pa-Oph17	R (>=32)	R (>=64)	R (16)	S (2)	S (<=1)	S (<=0.25)	S (<=2)	S (<=1)	S (<=1)	S (<=0.25)	S (<=0.25)	R (>=8)	R (>=512)	R (160)	NE
Pa-Oph18	R (>=32)	R (>=64)	R (32)	S (2)	S (4)	S (<=0.25)	S (<=2)	S (2)	S (<=1)	S (<=0.25)	S (2)	R (>=8)	R (>=512)	R (320)	NE
Pa-Oph19	R (>=32)	R (>=64)	R (32)	S (2)	S (4)	S (<=0.25)	S (<=2)	S (2)	S (<=1)	S (<=0.25)	S (2)	R (>=8)	R (>=512)	R (320)	NE
Pa-Oph20	R (>=32)	R (>=64)	R (32)	S (2)	S (4)	S (<=0.25)	S (<=2)	S (2)	S (<=1)	S (<=0.25)	S (2)	R (>=8)	R (>=512)	R (320)	NE
Pa-Oph21	R (>=32)	R (>=64)	R (16)	S (2)	S (<=1)	S (<=0.25)	S (<=2)	S (<=1)	S (<=1)	S (<=0.25)	S (1)	R (>=8)	R (>=512)	R (80)	NE
Pa-Oph22	R (<=32)	R (>=64)	R (>=64)	S (<=8)	S (<=1)	S (<=1)	S (<=2)	S (<=1)	S (<=1)	S (0.5)	R (>=8)	R (>=8)	R (>=512)	R (>=320)	NE
Pa-Oph23	R (>=32)	R (>=64)	R (>=64)	S (2)	S (2)	S (0.5)	S (<=2)	S (<=1)	S (<=1)	S (<=0.25)	S (1)	R (>=8)	R (>=512)	R (80)	NE
Pa-Oph24	R (>=32)	R (>=64)	R (16)	S (2)	S (2)	S (<=0.25)	S (<=2)	S (<=1)	S (<=1)	S (<=0.25)	S (0.5)	R (>=8)	R (>=512)	R (80)	NE
Pa-Oph25	R (>=32)	R (>=64)	R (16)	S (2)	S (2)	S (<=0.25)	S (<=2)	S (<=1)	S (<=1)	S (<=0.25)	S (2)	R (>=8)	R (>=512)	R (80)	NE

Tabla 2. Antibiogramas de las cepas oftálmicas. Los parámetros del AES (sistema experto avanzado) usados para la interpretación de los fenotipos: Sensible (S) o Resistente (R) a los antibióticos y los valores de CMI, están sustentados por el CLSI. (<= menor o igual que, >= mayor o igual que, NE-no evaluado,).

7.2 Caracterización bioquímica de las cepas oftálmicas mediante crecimiento en los medios específicos: Pseudomonas agar F, Pseudomonas agar P y Pseudomonas isolation agar.

Para constatar algunas de las características particulares del género *Pseudomonas* y la especie *aeruginosa*, los aislados oftálmicos se cultivaron en medios específicos. La mayoría de las cepas oftálmicas, incluyendo a 39016 (control positivo: C+), produjeron grandes cantidades de fluoresceína en el medio Pseudomonas agar F, con excepción de la cepa 14 y *Escherichia coli* DH5 α (control negativo: C-) que no produjeron dicho pigmento (Figura 2). En contraste, la mayoría de los cultivos mostraron una baja o nula producción de pircianina en el medio Pseudomonas agar P, siendo las cepas PA-Oph6, PA-Oph18, PA-Oph20 y 39016 las que produjeron una mayor cantidad del fluoróforo (Figura 3). En el caso del medio Pseudomonas isolation agar, únicamente la cepa 14 y DH5 α no crecieron (Figura 4). Debido a que este medio es selectivo para el crecimiento de *Pseudomonas*, la cepa 14 que probablemente no era *P. aeruginosa* fue descartada para el estudio.

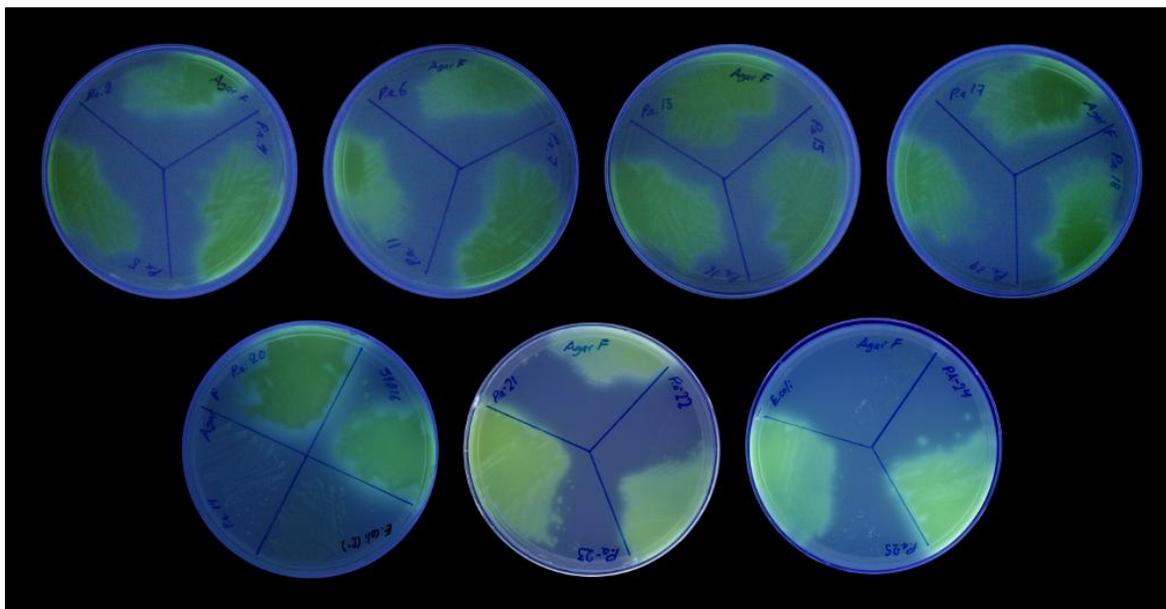


Figura 2. Cultivo de las cepas oftálmicas en medio Pseudomonas agar F expuestos a luz UV.

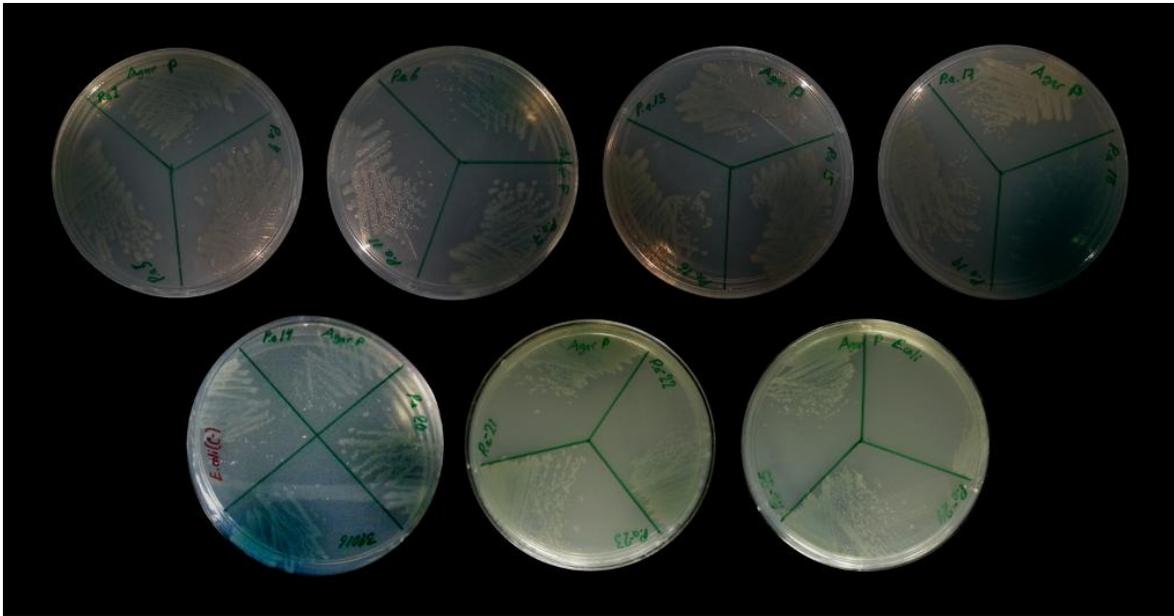


Figura 3. Cultivo de las cepas oftálmicas en medio Pseudomonas agar P.

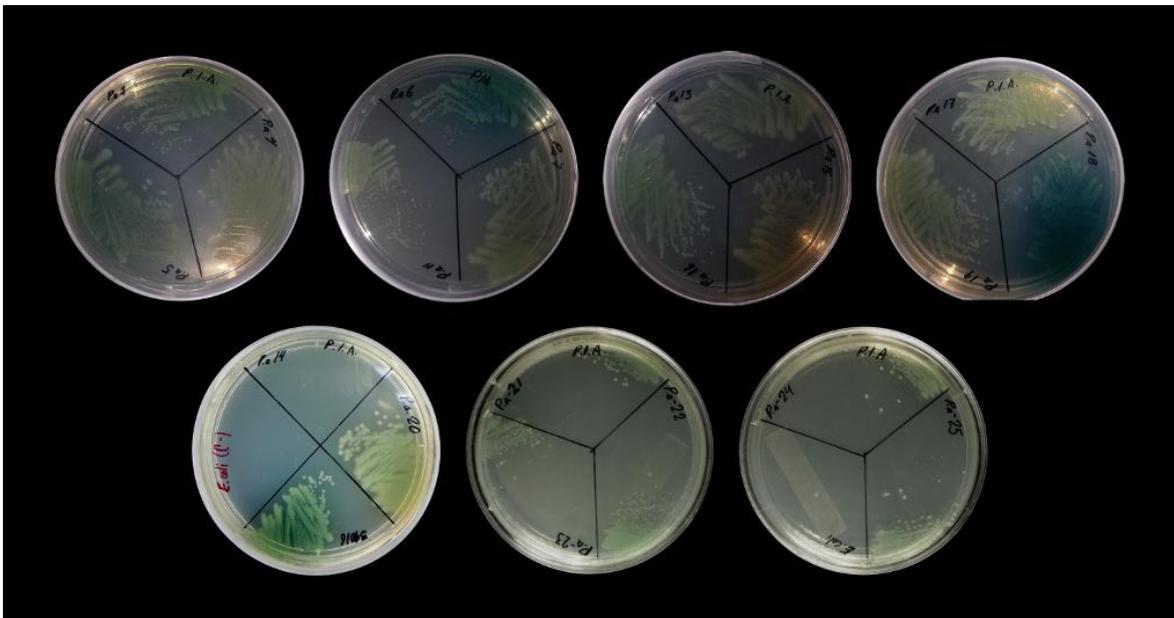


Figura 4. Cultivo de las Cepas oftálmicas en medio Pseudomonas isolation agar.

7.3 Extracción y cuantificación del DNA genómico.

Cada una de las cepas oftálmicas fue sometida a extracción de DNA genómico que es requerido para la amplificación de los marcadores de MLST por PCR. El DNA genómico extraído (Figura 5) osciló en un rango de 1.9 a 2 en la relación de pureza 260/280, considerándose óptima, mientras que la concentración varió de 210 a 687 ng/μl (Anexos. Tabla S1).

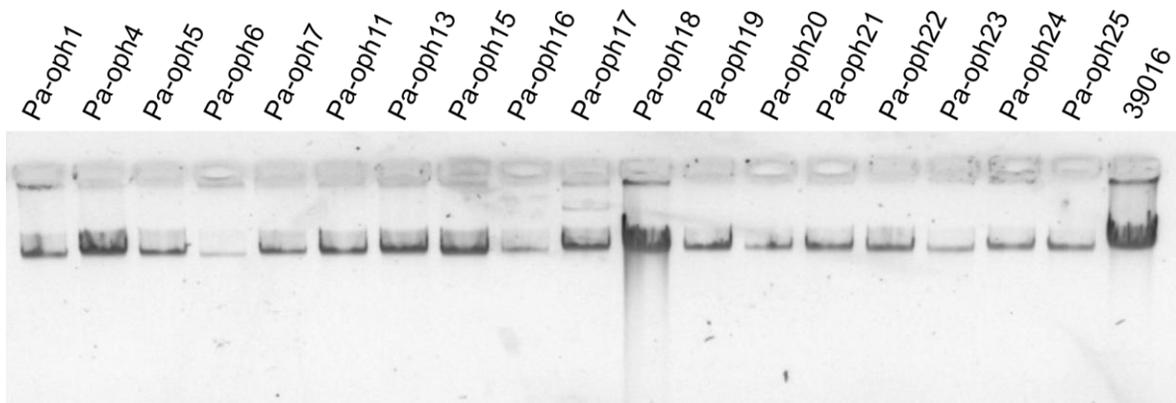


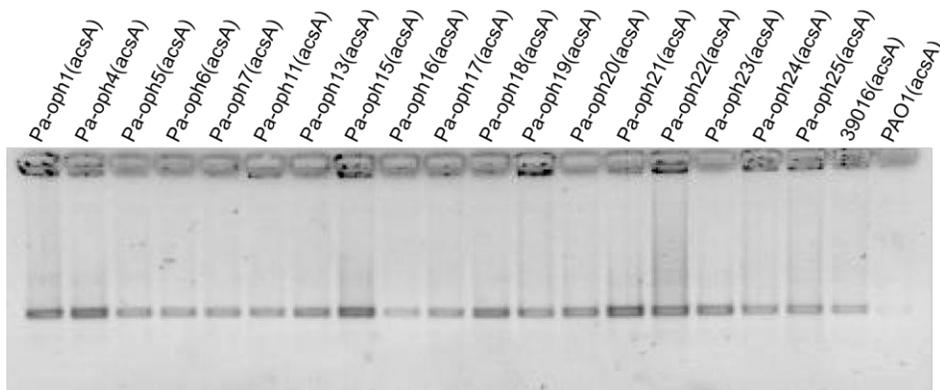
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de la extracción del DNA genómico de las 18 cepas oftálmicas y la cepa control (39016).

