



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

REARREGLOS CROMOSOMALES DE *Pseudomonas aeruginosa* MEDIADOS POR EL CONTENIDO DE ISLAS GENÓMICAS

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

I.B.Q. LUIS FERNANDO ESPINOSA CAMACHO

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARIA DEL ROSARIO MORALES ESPINOSA
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR

DRA. GLORIA SOBERON CHAVEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. LUIS DAVID ALCARAZ PERAZA
FACULTAD DE CIENCIAS

CIUDAD DE MÉXICO

MARZO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A la Memoria de Teresa González
Por ser siempre la luz y el amor que guía mi camino

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme tener el privilegio de realizar mis estudios de posgrado en sus instalaciones y brindarme todas las facilidades para realizar este trabajo.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, por el apoyo y la oportunidad brinda para la realización de esta tesis.

A la Facultad de Medicina, por concederme la oportunidad de estar dentro de sus aulas y laboratorios, como alumno y profesor, aprendiendo todo lo necesario para realizar esta tesis.

Esta tesis de doctorado se realizó bajo la dirección de la Dra. María del Rosario Morales Espinosa, en el laboratorio de Genómica Bacteriana del departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina en la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Dra. Gloria Soberón Chávez y al Dr. Luis David Alcaraz Peraza, miembros de mi comité tutor, por sus valiosas contribuciones teóricas, por sus consejos experimentales y la guía para que este trabajo se pudiera finalizar.

A los miembros de mi jurado: Dr. Rigoberto Hernández Castro, Dr. Luis Servín González, Dr. Rodolfo García Contreras y Dr. José Luis Puente García, por las acertadas observaciones realizadas a este trabajo.

A los miembros del laboratorio de Genómica Bacteriana: A la Dra. Gabriela Delgado Sapién, por la dirección técnica en la realización de la parte experimental de este trabajo. Al biólogo José Luis Méndez Sánchez, por su asesoría técnica en los experimentos realizados en este estudio. A la bióloga Delia Licona Moreno por su colaboración técnica en los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana. A la Q.F.B. Francisca Trujillo Jiménez por su participación en la elaboración de técnicas de microbiología y biología molecular. A la Dra. Luisa Beatriz Sandner Miranda, por su contribución teórica en la elaboración de esta tesis.

A la Licenciatura en Neurociencias de la Facultad de Medicina, por permitirme ampliar mi visión de la ciencia y por darme el privilegio de transmitir mis conocimientos a futuras generaciones de científicos.

Este trabajo de investigación fue apoyado por la Dirección General de Apoyo al Personal Académico, UNAM proyecto PAPIIT IN212513. Durante mis estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el número 619928 para la realización de esta tesis.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
3. JUSTIFICACIÓN	7
4. OBJETIVOS	8
4.1. OBJETIVO GENERAL	8
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	8
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	9
5.1. CULTIVOS BACTERIANOS	9
5.2. AISLAMIENTO DEL DNA GENÓMICO Y SECUENCIACIÓN	9
5.3. ENSAMBLAJE Y ANOTACIÓN	10
5.4. SEROTIPIFICACIÓN <i>IN SILICO</i>	10
5.5. TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS (MLST) <i>IN SILICO</i>	11
5.6. IDENTIFICACIÓN DE ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES	11
5.7. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA	12
5.8. IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN GENES DE BOMBAS DE EFLUJO Y GENES REGULATORIOS DE BOMBAS DE EFLUJO.....	13
6. RESULTADOS.....	14
6.1. SECUENCIACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>P. aeruginosa</i>	14
6.2. SEROTIPIFICACIÓN	14
6.3. TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS (MLST).....	15
6.4. ARQUITECTURA CROMOSÓMICA DE LAS CEPAS MÉXICANAS DE <i>P. aeruginosa</i>	15
6.5. ELEMENTOS MÓVILES ENCONTRADOS EN EL CROMOSOMA DE LAS CEPAS MEXICANAS DE <i>P. aeruginosa</i>	16
6.6. ISLAS GENÓMICAS IDENTIFICADAS EN CEPAS MEXICANAS DE <i>P. aeruginosa</i>	19
6.6.1. REESTRUCTURACIÓN DE LA ISLA GENÓMICA PAGI-1.....	19
6.6.2. REESTRUCTURACIÓN DE LAS ISLAS GENÓMICAS LESGI-3, PAGI-2 y PAGI-3	25
6.6.3. REESTRUCTURACIÓN DE LA ISLA PAGI-8	29
6.6.4. NUEVAS ISLAS GENÓMICAS (PAGI-50 y PAGI-51).....	32