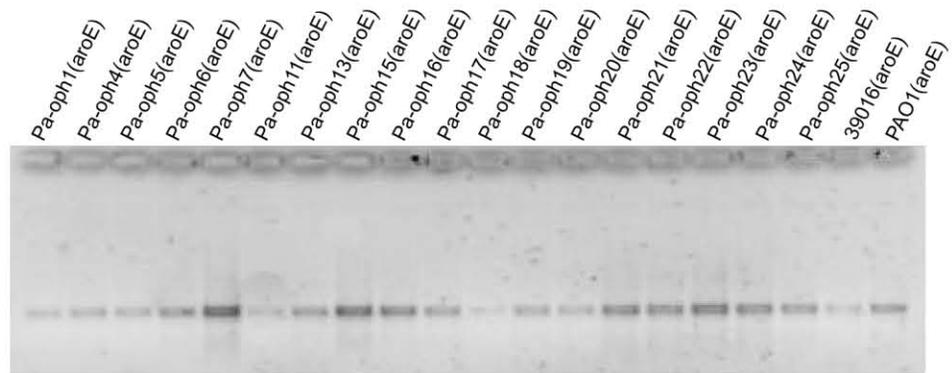
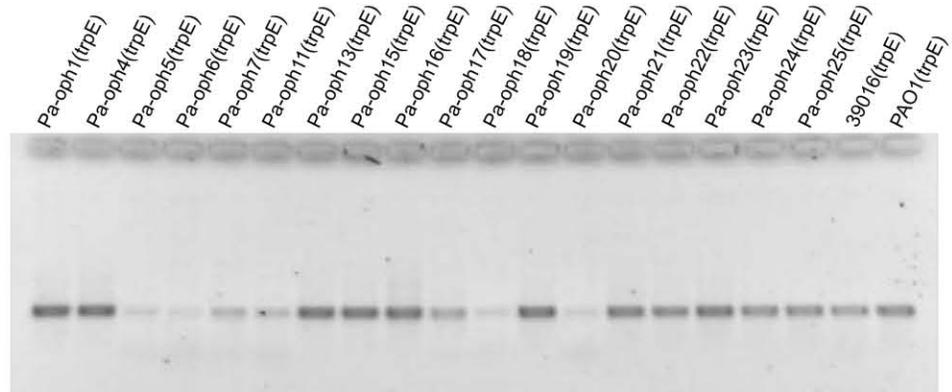
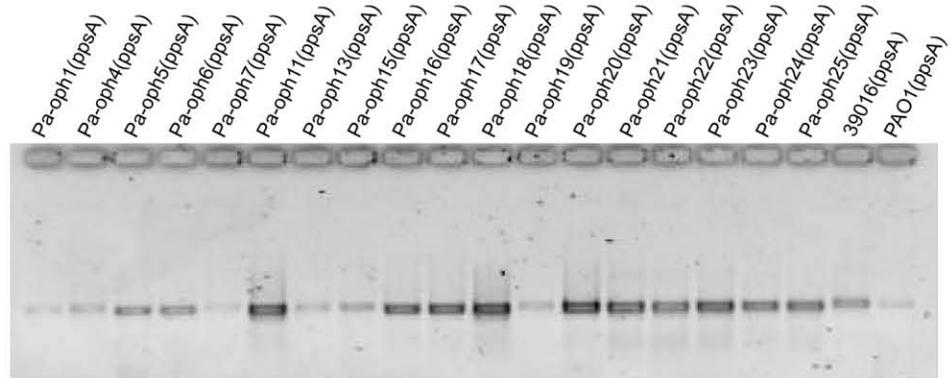
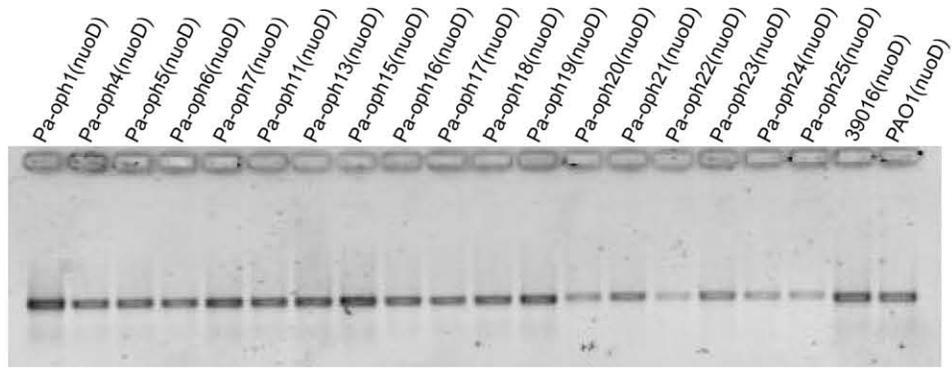
7.4 Amplificación de los marcadores de MLST.

Los siete marcadores (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* y *trpE*) se amplificaron en la mayoría de las cepas probadas usando las concentraciones y condiciones de amplificación estándar (ver Materiales y métodos). En los casos donde los marcadores no pudieron ser amplificados o lo hicieron en baja concentración (Anexos. Figura S1), fueron necesarias algunas modificaciones para obtener el producto de amplificación deseado. Dichas modificaciones consistieron en: aumentar la concentración de DNA genómico en las reacciones de amplificación, usar como molde los productos de amplificación con baja concentración obtenidos de intentos previos o cambiar la temperatura de hibridación de los *primers* (Anexos. Figura S2).

7.5 Purificación de los amplicones.

Los amplicones de los siete marcadores en las 18 cepas oftálmicas y las 2 cepas control se lograron purificar sin perder dichas muestras en el proceso (Figura 6).





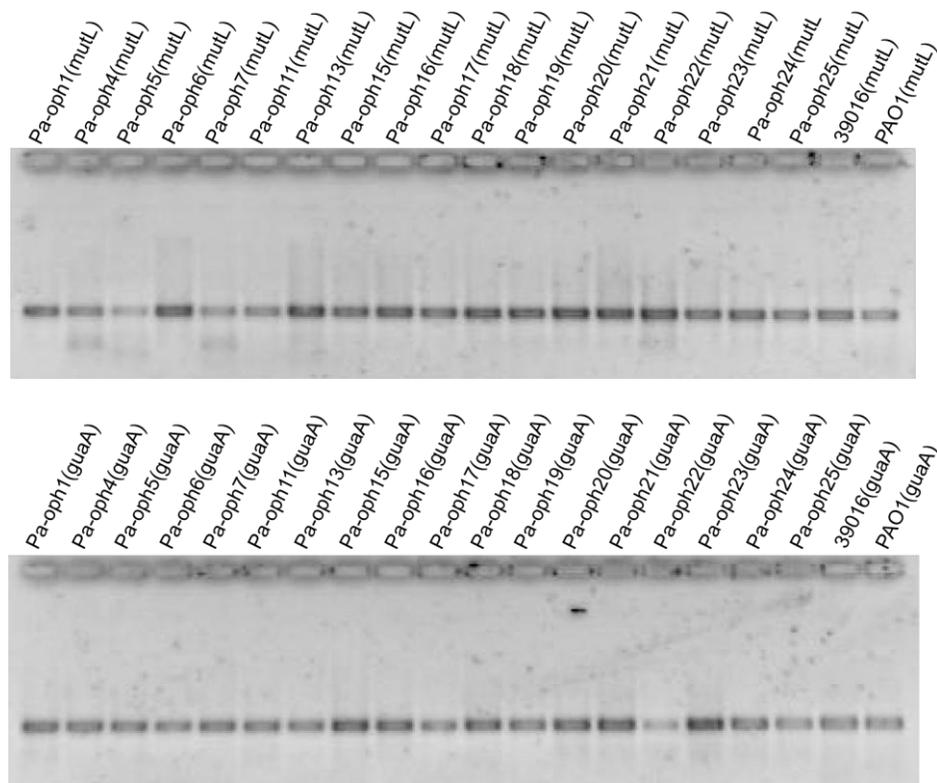


Figura 6. Purificación de los amplicones de los siete marcadores en las 18 cepas oftálmicas y en las cepas control 39016 y PAO1 de *P. aeruginosa*. La cepa y el marcador del cual fue purificado el amplicon se indican en la parte superior de cada carril en el gel de agarosa.

7.6 Identificación de los alelos y ST de las cepas oftálmicas.

La totalidad de los amplicones fue secuenciada mediante la tecnología tipo Sanger en la empresa Macrogen. Los resultados obtenidos del servicio de secuenciación fueron procesados (se alinearon y recortaron, ver Materiales y métodos) previo a la identificación del tipo de alelo y ST a través de la base de datos de MLST de *P. aeruginosa* (Tabla 3). El proceso de identificación evidenció la presencia de cuatro alelos nuevos, correspondientes a los marcadores *mutL*, *nuoD*, *ppsA* y *trpE* en las cepas PA-Oph23, PA-Oph5, PA-Oph7 y PA-Oph23, respectivamente (Tabla 3). En consecuencia, estas últimas cepas mantienen STs no asignados debido a que es necesario hacer el registro de los alelos nuevos en la base de datos. De forma similar, el ST de otras 5 cepas no pudo ser definido debido a que no hay registros previos para su combinación particular de alelos, por lo cual también pueden considerarse nuevos STs (Tabla 3). Adicionalmente, se lograron identificar 10 STs, 8 correspondientes a las cepas oftálmicas y 2 a las cepas control. En 3 de las

cepas (PA-Oph7, PA-Oph17 y PA-Oph19) el esquema quedó incompleto ya que no se obtuvo la secuencia del marcador *nuoD* (Tabla 3). Esto podría deberse a la existencia de más de una secuencia complementaria al diseño de los *primers*, ya que en dos ocasiones se obtuvieron productos de amplificación no específicos al marcador en cuestión.

	acsA	aroE	guaA	mutL	nuoD	ppsA	trpE	ST
PAO1	7	5	12	3	4	1	7	549
39016	38	11	3	13	1	2	4	235
Pa-Oph1	6	28	4	3	3	4	7	252
Pa-Oph4	16	5	1	3	58	7	19	N-ST
Pa-Oph5	5	4	3	6	N-A	33	42	N-ST
Pa-Oph6	13	4	5	5	12	7	15	308
Pa-Oph7	5	54	26	31	S-S	N-A	40	E-I
Pa-Oph11	38	11	3	13	1	2	4	235
Pa-Oph13	28	5	36	3	4	7	37	N-ST
Pa-Oph15	6	2	12	7	1	12	68	1416
Pa-Oph16	6	14	3	11	1	15	1	N-ST
Pa-Oph17	23	5	11	7	S-S	12	7	E-I
Pa-Oph18	44	8	5	3	15	6	14	N-ST
Pa-Oph19	17	5	19	5	S-S	11	7	E-I
Pa-Oph20	47	8	7	6	8	11	40	313
Pa-Oph21	11	84	11	3	4	4	7	649
Pa-Oph22	7	5	12	3	4	1	7	549
Pa-Oph23	15	23	11	N-A	1	15	N-A	N-ST
Pa-Oph24	17	5	1	1	11	15	172	N-ST
Pa-Oph25	15	5	1	3	2	6	7	363

Tabla 3. Alelos y STs identificados en las cepas de *P. aeruginosa* oftálmicas y control (N-A=Nuevo Alelo, N-ST= Nuevo ST, S-S=Sin Secuencia, E-I=Esquema Incompleto).

7.7 Análisis de los datos de MLST.

La exploración de los datos epidemiológicos relacionados a los STs identificados en nuestros aislados reveló 3 casos particularmente interesantes. El ST 235 al que pertenece nuestra cepa PA-Oph11 y la cepa 39016 registra otros 63 aislados de países de los 5 continentes y de hábitats muy diversos. El ST 252, identificado en

la cepa PA-Oph1, incluye otros 13 aislados que se asociaron al hábitat acuático y fueron reportados principalmente en Australia y Francia. Por último, el ST 308, identificado en nuestra cepa PA-Oph6, registra otros 10 aislados que en su mayoría se reportaron en Australia y se asociaron a los pulmones. Las cepas oftálmicas restantes presentaron STs relacionados, pero no idénticos, a los reportados en la base de datos, i.e. compartieron 6 de los 7 loci o menos. Respecto a la frecuencia de los alelos, el análisis de datos permitió identificar una prevalencia del alelo 3 de *mutL* y del alelo 5 de *aroE* entre los aislados (Anexo Tabla S2). Debido a que todos los perfiles alélicos identificados fueron diferentes, su frecuencia de aparición fue equitativa (5.6%). El algoritmo eBURST de expansión clonal [46], utilizado para analizar los perfiles alélicos del grupo oftálmico, no evidenció la formación de algún grupo clonal al evaluar únicamente este conjunto de datos. Esto se debe a que ninguno de los aislados oftálmicos compartió en común 4 alelos o más. Al incluir en dicho análisis el resto de los perfiles alélicos depositados en la base de datos, se lograron identificar 287 complejos clonales a los cuales se integraron la mayoría de los aislados oftálmicos de manera independiente. De estos grupos, solo 3 fueron considerados como representativos debido a que incluyeron más de 10 STs relacionados (Figura 7). Tales grupos correspondieron a los CCs 235, 252 y 308 que incluyeron 37, 15 y 11 STs relacionados, respectivamente (Figura 7). Los aislados oftálmicos que permanecieron sin agruparse corresponden a PA-Oph15, PA-Oph21 y PA-Oph23.

Dada la poca agrupación observada entre STs de nuestros aislados oftálmicos respecto a los reportados en bases de datos, decidimos calcular el índice de asociación estandarizado (I_A^S) que representa una prueba de recombinación (independiente del tamaño de la muestra) y medida del equilibrio de ligamiento (relación al azar entre los loci) [47]. Según lo reportado, en un grupo clonal se esperaría un valor significativamente diferente de cero que indicaría una relación no al azar entre los loci analizados (desequilibrio de ligamiento). El I_A^S obtenido sobre la colección oftálmica (que incluye a las cepas con alelos nulos en *nuoD*: PA-Oph7, PA-Oph17 y PA-Oph19) fue de 0.045 ($p = 0.03$) e indica ligero

desequilibrio de ligamiento. Este valor fue comparable con el 0.043 ($p < 0.001$) obtenido al integrar al análisis los 1931 perfiles alélicos existentes en base de datos al momento de realizar el estudio. Al descartar las 3 cepas con alelos nulos, se obtuvo un valor de I_A^S ligeramente mayor al calculado originalmente: 0.061 ($p=0.01$), no obstante, dicho valor sigue siendo similar al reportado en otra colección de *P. aeruginosa* (I_A^S de 0.07) donde se consideró que la recombinación tiene un papel clave en la distribución de los alelos [47].

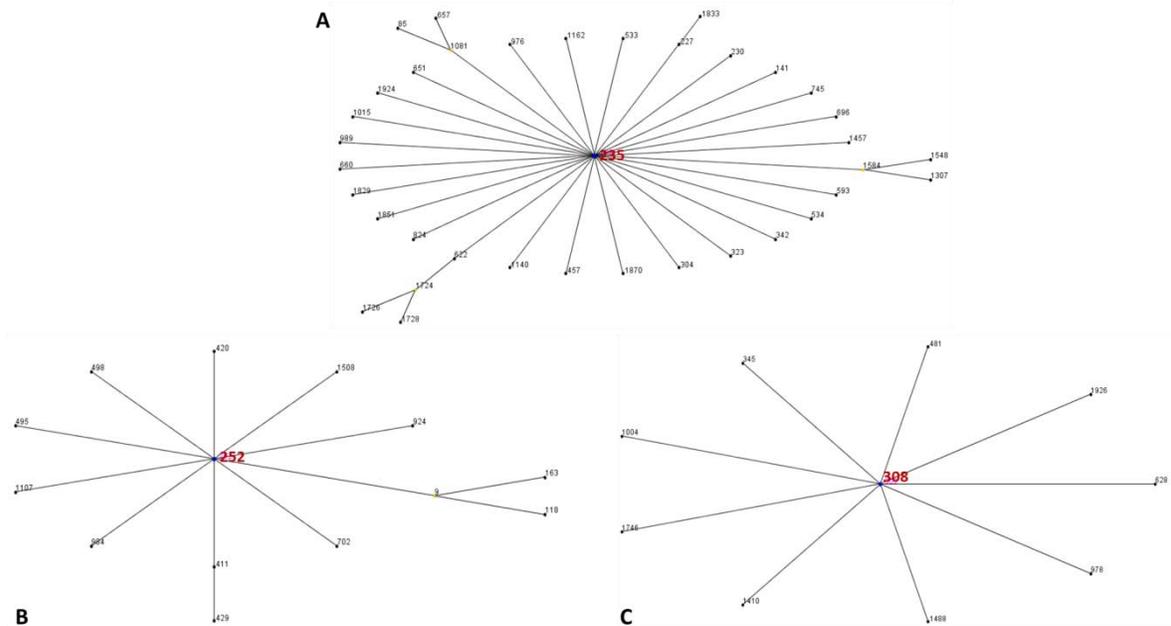


Figura 7. Complejos Clonales (CCs) independientes determinados por eBURST y que incluyen STs encontrados en 3 cepas oftálmicas. A. CC con el ST fundador 235 encontrado en la cepa oftálmica PA-Oph11. **B.** CC con el ST fundador 252 encontrado en la cepa oftálmica PA-Oph1. **C.** CC con el ST fundador 308 encontrado en la cepa oftálmica PA-Oph6. Los genotipos fundadores de los 3 CCs se muestran como un punto azul en el centro de los diagramas. Los STs alrededor del genotipo fundador corresponden a los que podrían haber divergido a partir de éste. La proximidad entre los diagramas no refleja la relación filogenética entre los STs de los 3 CCs.

7.8 Relación de las cepas oftálmicas a partir de las secuencias de MLST.

El dendrograma que representa la asociación entre las cepas oftálmicas y que fue construido a partir de las secuencias concatenadas de MLST, reveló la formación de 2 grupos principales. Uno de ellos muestra la asociación entre las cepas PA-Oph22, PA-Oph13, PA-Oph24, PA-Oph25 y la cepa control PAO1 mientras que el

otro evidenció una relación entre las cepas PA-Oph11, PA-Oph20, PA-Oph6, PA-Oph5 y la cepa control 39016 (Figura 8). En general, la topología de los arboles contruidos con las secuencias de los marcadores individuales no fue congruente con la agrupación observada a partir del análisis de las secuencias concatenadas (Anexos. Figura S3).

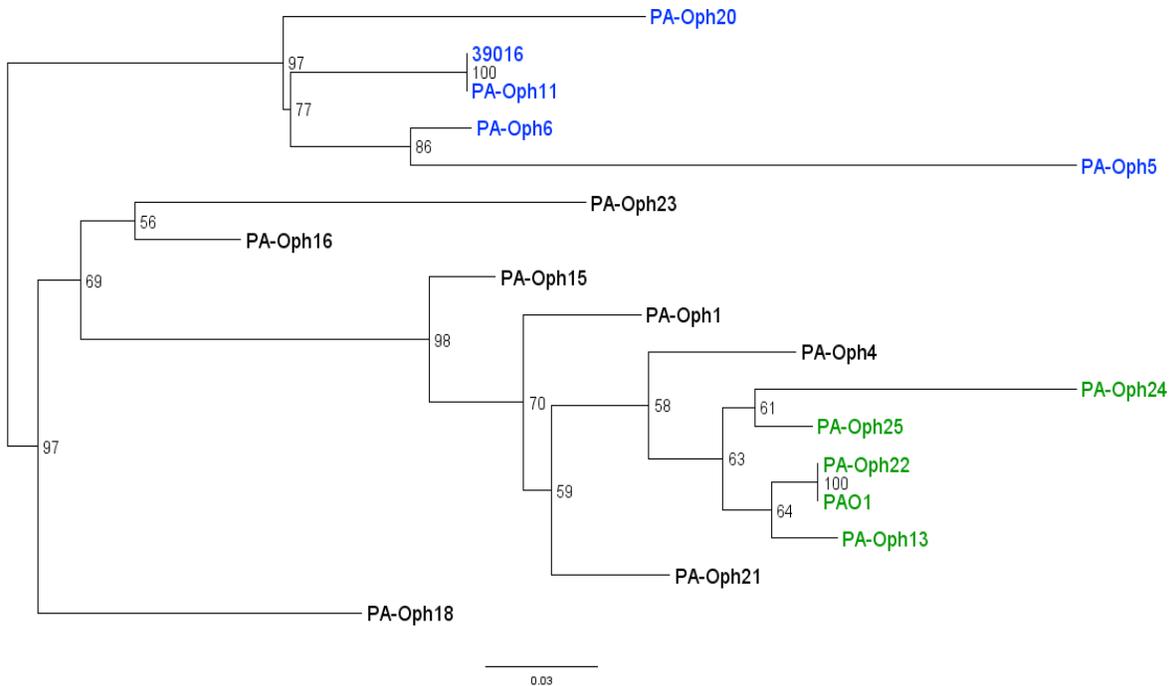


Figura 8. Dendrograma de las cepas oftálmicas construido por Máxima verosimilitud a partir de las secuencias concatenadas de MLST. Los principales grupos observados se ubican alrededor de 39016 y PAO1 y pueden ser identificados en color azul y verde respectivamente.

7.9 Pruebas de producción espontánea de fagos en las cepas indicadoras y oftálmicas.

Las cepas seleccionadas como indicadoras (ver Materiales y métodos) fueron las primeras en ser sometidas a pruebas de producción espontánea para conocer cuáles de ellas eran lisógenas y así anticipar una posible mezcla de fagos en caso de que las cepas oftálmicas los produjeran. No obstante, la única cepa que mostró ser lisógena en nuestros ensayos correspondió a Fc14, al producir fago con ligera variación de título en los periodos de incubación considerados (24, 48 y 72 horas) (Anexos. Figura S5). Por su parte, la mayoría de los sobrenadantes de las cepas oftálmicas (incluyendo la cepa control 39016) obtenidos de alguno de los 2

periodos de incubación (24 y 48 h), produjeron placas líticas sobre alguna(s) cepa(s) indicadora(s) (Tabla 4). Los sobrenadantes provenientes de las cepas PA-Oph5, PA-Oph16, PA-Oph17, PA-Oph19 y PA-Oph23 fueron los únicos que no produjeron placas líticas en ninguno de los 2 horarios evaluados (Tabla 4).

En cuanto a los periodos de recuperación de los sobrenadantes, aquellos obtenidos a las 48 h fueron los más eficientes para la obtención de fagos de las cepas oftálmicas, ya que en algunos casos las placas líticas fueron evidenciadas exclusivamente a partir de los sobrenadantes de este periodo. Este fue el caso de las cepas PA-Oph4, PA-Oph13, PA-Oph15, PA-Oph21 y PA-Oph22. Basados en los ensayos realizados, el 72% de las cepas oftálmicas (13 de 18) mostró evidencia de ser lisógena, siendo la cepa indicadora Fc76 la más susceptible. En total, 31 fagos fueron obtenidos a partir las 18 cepas oftálmicas y la cepa 39016, aunque aún no se han realizado pruebas apropiadas para determinar cuántos de ellos corresponden a fagos distintos.

7.10 Inducción de profagos con mitomicina C en las cepas oftálmicas.

El agente mitomicina C (MMC) fue utilizado en ensayos de inducción con el objetivo de identificar profagos asociados a las cepas oftálmicas. Los tratamientos con MMC [3.0 µg/ml] realizados en algunas de las cepas oftálmicas, causaron la lisis de los cultivos, lo cual fue evidenciado por el decaimiento de las curvas de crecimiento correspondientes (Anexos. Figura S3). No obstante, la mayoría de estos lisados no evidenciaron la presencia de fagos con la excepción de los lisados de las cepas PA-Oph1 y 39016 que sí formaron placas líticas sobre tapices de cepas indicadoras. Las cepas PA-Oph4 y PA-Oph15, sometidas a este tratamiento, ya habían demostrado ser lisógenas en ensayos previos de producción espontánea de fagos, sugiriendo que el tratamiento de MMC a [3.0 µg/ml] es suficientemente tóxico para matar a dichas cepas antes de la inducción de sus profagos (Anexos. Figura S4). Considerando esta posibilidad y el hecho de que los fagos obtenidos mediante tratamientos con MMC eran escasos y con el mismo perfil de infección que los obtenidos en los ensayos de producción espontánea (aunque con un título ligeramente mayor en las cepas PA-Oph1 y

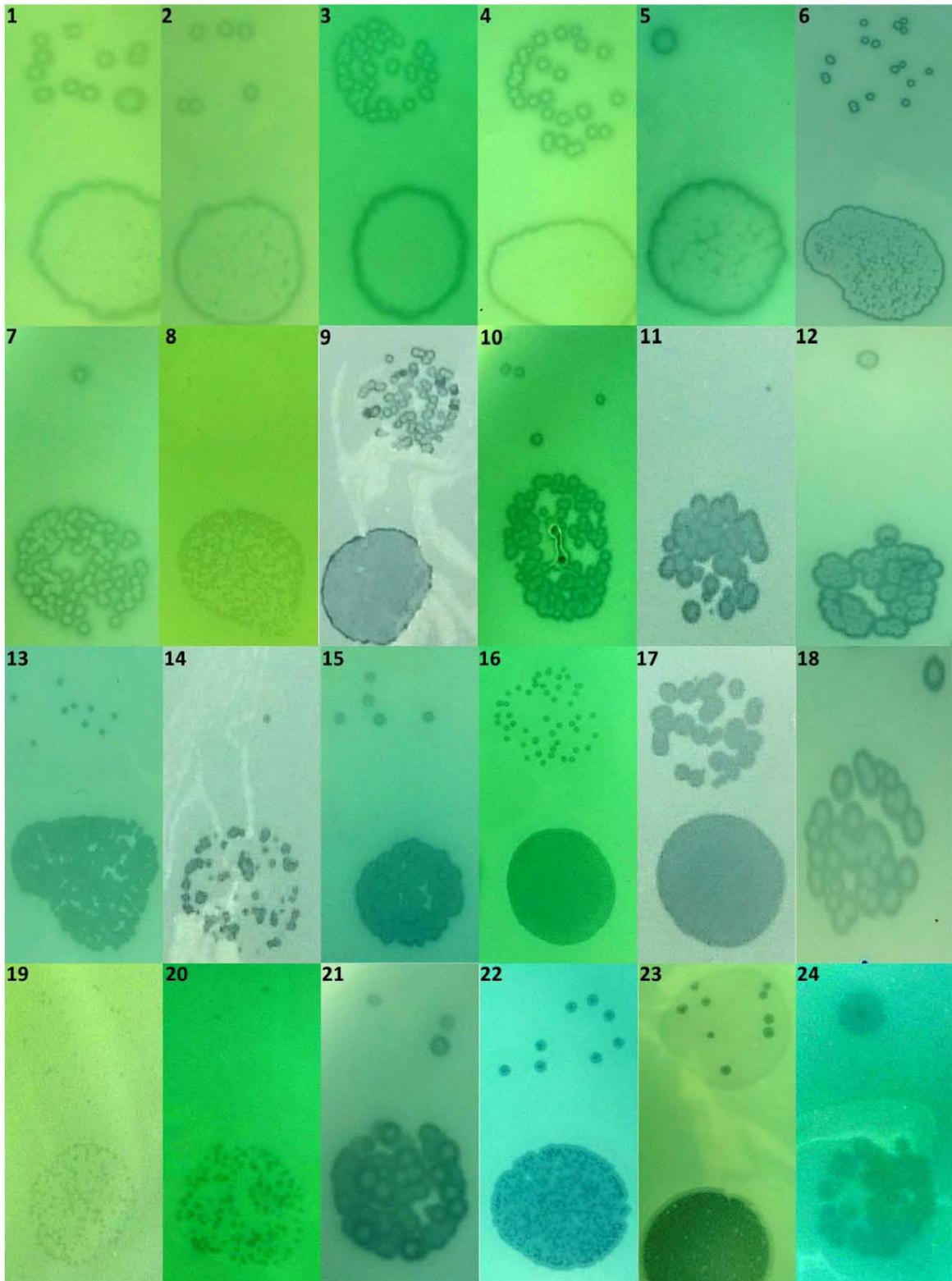
39016: Anexos. Tabla S2), se optó por evidenciar y aislar los fagos de las cepas oftálmicas únicamente a partir de las pruebas de producción espontánea (Tabla 4) (información complementaria sobre los tratamientos de inducción con MMC: Anexos. Figura S3).