6.6.5.	NUEVAS ISLAS GENÓMICAS (PAGI-52 y PAGI-53).....	35
6.6.6.	INSERCIONES DE GENES EN LA ISLA PAPI-2	37
6.6.7.	INSERCIÓN DE GENES DE LA ISLA PAGI-6.....	39
6.6.8.	INSERCIÓN DE GENES EN LA ISLA PAPI-7	41
6.6.9.	ISLA LESGI-2.....	43
6.6.10.	ISLAS GENÓMICAS HÍBRIDAS ENTRE LA ISLA DE PATOGENICIDAD PAPI-1 Y EL ELEMENTO pKLC102	43
6.7.	ELEMENTOS CONJUGATIVOS INTEGRATIVOS (ICEs).....	45
6.8.	INTEGRONES	50
6.9.	ISLOTES.....	52
6.10.	ELEMENTOS DE SECUENCIAS DE INSERCIÓN	54
6.11.	REPETICIONES PALINDRÓMICAS CORTAS AGRUPADAS Y REGULARMENTE INTERESPACIADAS (CRISPR)	57
6.12.	SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS.....	60
6.13.	RELACIÓN GENÉTICA Y FENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA Y ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES	61
6.14.	MUTACIONES EN BOMBAS DE EFLUJO	63
6.14.1.	BOMBA DE EFLUJO MexAB-OprM	63
6.14.2.	BOMBA DE EFLUJO MexXY-OprM.....	76
6.15.	RELACIÓN GENÉTICA Y FENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA Y MUTACIONES EN BOMBAS DE EFLUJO	90
7.	DISCUSIÓN	91
8.	CONCLUSIONES.....	97
	REFERENCIAS	99
	ARTÍCULOS.....	113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características genómicas de seis cepas mexicanas de <i>P. aeruginosa</i>	14
Tabla 2. Elementos genéticos móviles identificados en cepas mexicanas de <i>P. aeruginosa</i>	17
Tabla 3. Perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de cepas mexicanas de <i>P. aeruginosa</i>	61
Tabla 4. Mutaciones en el gen <i>mexA</i> (nucleótidos).....	65
Tabla 5. Mutaciones en la proteína MexA (aminoácidos).....	65
Tabla 6. Mutaciones en el gen <i>mexB</i> (nucleótidos).....	67
Tabla 7. Mutaciones en la proteína MexB (aminoácidos).....	67
Tabla 8. Mutaciones en el gen <i>oprM</i> (nucleótidos).....	69
Tabla 9. Mutaciones en la proteína OprM (aminoácidos).....	69
Tabla 10. Mutaciones en el gen <i>mexR</i> (nucleótidos).....	70
Tabla 11. Mutaciones en la proteína MexR (aminoácidos).....	70
Tabla 12. Mutaciones en el gen <i>armR</i> (nucleótidos).....	71
Tabla 13. Mutaciones en la proteína ArmR (aminoácidos).....	71
Tabla 14. Mutaciones en el gen PA3720 (nucleótidos).....	72
Tabla 15. Mutaciones en la proteína PA3720 (aminoácidos).....	73
Tabla 16. Mutaciones en el gen <i>nalC</i> (nucleótidos).....	74
Tabla 17. Mutaciones en la proteína NalC (aminoácidos).....	74
Tabla 18. Mutaciones en el gen <i>nalD</i> (nucleótidos).....	75
Tabla 19. Mutaciones en el gen <i>mexX</i> (nucleótidos).....	78
Tabla 20. Mutaciones en la proteína MexX (aminoácidos).....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores de virulencia asociados a <i>P. aeruginosa</i>	2
Figura 2. Arquitectura cromosómica por los operones ribosomales de las cepas <i>P. aeruginosa</i>	16
Figura 3. Estructura de las islas genómicas en la RGP 23, adyacente al locus PA2216 en las cepas <i>P. aeruginosa</i>	24
Figura 4. Estructura de las islas genómicas en la RGP27, adyacente al locus PA2583.1 en las cepas de <i>P. aeruginosa</i> Pa58 y Pa1207.	28
Figura 5. Estructura de las islas genómicas en la RGP62, adyacente al locus PA5149.1 en las cepas de <i>P. aeruginosa</i> Pa58 y Pa1242.	31
Figura 6. Estructura de las islas genómicas en la RGP2, adyacente al locus PA0263.1 en las cepas de <i>P. aeruginosa</i> Pa58, Pa124 y Pa127.....	34
Figura 7. Estructura de la isla genómica en la RGP97 y la isla genómica localizada en la RGP102 en las cepas de <i>P. aeruginosa</i> Pa58 y Pa1242.	36
Figura 8. Estructura de las islas genómicas en la RGP7, adyacente al locus PA0976.1 en las cepas de <i>P. aeruginosa</i> Pa58, Pa124 y Pa127.....	38
Figura 9. Estructura de las islas genómicas en la RGP87, adyacente al locus PA5160.1 en las cepas de <i>P. aeruginosa</i> Pa124 y Pa127.	40
Figura 10. Estructura de las islas genómicas en la RGP88, adyacente al locus PA3961 en las cepas de <i>P. aeruginosa</i> Pa58, Pa1207 y Pa1242.....	42
Figura 11. Estructura de las islas genómicas en la RGP88, adyacente al locus PA3961 en las cepas de <i>P. aeruginosa</i> Pa58, Pa1207 y Pa1242.....	49
Figura 12. Estructura del integron clase 1 en el locus PA5548 de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> Pa124 y Pa127.	51
Figura 13. Estructura de los islotes en las cepas de <i>P. aeruginosa</i> Pa84, Pa1207 y Pa1242.	53
Figura 14. Estructura de los elementos de secuencias de inserción (IS) en las cepas de <i>P. aeruginosa</i> Pa58, Pa84, Pa1207 y Pa1242.....	56
Figura 15. Estructura de la secuencia CRISPR en la cepa de <i>P. aeruginosa</i> Pa58.....	57
Figura 16. Estructura de la primera secuencia CRISPR en la cepa Pa84 de <i>P. aeruginosa</i>	58
Figura 17. Estructura de la segunda secuencia CRISPR en la cepa Pa84 de <i>P. aeruginosa</i>	58
Figura 18. Estructura del operón CRISPR-Cas en la cepa de <i>P. aeruginosa</i> Pa84.....	59
Figura 19. Red de regulación de la bomba de eflujo MexAB-OprM en la cepa PAO1.....	64
Figura 20. Red de regulación de la bomba de eflujo MexXY en la cepa PAO1.....	76