	Ps53	Ps33	Ps26	Ps9	LESB58	39016	Fc76	Fc14	PA14	PA01
PA-Oph1							++			
PA-Oph4							+			
PA-Oph5										
PA-Oph6		++		+			++			++
PA-Oph7							++			
PA-Oph11		++					++			++
PA-Oph13							+			
PA-Oph15							+			
PA-Oph16										
PA-Oph17										
PA-Oph18		++					++			+
PA-Oph19										
PA-Oph20							++			
PA-Oph21							+			
PA-Oph22							+			+
PA-Oph23										
PA-Oph24	+	+					++		+	+
PA-Oph25		+	++				++	+		
39016	++		++				++		++	

Tabla 4. Matriz de infección con los fagos de las cepas oftálmicas y de 39016 obtenidos de los sobrenadantes de 2 periodos (24 y 48 h). Las celdas de la primera columna corresponden a los sobrenadantes de las cepas evaluadas y sus colores indican: **verde**, infección (formación de placas líticas); **rojo**, sin infección observada sobre el conjunto de cepas indicadoras evaluado (indicado en la primera fila). El signo “+” refleja la formación de placas líticas utilizando el sobrenadante obtenido de 24 h; el mismo símbolo en color negro “+” indica la formación de placas líticas a partir del sobrenadante de 48 h.

7.11 Morfología de placa lítica y títulos de los stocks de los fagos aislados a partir de las cepas oftálmicas.

Los fagos obtenidos a partir de las cepas oftálmicas mostraron una gran diversidad de morfologías de placa (Figura 9). Por otra parte, la mayoría de los stocks preparados para respaldar los fagos aislados (ver Materiales y métodos) alcanzaron títulos de 10^{10} e incluso algunos de 10^{11} UFP/ml⁻¹, lo cual podría reflejar una alta eficiencia de infección de estos fagos sobre las cepas usadas como indicadoras (Tabla 5).



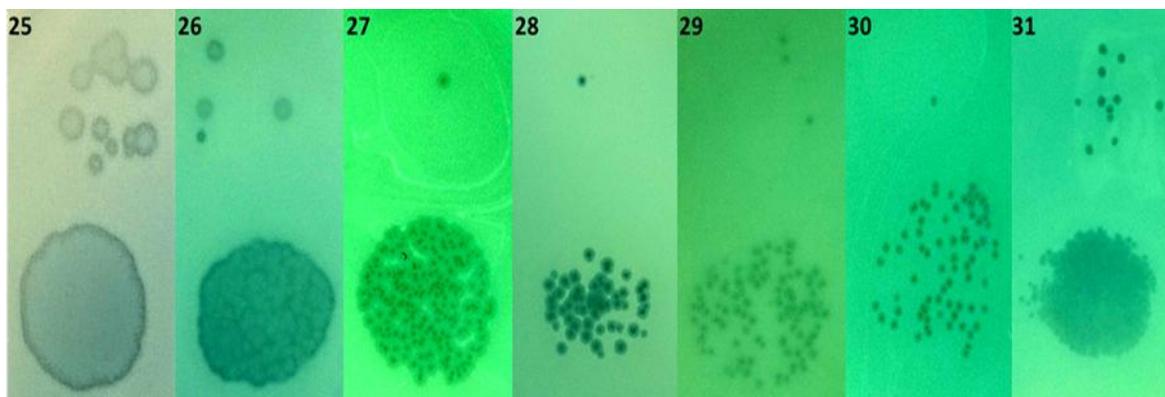


Figura 9. Morfología de placa lítica de los fagos obtenidos a partir de las cepas oftálmicas. La figura muestra las placas líticas producidas por los sobrenadantes de las cepas oftálmicas sobre tapices de cepas indicadoras. Los números en la figura indican cada uno de los fagos aislados; correspondiendo al sobrenadante del cual fueron obtenidos y la cepa indicadora sobre la cual fueron propagados como se describe a continuación: **1.** PA-Oph1 sobre Fc76, **2.** PA-Oph4 sobre Fc76, **3.** PA-Oph7 sobre Fc76, **4.** PA-Oph13 sobre Fc76, **5.** PA-Oph15 sobre Fc76, **6.** PA-Oph20 sobre Fc76, **7.** PA-Oph21 sobre Fc76, **8.** PA-Oph22 sobre Fc76, **9.** PA-Oph22 sobre PAO1, **10.** PA-Oph11 sobre Fc76, **11.** PA-Oph11 sobre PAO1, **12.** PA-Oph11 sobre Ps33, **13.** PA-Oph18 sobre Fc76, **14.** PA-Oph18 sobre PAO1, **15.** PA-Oph18 sobre Ps33, **16.** PA-Oph6 sobre Fc76, **17.** PA-Oph6 sobre PAO1, **18.** PA-Oph7 sobre Ps33, **19.** PA-Oph6 sobre Ps9, **20.** PA-Oph25 sobre Fc76, **21.** PA-Oph25 sobre Ps33, **22.** PA-Oph25 sobre Ps26, **23.** PA-Oph25 sobre Fc14, **24.** PA-Oph24 sobre en Fc76, **25.** PA-Oph7 sobre PAO1, **26.** PA-Oph24 sobre Ps33, **27.** PA-Oph24 sobre PA14, **28.** PA-Oph24 sobre Ps53, **29.** 39016 sobre Fc76, **30.** 39016 sobre PA14, **31.** 39016 sobre Ps53.

Título UFP(ml) Cepa	Cepas Indicadoras utilizadas para la obtención de los stocks							
	Fc76	PAO1	Ps33	PA14	Ps53	Ps26	Ps9	Fc14
PA-OPH1	2.2x10 ⁹							
PA-OPH4	1.2x10 ⁹							
PA-OPH7	1.1x10 ¹⁰							
PA-OPH13	6x10 ⁹							
PA-OPH15	2x10 ¹⁰							
PA-OPH20	3.6x10 ⁹							
PA-OPH21	2x10 ¹⁰							
PA-OPH22	2.2x10 ¹⁰	1.5x10 ¹⁰						
PA-OPH11	1x10 ¹¹	2x10 ¹⁰	2x10 ¹⁰					
PA-OPH18	1.8x10 ¹¹	2x10 ¹⁰	1x10 ¹¹					
PA-OPH6	9.8x10 ⁹	6.2x10 ⁹	9x10 ⁹				7.2x10 ⁹	
PA-OPH25	8x10 ¹⁰		6x10 ¹⁰			1.8x10 ¹¹		2x10 ¹⁰
PA-OPH24	1.8x10 ⁹	2.4x10 ¹¹	8x10 ¹⁰	2x10 ¹⁰	2x10 ¹⁰			
39016	6x10 ¹⁰			1.5x10 ¹⁰	2.2x10 ⁹			

Tabla 5. Títulos de los stocks generados en este trabajo a partir de los fagos aislados de las cepas oftálmicas.

8) Discusión

Los estudios realizados en los últimos años sobre diversas poblaciones de *P. aeruginosa* (particularmente las asociadas a nichos clínicos) han sugerido que su estructura poblacional es epidémica, es decir, un grado intermedio entre una población panmíctica y una clonal [22]. En consecuencia, se cree que dicha población es predominantemente sexual aunque alberga algunas cepas cercanamente relacionadas o complejos clonales (CCs) de gran éxito [20, 21, 26, 40]. En algunos de estos estudios también se ha sugerido la posibilidad de que la queratitis provocada por *P. aeruginosa* sea causada por alguno de los CCs existentes. Para explorar dicha cuestión, en nuestro estudio analizamos por MLST un grupo de aislados exclusivamente oftálmicos. Nuestros resultados indicaron que las 18 cepas caracterizadas tuvieron perfiles alélicos diferentes aunque presentaron una prevalencia de los alelos *mutL-3* y *aroE-5*. El análisis de dichos perfiles alélicos con eBURST no evidenció la formación de algún CC y al incluir el resto de genotipos multilocus reportados en la base de datos, solo 3 de las cepas oftálmicas se agruparon con CCs representativos (Figura 7). Una situación similar fue reportada por Yamaguchi y colaboradores en 2014 para otra colección de aislados oftálmicos [42]. El valor de I_A^S de 0.045 obtenido sobre el conjunto oftálmico caracterizado en este trabajo apoya la relación no clonal entre los aislados, ya que un valor cercano a 0, indica poco o nulo desequilibrio de ligamiento y en consecuencia una débil asociación entre los loci analizados. Esta evidencia se suma a la poca congruencia observada en la topología de los árboles realizados con las secuencias de los marcadores independientes (Anexos. Figura S3). No obstante, cabe resaltar que algunas consistencias de agrupación fueron perceptibles entre los arboles de algunos marcadores y el árbol construido con el concatenado de los mismos. Este fue el caso de los marcadores *aroE* y *trpE* en donde se evidenció la agrupación entre las cepas PAO1, PA-Oph22, PA-Oph13, PA-Oph25 y PA-Oph24, y las cepas 39016, PA-Oph5, PA-Oph6, PA-Oph11 y PA-Oph20. Tales resultados sugieren que la recombinación en los loci analizados es desproporcional, ya que algunos sostienen una relación cercana entre ciertos aislados y otros, por el contrario, los distancian. De manera interesante, el valor

del I_A^S obtenido con el análisis de nuestro grupo de aislados oftálmicos (0.045) fue similar al calculado considerando todos los perfiles alélicos reportados en la base de datos (0.043). Aunque estamos conscientes de que la cantidad de cepas de nuestro grupo de estudio dista de ser una muestra representativa de la población de *P. aeruginosa* causante de queratitis, resulta muy probable que los perfiles alélicos reportados hasta ahora tampoco representen una muestra cercana a la existente en la naturaleza. No obstante, creemos que dicho valor de I_A^S es indicativo de que nuestro grupo oftálmico no presenta un mismo origen clínico a pesar del sesgo de muestreo (todas las cepas provienen de un mismo hospital y tiempo de aislamiento reciente), por lo cual descartamos que un linaje clonal se haya transmitido entre los pacientes de los cuales provienen los aislados.

Estos resultados difieren de lo sugerido previamente por Lomholt y colaboradores en 2001 respecto a que un linaje clonal de *P. aeruginosa* es particularmente patogénico del ojo [20]. En dicho estudio los autores reportan una agrupación considerable de aislados de queratitis en unos cuantos tipos electroforéticos mediante caracterización por MLEE. No obstante, debido a que la técnica utilizada no tiene el poder resolutivo suficiente para discriminar si los patrones de migración electroforética idénticos son producto de genes también idénticos, resulta probable que la variabilidad de los genes codificantes de las enzimas analizadas pudiera haber pasado desapercibida sugiriendo un linaje clonal falso. Unos años más tarde Winstanley y colaboradores (2005), en concordancia con nuestros resultados, reportaron la ausencia de pruebas para identificar un clon común en una colección de aislados asociados exclusivamente a queratitis ulcerativa y que fueron caracterizados mediante AFLPs [41]. Sin embargo, los autores de este estudio coincidieron con Lomholt y colaboradores [20] en que la presencia del gen *exoU* (*exoU+*), además de la actividad twitching, se encuentran en un alto porcentaje de los aislados oftálmicos (59 y 98% respectivamente). Por su parte, Choy y colaboradores reportaron en 2008 que el genotipo *exoU+* se encontraba asociado particularmente a cepas de queratitis relacionadas a lentes de contacto (queratitis-LC) [48]. Recientemente, Yamaguchi y colaboradores (2014)

identificaron una proporción de genotipos (mutuamente excluyentes) *exoS+* y *exoU+* de 56.5% y 34.8%, respectivamente, entre diversos aislados de queratitis. No obstante, reafirmaron que la proporción de *exoU+* era mayor entre las cepas de queratitis-LC. Al analizar los datos que obtuvieron por MLST, dichos aislados *exoU+* de queratitis-LC se agruparon en un árbol filogenético en contraste a los aislados *exoS+* sin asociación a LC que permanecieron sin ser agrupados [42]. En consecuencia, los autores del estudio sugirieron que el genotipo *exoU+* podría estar asociado con los aislados de queratitis-LC y que el origen de dichos aislados podría ser distinto al de aquellos no relacionados a LC. Este origen podría ser una fuente de agua ambiental y los aislados tendrían la capacidad de sobrevivir a los desinfectantes de LC, en parte debido a la expresión de *exoU*, para posteriormente causar queratitis [49, 50]. Considerando estos antecedentes, sería importante determinar si los aislados oftálmicos caracterizados en este trabajo presentan el genotipo *exoU+*. Dado que la relación entre el genotipo *exoU+* y los casos de queratitis ulcerativa ha sido reportada previamente [12, 41], esperábamos identificar una relación estrecha entre nuestros aislados causantes de queratitis ulcerativa, sin embargo, esto no ocurrió.

En el mismo sentido, Stewart y colaboradores (2011) identificaron algunos marcadores particulares de una subpoblación de *P. aeruginosa* asociada con queratitis mientras caracterizaban sus aislados con un sistema de genotipificación clondiag AT. Estos marcadores incluyeron los genes *exoU* y *katN*, el alelo *oriC1*, una versión distintiva de *pilA* y el acarreo de islas genómicas comunes que sugieren que dicha subpoblación está particularmente capacitada para causar infecciones corneales y por lo tanto es más probable encontrarla entre aislados de queratitis [40]. Mediante la secuenciación genómica de la cepa oftálmica 39016, correspondiente al aislado más representativo de la colección de Stewart y colaboradores (2011), se evidenció la presencia varias islas genómicas y profagos de diferentes tipos. De manera interesante, nosotros identificamos que la cepa PA-Oph11 de nuestro grupo de aislados tiene un ST idéntico al de la cepa 39016 por lo cual ambas se incluyen dentro del mismo CC (235). Adicionalmente, resaltamos

que otros 63 aislados reportados en la base de datos presentaron el mismo ST y fueron asociados a diversas infecciones (en sangre, bronquios, tracto urinario y tejido suave) y cuerpos de agua, en países como Rusia, Francia, China, Nigeria, Australia y Brasil. En consecuencia, es claro que dicho CC emergente (reportado en los últimos 12 años) no es selectivo para un hábitat específico y resulta de vital importancia estudiarlo ya que actualmente es el segundo en incluir más STs asociados en la base de datos PubMLST.

Hasta ahora, son pocos los factores de virulencia que parecen estar claramente asociados a los aislados de queratitis. Estos incluyen los pili tipo IV, indispensables para la adhesión y adecuada motilidad twitching, y el gen *exoU*, requerido para agravar rápidamente la enfermedad. En este último caso, la presencia y expresión del gen suele ser suficiente para considerar a las cepas como citotóxicas o virulentas [12, 51-53]. Una estrategia alternativa para identificar factores de virulencia asociados a este tipo de infección podría consistir en estudiar el componente accesorio que distingue a los aislados de queratitis de otro tipo de cepas. Dicha estrategia contrasta con el enfoque utilizado hasta ahora de analizar la variabilidad y asociación de las cepas a partir de la información que reside en los genes del *core* genómico mediante métodos como el MLST.

La estrategia de exploración del componente genómico accesorio fue abordada en este trabajo al estudiar la asociación entre las cepas clínicas de queratitis y la presencia de profagos en las mismas. Dichos profagos suelen representar un componente significativo del genoma accesorio y se ha reportado que pueden codificar factores de virulencia en *P. aeruginosa* [30-32]. Nuestros resultados de los ensayos de producción espontánea e inducción de profagos con mitomicina C revelaron que la mayoría de los aislados oftálmicos se encuentran asociados a profagos (13 de 18 cepas), como ha sido reportado para la cepa 39016 [40]. El hecho de que el perfil de infección de los fagos aislados fuera similar o idéntico en algunos casos, podría sugerir que varios de los fagos albergados son del mismo tipo y podrían estar asociados de forma específica a esta clase de cepas.

Experimentos de caracterización adicionales serán necesarios para dilucidar la identidad de los fagos aislados e inferir si estos podrían contribuir a la virulencia de las cepas oftálmicas como ha sido sugerido para cepas de *P. aeruginosa* asociadas a otras enfermedades [37].

Además de su posible contribución al fenotipo virulento de las bacterias, se ha sugerido que los fagos tienen un papel destacado como transductores dentro las comunidades de *P. aeruginosa* e incluso podrían ser responsables de la mayor parte de la transferencia horizontal que promueve la variabilidad genética y diversificación de las cepas [54, 55]. De esta manera, considerando las ventajas reportadas y sugeridas sobre la asociación exitosa entre los fagos temperados y sus hospederos, es posible explicar el alto número de cepas oftálmicas que identificamos como lisógenas en el presente trabajo.

Otro tipo de genes que pueden conferir ventajas selectivas a las bacterias y suelen formar parte del genoma accesorio son aquellos que confieren resistencia a determinados antibióticos utilizados en la práctica terapéutica. En nuestra colección de aislados oftálmicos de *P. aeruginosa* identificamos perfiles de susceptibilidad a un grupo de antibióticos que fueron prácticamente idénticos a los de la cepa 39016 (Tabla 2). Dicho perfil consistió en resistencia de alto nivel frente a los betalactámicos (cefazolina, ceftriaxona y ampicilina con sulbactam), tigeciclina, nitrofurantoína y trimetoprima con sulfametoxazol, y sensibilidad a cefepina, imipenem, meropenem y a bajas concentraciones de aminoglicósidos y fluoroquinolonas. En general, los valores de CMI detectados en esta colección de aislados de queratitis fueron similares a los reportados como altos en otras colecciones de aislados de queratitis de *P. aeruginosa* [56, 57], incluyendo a la cepa 39016 [40].

Al integrar y analizar los resultados provenientes de la caracterización de los aislados oftálmicos por MLST y por aislamiento de sus fagos temperados identificamos discrepancias interesantes entre la información obtenida del genoma

core y el accesorio. Uno de estos casos es representado por las cepas PA-Oph11 y 39016 que comparten el mismo ST aunque sus fagos temperados asociados presentan perfiles de infección distintos y en consecuencia podrían representar tipos diferentes. Otro caso similar ocurre con las cepas PA-Oph22 y PAO1, ya que la primera demostró ser lisógena en nuestros experimentos mientras que la cepa PAO1 no posee profagos inducibles según lo reportado hasta ahora.

Durante los ensayos de aislamiento de bacteriófagos notamos que las cepas LESB58 y 39016, reportadas anteriormente como poli-lisógenas [37, 40], fueron inmunes a la superinfección por los fagos aislados de nuestro grupo de cepas oftálmicas. Este resultado podría sugerir que los fagos aislados de nuestras cepas oftálmicas pertenecen al mismo tipo que aquellos albergados por LES58 y 39016 o que dichas cepas cuentan con mecanismos de defensa como el sistema CRISPR o genes de exclusión codificados por sus profagos que les permitan ser resistentes a la infección. En contraste, la cepa indicadora Fc76 fue la más sensible a la infección por nuestros fagos aislados, lo cual podría ser explicado por la carencia de profagos en su genoma, lo cual es apoyado por nuestros experimentos de inducción en donde no mostró ser una cepa lisógena o por la presencia de profagos que no sean homoinmunes a los aislados en este trabajo.

En cuanto a los periodos de inducción utilizados para el aislamiento de nuestros bacteriófagos, pudimos identificar casos donde se presentaron diferencias claras en la obtención de fagos entre los periodos de 24 y 48 h. En algunos de estos casos (cepas PA-Oph-4,-13,-15,-21 y -22, Tabla 3) los fagos solo pudieron ser obtenidos de los sobrenadantes de 48 h de incubación. Estos resultados concuerdan con un reporte previo que indica que la inducción de profagos en cepas de *P. aeruginosa* puede ser promovida prolongando la inanición al incubar los cultivos por más de 24 h [58]. En tales casos resulta probable que, además de la inanición, la acumulación de alguna molécula tóxica en el medio sea la responsable de la inducción. En contraste, observamos casos donde los cultivos con 24 h de incubación o menos, presentaron un título mayor al de sus análogos

de 48 h. Hasta ahora no ha sido reportada una descripción sobre la dinámica de la inducción en los diferentes tiempos de un cultivo. Sin embargo, los patrones observados en nuestro trabajo dan pistas sobre algún tipo de regulación temporal en la inducción de estos bacteriófagos.

9) Conclusiones

- Un grupo de 18 cepas oftálmicas de *P. aeruginosa* asociadas a pacientes con queratitis fue caracterizado por MLST y por presencia de bacteriófagos temperados asociados.
- El análisis de los resultados de MLST evidenció 7 ST y 4 alelos nuevos, además de evidencia nula de una relación clonal entre este grupo de aislados o la asociación de un CC particular con esta patología oftálmica.
- Respecto a su asociación con fagos inducibles, 13 de las 18 cepas oftálmicas (72%) mostró ser lisógena. Los 28 fagos aislados a partir estas cepas mostraron un perfil de infección similar aunque sus morfologías de placa lítica fueron muy diversas.

10) Perspectivas

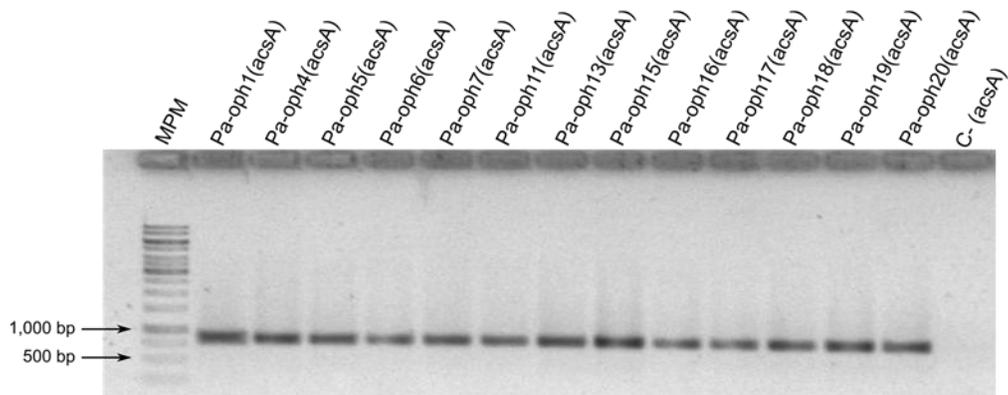
Para complementar los resultados obtenidos en este trabajo se pretende:

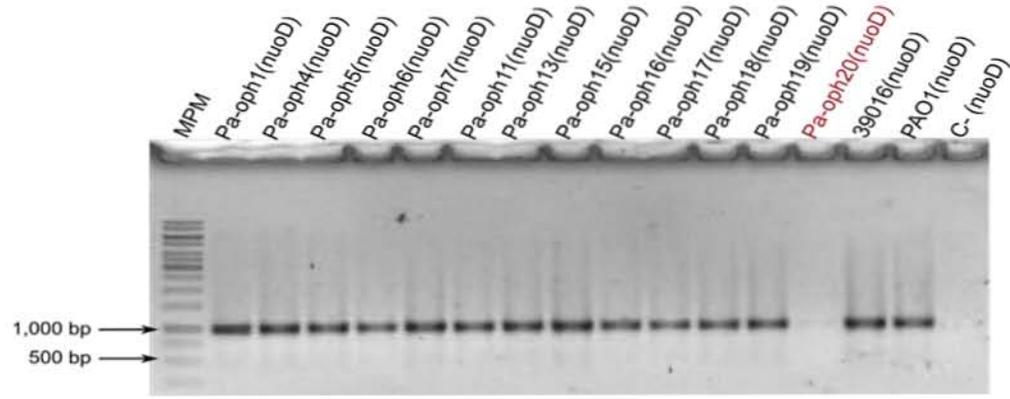
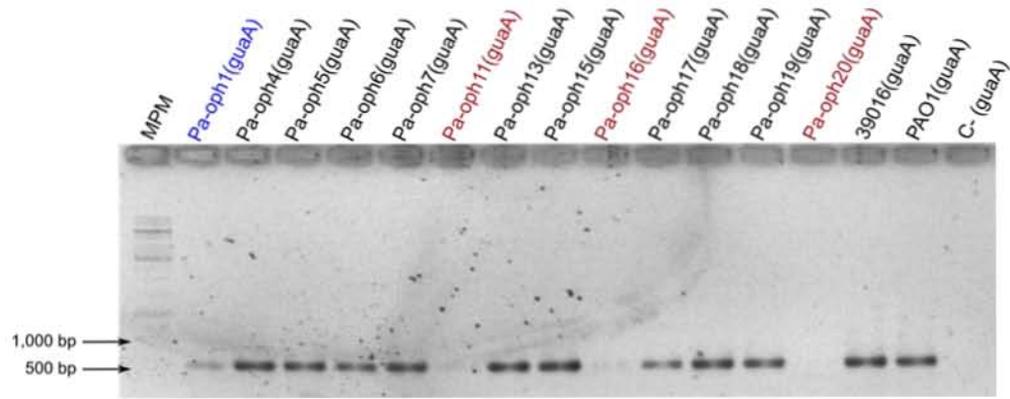
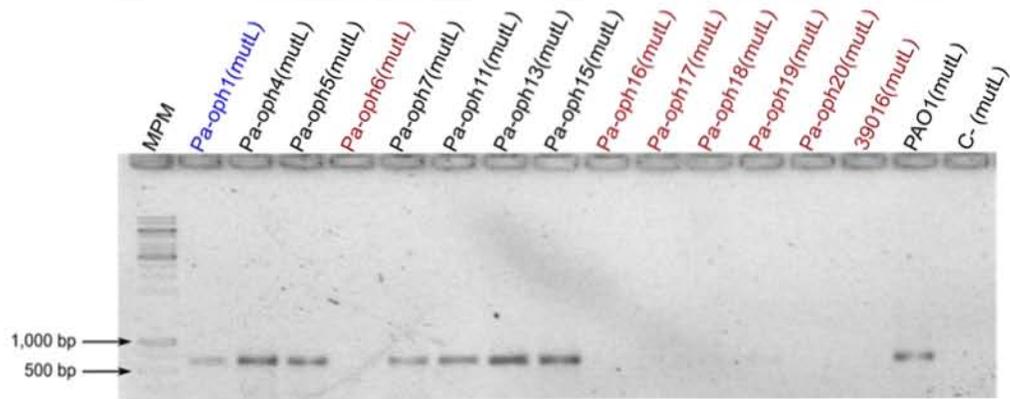
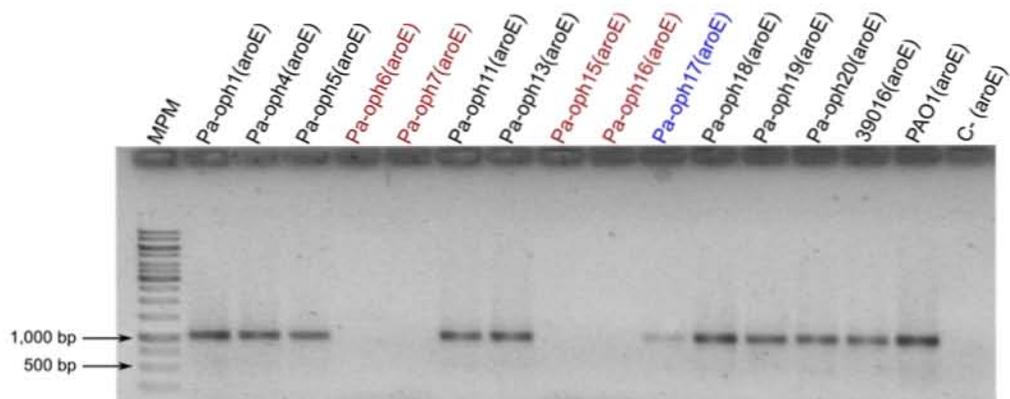
- Caracterizar los fagos aislados de las cepas oftálmicas mediante ensayos de rango de hospedero y RFLPs para determinar su identidad.
- Amplificar por PCR regiones genómicas específicas de fagos Mu-like para identificar cuáles de los fagos aislados pertenecen a este tipo.
- Secuenciar los fagos de interés que incluyen aquellos que no hayan sido reportados previamente.
- Explorar por amplificación por PCR y secuenciación la presencia del gen *exoU* y la versión del alelo *pilA* en las cepas oftálmicas.
- Ampliar la colección de aislados oftálmicos para realizar un estudio más robusto.

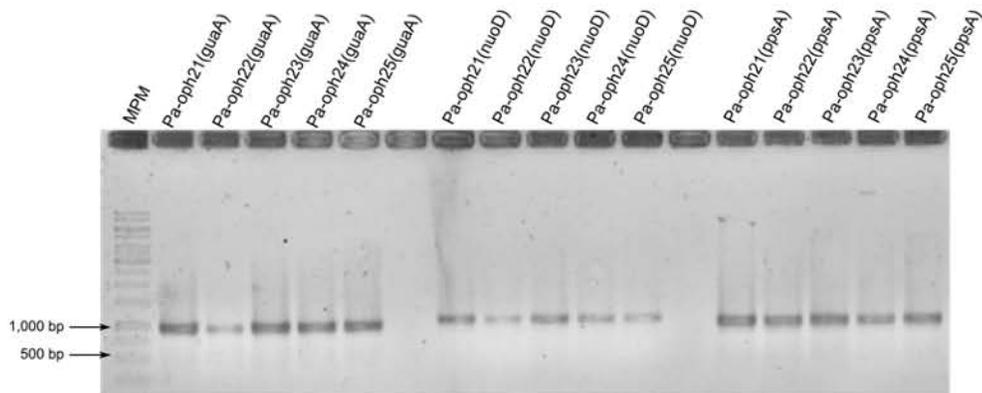
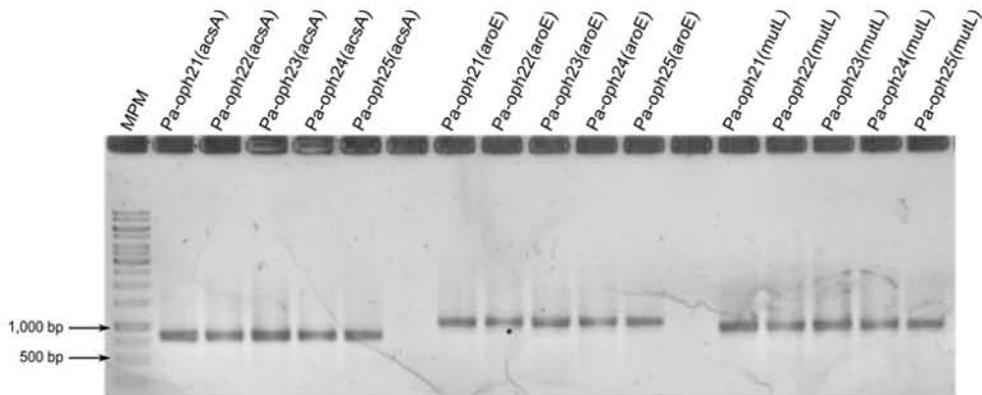
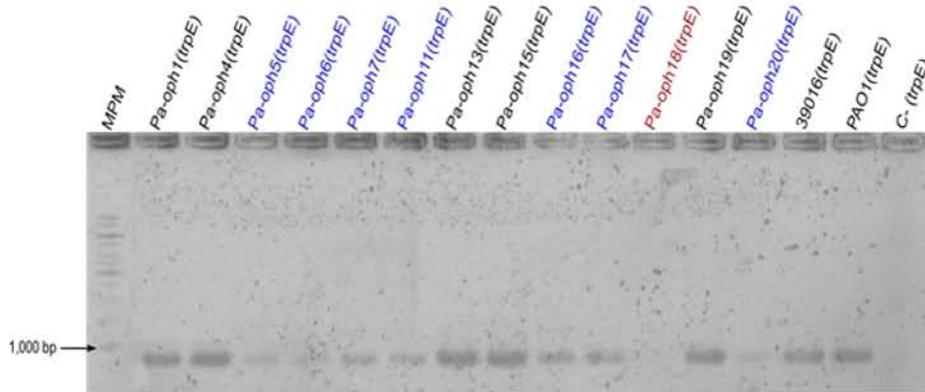
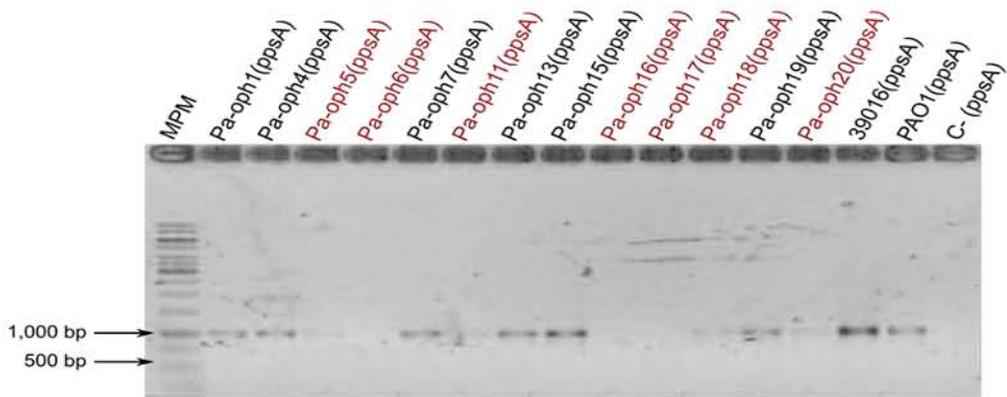
11) Anexos

Cepa Oftálmica	Concentración de DNA (ng/μl)	260/280
PA-Oph-1	245.1	1.97
PA-Oph-4	356.2	1.97
PA-Oph-5	507.2	2.04
PA-Oph-6	625.8	2.08
PA-Oph-7	322.4	1.93
PA-Oph-11	651	2.05
PA-Oph-13	439.7	2.03
PA-Oph-15	210.6	2
PA-Oph-16	351.5	2.06
PA-Oph-17	322.9	1.97
PA-Oph-18	375	2.04
PA-Oph-19	388.5	2.02
PA-Oph-20	651.5	2.06
PA-Oph-21	313.4	2.04
PA-Oph-22	548.6	2.04
PA-Oph-23	457.1	2
PA-Oph-24	350.1	2.02
PA-Oph-25	389.7	2.03
39016	216.6	1.94
PAO1	687	2.11

Tabla S1. Valores de concentración y pureza 260/280 obtenidos de las extracciones de DNA genómico de las cepas oftálmicas y control (PAO1 y 39016).







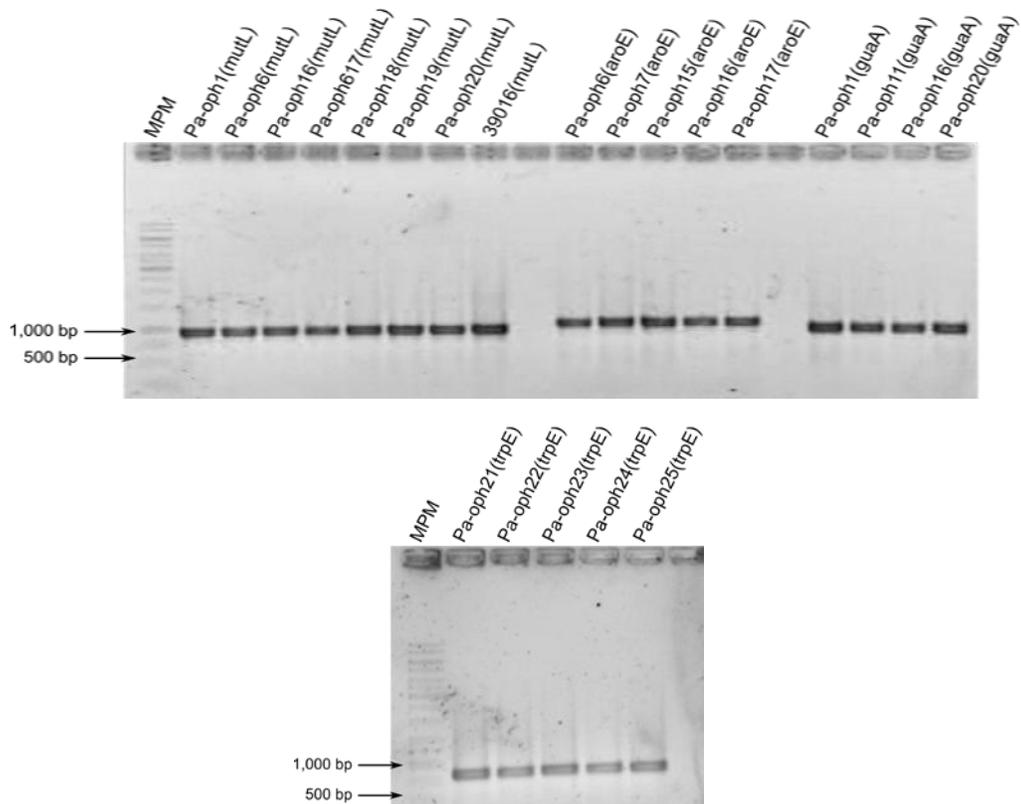
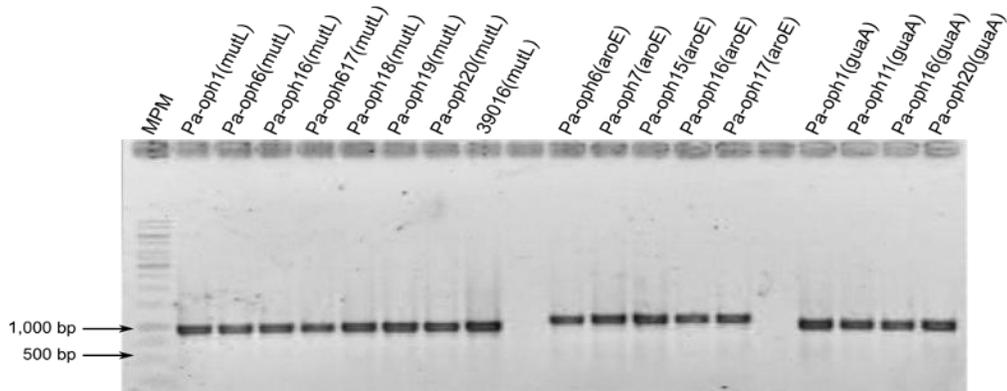


Figura S1. Amplificación de los marcadores (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* y *trpE*) en las cepas oftálmicas y control (la cepa y el marcador se ubican en la parte superior de los carriles en cada gel, los colores corresponden: **negro-amplificación del marcador, **azul**- amplificación del marcador en baja concentración y **rojo**- no amplificación del marcador).**



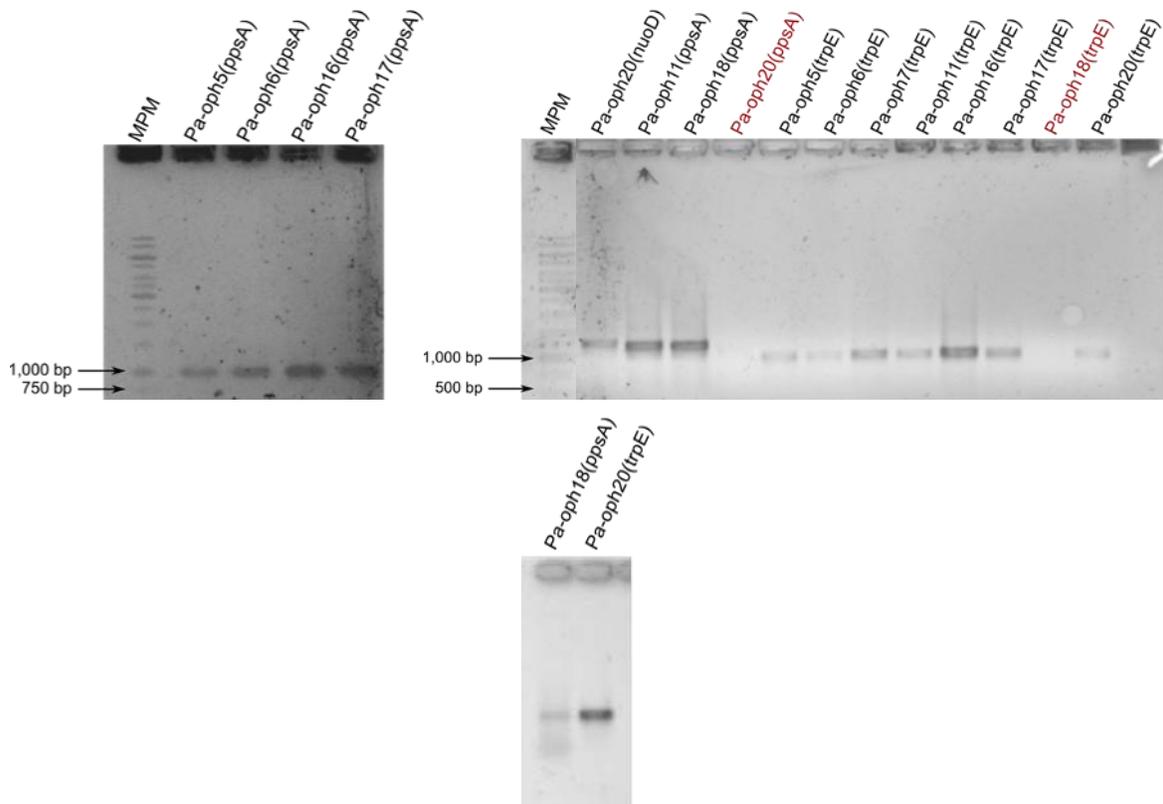
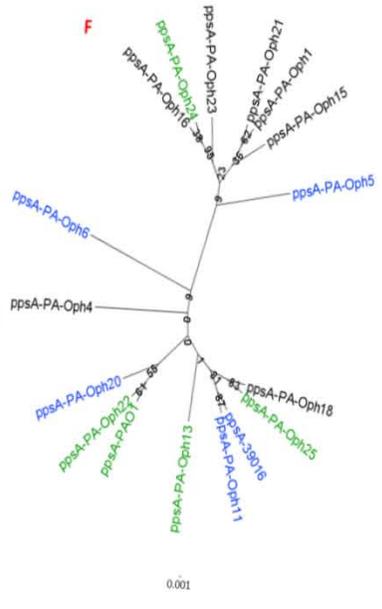
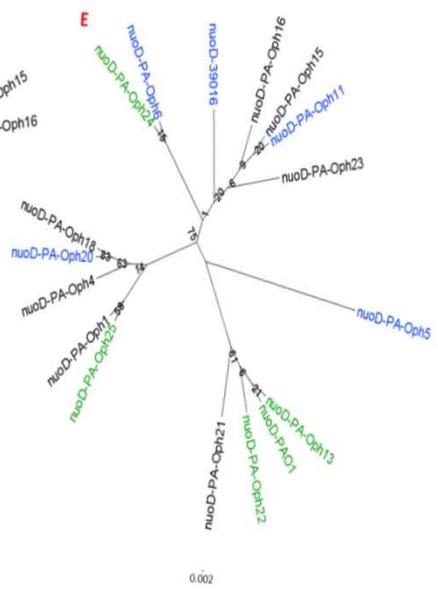
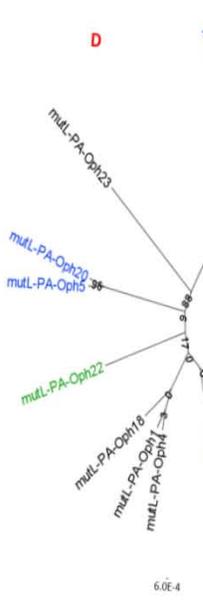
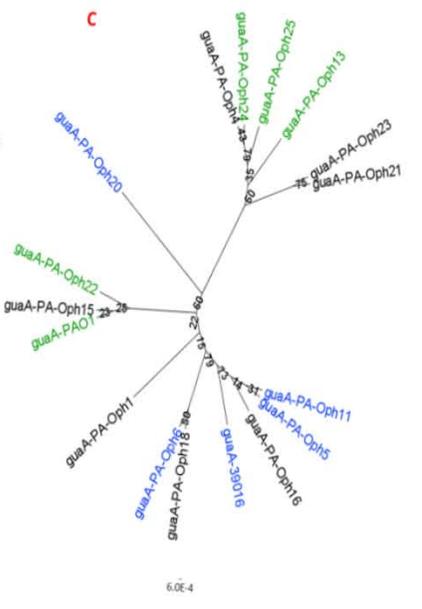
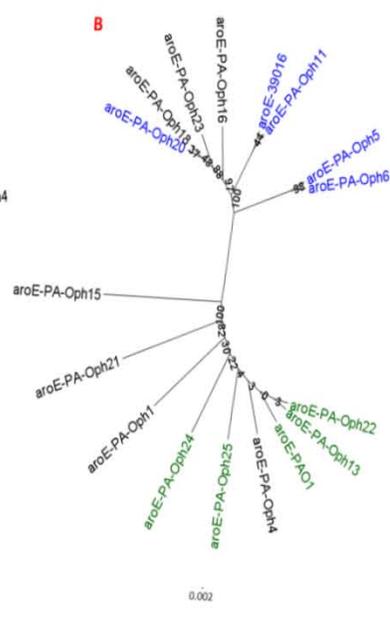
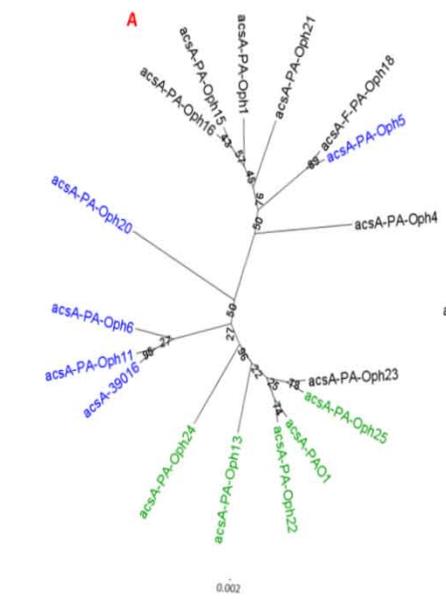


Figura S2. Amplificación de los marcadores que habían presentado problemas (lo habían hecho en baja concentración o no habían amplificado) en algunas de las cepas oftálmicas.

Allele	acs	aro	gua	mut	nuo	pps	trp
1	-	-	3	1	4	1	1
2	-	1	-	-	1	1	-
3	-	-	3	7	1	-	-
4	-	2	1	-	3	2	1
5	2	7	2	2	-	-	-
6	3	-	-	2	-	2	-
7	1	-	1	2	-	3	6
8	-	2	-	-	1	-	-
11	1	1	3	1	1	2	-
12	-	-	2	-	1	2	-
13	1	-	-	1	-	-	-
14	-	1	-	-	-	-	1
15	2	-	-	-	1	3	1
16	1	-	-	-	-	-	-
17	2	-	-	-	-	-	-
19	-	-	1	-	-	-	1
23	1	1	-	-	-	-	-
26	-	-	1	-	-	-	-
28	1	1	-	-	-	-	-
31	-	-	-	1	-	-	-
33	-	-	-	-	-	1	-
36	-	-	1	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	1
38	1	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	2
42	-	-	-	-	-	-	1
44	1	-	-	-	-	-	-
47	1	-	-	-	-	-	-
54	-	1	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	1	-	-
68	-	-	-	-	-	-	1
84	-	1	-	-	-	-	-
100	-	-	-	-	1	-	-
128	-	-	-	-	-	1	-
157	-	-	-	1	-	-	-
172	-	-	-	-	-	-	1
193	-	-	-	-	-	-	1
Unicos	13	10	10	9	10	10	12

Tabla S2. Frecuencia de los alelos de MLST de las cepas oftálmicas (la celdas resaltadas en rojo corresponden a los alelos prevalentes 3-mutL y 5-aroE).



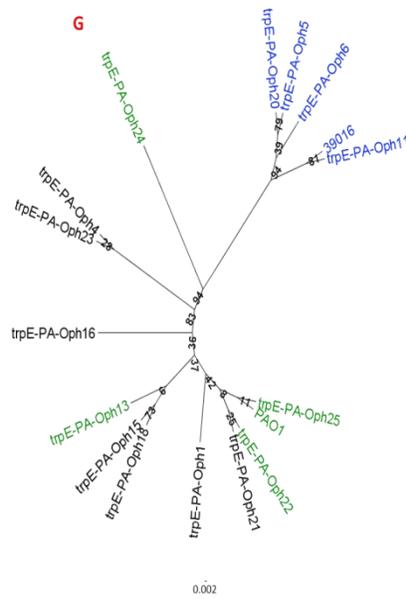


Figura S3. Árboles construidos con máxima verosimilitud (ML) a partir de las secuencias obtenidas de las cepas oftálmicas en cada marcador (A, árbol de *acsA*, B, árbol de *aroE*, C, árbol de *guaA*, D, árbol de *mutL*, E, árbol de *nuoD*, F, árbol de *ppsA* y G, árbol de *trpE*)

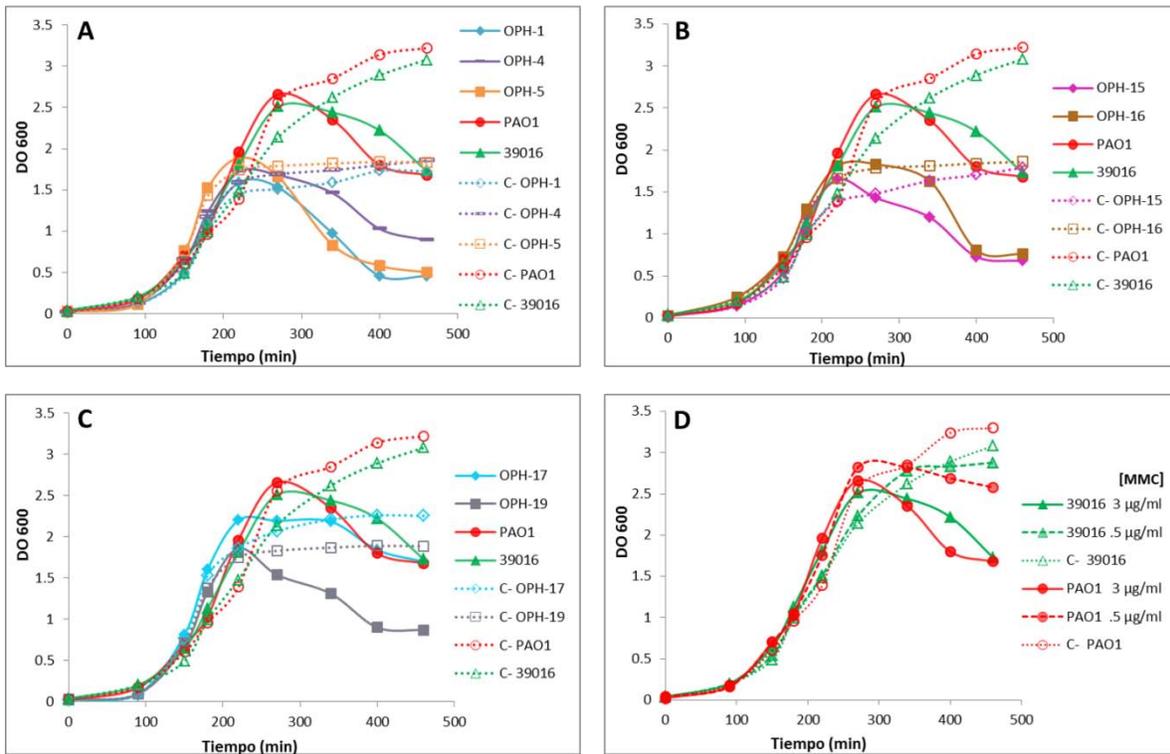


Figura S3. Curvas de crecimiento de las cepas oftálmicas tratadas con MMC. A, B y C. Tratamientos sobre las cepas oftálmicas PA-Oph-1,-4,-5,-15,-16,-17,-19 y control (PAO1 y 39016) a una concentración final de 3.0 µg/ml (líneas y símbolos con rellenos solidos), controles sin MMC (líneas punteadas y símbolos

vacíos). **D.** Tratamientos sobre PAO1 (líneas en color rojo) y 39016 (líneas en color verde) a 3.0 µg/ml (líneas solidas) y 0.5 µg/ml (líneas discontinuas) como concentraciones finales.

Información complementaria sobre la inducción de profagos con MMC en las cepas oftálmicas.

Las curvas de crecimiento de las cepas oftálmicas y de las cepas 39016 y PAO1 usadas como control mostraron un evidente decaimiento o lisis ~3 horas después de iniciar el tratamiento con MMC (Figura S3). En general fue perceptible un punto máximo de caída y una fase de mantenimiento entre las 5 y 6 h posteriores al inicio del tratamiento. En contraste con las cepas oftálmicas, el tratamiento de MMC a [3 µg/ml] no provocó un decaimiento tan drástico en las cepas control (Figura S3. A, B y C). Los lisados generados a partir de estos tratamientos se utilizaron en ensayos de infección para identificar profagos asociados, no obstante solo los lisados de PA-Oph1 y 39016 formaron placas líticas (Figura S4) y el resto de los lisados originaron halos de lisis (datos no mostrados). El uso de la MMC a 2 concentraciones sobre las cepas control no reveló gran diferencia en la dinámica de las curvas de crecimiento a pesar de que 39016 es polilisógena y PAO1 a la fecha no ha presentado profagos inducibles (Figura S3. D), además en la cepa 39016 se evidenció que el tratamiento de MMC a [3.0 µg/ml] produce un título mayor de fago que el tratamiento a [0.5 µg/ml] y a su vez este produce un título mayor de fago que el obtenido por producción espontánea (Figura S4. B y Tabla S2).

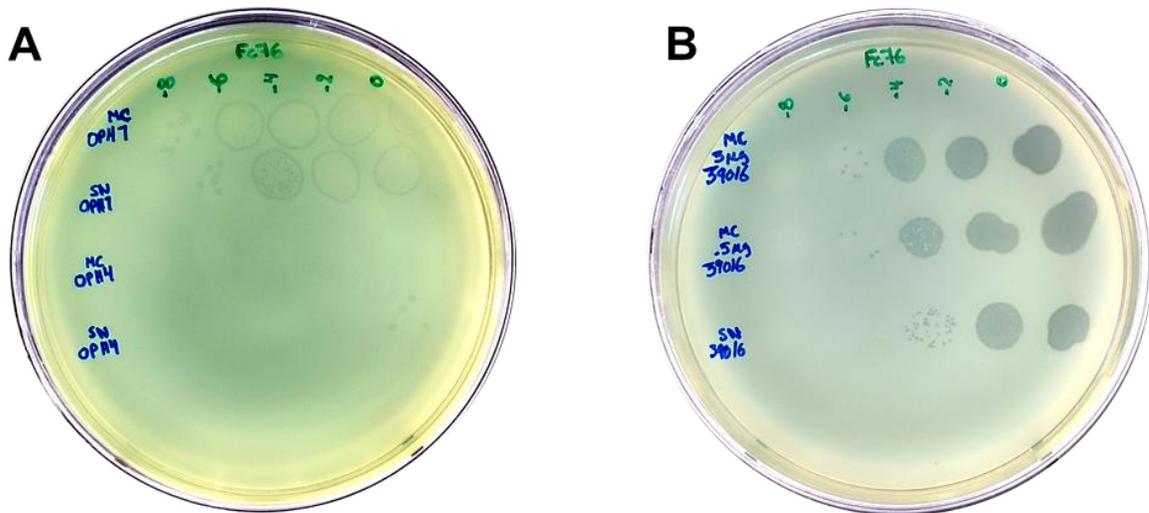


Figura S4. Ensayos de infección con los lisados de los tratamientos con MMC a [3.0 µg/ml] (cepas: PA-Oph1 y PA-Oph4) y [0.5 µg/ml] (cepa 39016) y los sobrenadantes. (MMC-mitomicina C, SN-sobrenadante).

Cepa [MMC]	Cepa indicadora		
	Fc76	PA14	Ps53
PA-OPH1 con MMC [3.0 µg/ml]	1.4x10 ¹¹		
PA-OPH1 SN	1.2x10 ⁹		
39016 con MMC [3.0 µg/ml]	1.4x10 ⁹	2.2x10 ⁹	4x10 ⁸
39016 con MMC [0.5 µg/ml]	8x10 ⁸	6x10 ⁸	2x10 ⁸
39016 con SN (24h)	11.6x10 ⁷	2x10 ⁸	1x10 ⁷

Tabla S2. Títulos de fago obtenido con los tratamientos de MMC en las cepas PA-OPH1 y 39016. Las celdas vacías indican que no hubo formación de placas líticas sobre las respectivas cepas indicadoras (MMC-mitomomicina C, SN-sobrenadante).

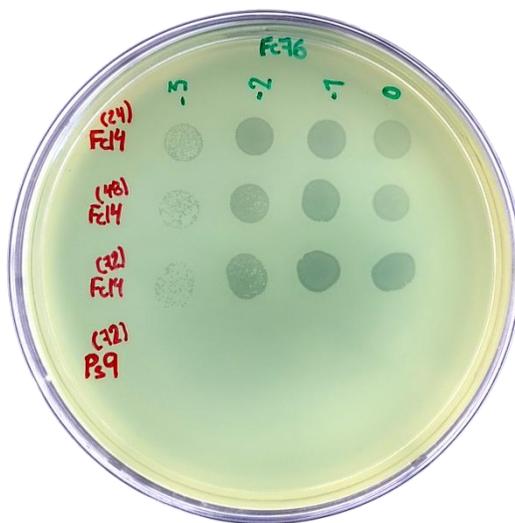


Figura S5. Ensayo de infección con los sobrenadantes la cepa Fc14 recuperados en 3 periodos (24, 48 y 72 h) sobre la cepa Fc76. (La cepa y los periodos de recuperación del sobrenadante del cultivo de Fc14 se muestran rotulados en rojo y la cepa indicadora en verde)

12) Referencias

1. Goldberg, J.B. (2000) *Pseudomonas*: global bacteria. Trends Microbiol 8: 55–57.
2. Lyczak, J. B., C. L. Cannon, and G. B. Pier. 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. Microbes Infect.2:1051–1060.
3. Fleiszig S.M. & Evans D.J. (2002). The pathogenesis of bacterial keratitis: studies with *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Exp Optom 85, 271–278.
4. Cheng K, Leung D, Hoekman H, et al. Incidence of contact-lens-associated microbial keratitis and its related morbidity. Lancet. 1999;354:181–184.
5. Wilson, L. A, R. L. Schlitzer, and D. G. Ahern. 1981. *Pseudomonas* corneal ulcers associated with soft contact-lens wear. Am. J. Ophthalmol.92:546–554.
6. Stern, G. A., D. Weizenkorn, and J. Valenti. 1982. Adhaerence of *Pseudomonas aeruginosa* to the mouse cornea. Epithelial v. stromal adhaerence. Arch. Ophthalmol.100:1956–1958.
7. Hazlet, L. D., M. Moon, and R. S. Burk.1986. In vivo identification of sialic acid as the ocular receptor for *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 20:25–29.
8. Lee DG, Urbach JM, Wu G, Liberati NT, Feinbaum RL, et al. (2006) Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. Genome Biol 7: R90.

9. Zolfaghar, I., Evans, D. J. & Fleiszig, S. M. (2003). Twitching motility contributes to the role of pili in corneal infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 71, 5389–5393. Schulert GS, Feltman H, Rabin SD, Martin CG, Battle SE, et al. (2003)
10. Sun Y, Karmakar M, Taylor PR, Rietsch A, Pearlman E (2012) ExoS and ExoT ADP ribosyltransferase activities mediate *Pseudomonas aeruginosa* keratitis by promoting neutrophil apoptosis and bacterial survival. *J Immunol* 188: 1884–1895.
11. Hauser AR (2009) The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 7: 654–665.
12. Tam C, Lewis SE, Li WY, Lee E, Evans DJ, et al. (2007) Mutation of the phospholipase catalytic domain of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU abolishes colonization promoting activity and reduces corneal disease severity. *Exp Eye Res* 85: 799–805.
13. Fleiszig, S. M., Arora, S. K., Van, R. & Ramphal, R. (2001). FlhA, a component of the flagellum assembly apparatus of *Pseudomonas aeruginosa*, plays a role in internalization by corneal epithelial cells. *Infect Immun* 69, 4931–4937.
14. Howe, T. R., and B. H. Iglewski. 1984. Isolation and characterization of alkaline protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in a mouse eye model. *Infect. Immun.* 43:1058–1063.
15. Kawaharajo, K., Abe, C., Homma, J. Y., Kawano, M. & Goto, E. (1974). Corneal ulcers caused by protease and elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn J Exp Med* 44, 435–442.

16. Kessler, E., Kennah, H. E. & Brown, S. I. (1977). *Pseudomonas* protease: purification, partial characterization, and its effect on collagen, proteoglycan, and rabbit corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*16, 488–497.
17. Preston, M. J., P. C. Seed, D. S. Toder, B. H. Iglewski, D. E. Ohman, J. K. Gustin, J. B. Goldberg, and G. B. Pier. 1997. Contribution of proteases and LasR to virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during corneal infections. *Infect. Immun.*65:3086–3090.
18. Twining, S. S., S. E. Kirschner, L. A. Mahnke, and D. W. Frank. (1993) Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase, alkaline protease, and exotoxin A on corneal proteinases and proteins. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 34: 2699-2712.
19. Pillar, C. M. & Hobden, J. A. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and keratitis in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*43, 1437–1444.
20. Lomholt, J. A., Poulsen, K. & Kilian, M. (2001). Epidemic population structure of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a clone that is pathogenic to the eye and that has a distinct combination of virulence factors. *Infect Immun*69, 6284–6295.
21. Pirnay, J. P., De Vos, D., Cochez, C., Bilocq, F., Vanderkelen, A., Zizi, M., Ghysels, B. & Cornelis, P. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays an epidemic population structure. *Environ Microbiol*4, 898–911.
22. Maynard Smith J, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG (1993) How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 4384–4388.
23. Van Belkum, A. (1994). DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin. Microbiol. Rev.* 7, 174 –184.

24. Birren, B.W., and Lai, E. (1993). Pulsed-Field Gel Electrophoresis: A Practical Guide. Academic Press, San Diego, CA.
25. Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., et al. (1998). Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 95, 3140–3145.
26. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG (2004) Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 42: 5644–5649.
27. Maiden, M.C.J., 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 60, 561–588.
28. Urwin, R., Maiden, M.C.J., 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. Trends Microbiol. 11, 479–487.
29. Lewis-Rogers, N., Bendall, M.L., Crandall, K.A., 2009. Phylogenetic relationships and molecular adaptation dynamics of human rhinoviruses. Mol. Biol. Evol. 26, 969–981.
30. Canchaya, C., Proux, C., Fournous, G., Bruttin, A., and Brüssow, H. (2003) Prophage genomics. Microbiol Mol Biol Rev 67: 238–276.
31. Casjens, S. (2003) Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? Mol Microbiol 49: 277–300.
32. Ceysens PJ, Lavigne R: Bacteriophages of *Pseudomonas*. Future Microbiol 2010, 5:1041–1055.

33. Holloway BW, Cooper GN: Lysogenic conversion in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 1962, 84:1321–1324.
34. Kuzio J, Kropinski AM: O-antigen conversion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by bacteriophage D3. J Bacteriol 1983, 155:203–212
35. Hayashi T, Baba T, Matsumoto H, Terawaki Y: Phage-conversion of cytotoxin production in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol 1990, 4:1703–1709.
36. Nakayami, K., S. Kanaya, M. Ohnishi, Y. Terawaki, and T. Hayashi. 1999. The complete nucleotide sequence of phi CTX, a cytotoxin-converting phage of *Pseudomonas aeruginosa*: implications for phage evolution and horizontal gene transfer via bacteriophages. Mol. Microbiol. 31:399–419.
37. Winstanley C, Langille MG, Fothergill JL, Kukavica-Ibrulj I, Paradis-Bleau C, Sanschagrín F, Thomson NR, Winsor GL, Quail MA, Lennard N, et al: Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Genome Res 2009, 19:12–23.
38. Canchaya, C., Fournous, G., Chibani-Chennoufi S., Dillmann ML., and Brüssow, H. (2003). Phage as agents of lateral gene transfer. Trends Microbiol 6:417–424.
39. Boyd, E.F., and Brüssow, H. (2002). Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. Trends Microbiol 10:521–529.
40. Stewart RM, Wiehlmann L, Ashelford KE, Preston SJ, Frimmersdorf E, Campbell BJ, et al. Genetic characterization indicates that a specific

subpopulation of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with keratitis infections. J Clin Microbiol 2011; 49:993e1003.

41. Winstanley C, Kaye SB, Neal TJ, Chilton HJ, Miksch S, Hart CA. Genotypic and phenotypic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates associated with ulcerative keratitis. J Med Microbiol 2005; 54:519e26.
42. Yamaguchi S, Suzuki T, Kobayashi T, Oka N, Ishikawa E, Shinomiya H, Ohashi Y. Genotypic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from ocular infection. J Infect Chemother 20 (2014) 407e411.
43. Wen-ping Chen' and Tsong-teh Kuo. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. Nucleic Acids Research 1993, 21: 2260.
44. Sambrook J. and Russell W.D. Molecular cloning. A laboratory manual (2001). 4th ed. Cold spring harbor laboratory press, New York, Vol 1, Chapter 1.
45. Cazares L.A. (2010). Caracterización de los bacteriófagos Φ 73 y Φ 74 pertenecientes a una colección de fagos que infectan cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.
46. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG (2004) eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J Bacteriol 186: 1518–1530.
47. Maatallah, M., Cheriaa, J., Backhrouf, A., Iversen, A., Grundmann, H., Do, T., Lanotte, P., Mastouri, M., Elghmati, M.S., Rojo, F., Mejdj, S., Giske, C.G.,

2011. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. PLoS ONE 6, e25617
48. Choy MH, Stapleton F, Willcox MD, Zhu H. Comparison of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from contact lens- and non-contact lens-related keratitis. J Med Microbiol 2008; 57:1539e46.
49. Shankar J, Sueke H, Wiehlmann L, Horsburgh MJ, Tuft S, Neal TJ, et al. Genotypic analysis of UK keratitis-associated *Pseudomonas aeruginosa* suggests adaptation to environmental water as a key component in the development of eye infections. FEMS Microbiol Lett 2012; 334:79e86.
50. Lakkis C, Fleiszig SM. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to hydrogel contact lens disinfection correlates with cytotoxic activity. J Clin Microbiol 2001; 39:1477e86.
51. Finck-Barbancon V, Goranson J, Zhu L, et al. *ExoU* expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. Mol Microbiol. 1997;25:547–557.
52. Hauser AR, Kang PJ, Engel JN. (1998) PepA, a secreted protein of *Pseudomonas aeruginosa*, is necessary for cytotoxicity and virulence. Mol Microbiol 27:807–818.
53. Schulert GS, Feltman H, Rabin SD, Martin CG, Battle SE, et al. (2003) Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia. J Infect Dis 188: 1695–1706.
54. Ripp S, Ogunseitán OA, Miller RV (1994) Transduction of a fresh water microbial community by a new *Pseudomonas aeruginosa* generalized transducing phage, UT1. Mol Ecol 3: 121–126.

55. Pirnay JP, Bilocq F, Pot B et al. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. PLoS ONE4:e7740.
56. Kaye, S., et al. 2010. Bacterial susceptibility to topical antimicrobials and clinical outcome in bacterial keratitis. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*51:362–368.
57. Sueke, H., et al. 2010. An in vitro investigation of synergy or antagonism between antimicrobial combinations against isolates from bacterial keratitis. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*51:4151–4155.
58. Budzik J.M., Rosche W.A., Rietsch A. and O'Toole G.A. Isolation and Characterization of a Generalized Transducing Phage for *Pseudomonas aeruginosa* Strains PAO1 and PA14. (2004). *J Bacteriol* 184:3270–3273.