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es un importante patógeno oportunista sobre todo en infecciones nosocomiales debido a su fácil adaptación a diferentes ambientes, esta característica es debida a la enorme diversidad genética que presenta su genoma, además, es considerado un patógeno de prioridad crítica por la alta resistencia antimicrobiana que presenta. El objetivo de este estudio fue identificar elementos genéticos móviles (especialmente islas genómicas), sus rearrreglos genéticos y el contenido de genes, además de determinar los perfiles de resistencia a 20 diferentes antimicrobianos y observar las variantes alélicas de los genes involucrados en la expresión y regulación de las bombas de eflujo MexAB-OprM y MexXY en 6 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de dos poblaciones hospitalarias en México. Las cepas presentaron una variación en el tamaño del genoma de 6.5 Mpb a 7.4 Mpb, el serotipo O3 fue el más prevalente en la población (3 cepas), mientras que, el ST309 fue el mayormente identificado (2 cepas), además, se encontró una nueva combinación de alelos en la cepa Pa84 (*acsA* 11, *aroE* 5, *guaA* 37, *mutL* 3, *nuoD* 1, *ppsA* 60 y *trpE* 182), la cual dará lugar a un ST nuevo. Con respecto al contexto genómico, 13 nuevas regiones de plasticidad genómica fueron identificadas en las cepas mexicanas, mientras que, el análisis global de los cromosomas de las 6 cepas mostró un total de 21 islas genómicas (GI's): de las cuales 7 han sido previamente reportadas y 14 son islas nuevas identificadas en nuestras cepas; además se identificaron 4 islotes nuevos; 4 elementos conjugativos integrativos (ICE's) diferentes, tres de ellos identificados en el presente estudio; 28 diferentes profagos, 9 ya descritos y 19 profagos nuevos; 7 elementos IS; 2 transposones, de los cuales 1 no ha sido previamente reportado; 2 arreglos tipo CRISPR y 1 CRISPR-Cas, además de 1 integrón clase 1. Las cepas Pa58, Pa124 y Pa127 fueron XDR, las cepas Pa58 y Pa1207 MDR y la cepa Pa1242 fue clasificada como susceptible. La resistencia identificada en las cepas fue congruente con la cantidad de genes de resistencia identificados en las cepas, siendo las cepas XDR las que presentaron el mayor número de genes de resistencia transferidos horizontalmente.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an important opportunistic pathogen especially in nosocomial infections due to its easy adaptation to different environments, this characteristic is due to the big genetic diversity that presents its genome, in addition, it is considered a pathogen of critical priority due to the high resistance. The aim of this study was to identify mobile genetic elements (especially genomic islands), their genetic rearrangements and gene content, in addition identify resistance profiles to 20 different antimicrobials and detecting allelic variants of genes involved in expression and regulation of the efflux pumps MexAB-OprM and MexXY in 6 strains of *Pseudomonas aeruginosa* of two hospital populations in Mexico. The strains indicated a variation in the genome size from 6.5 Mpb to 7.4 Mpb, the O3 serotype was the most prevalent in the population (3 strains), while the ST309 was the most identified (2 strains), in addition, it will be seen a new combination of alleles in strain Pa84 (*acsA* 11, *aroE* 5, *guaA* 37, *mutL* 3, *nuoD* 1, *ppsA* 60 and *trpE* 182), which will take place in a new ST. Regarding the genomic context, 13 new regions of genomic plasticity were identified in the Mexican strains, while the global analysis of the chromosomes of the 6 strains showed a total of 21 genomic islands: of which 7 have been previously reported and 14 they are new islands identified in our strains; In addition, 4 new islets were identified; 4 different integrative conjugative elements (ICE), three of them identified in the present study; 28 different prophages, 9 previously reported and 19 new prophages; 7 IS-elements; 2 transposons, of which 1 have not been previously reported; 2 CRISPR and 1 CRISPR-Cas arrangements, in addition to class 1 integron. Strains Pa58, Pa124 and Pa127 were XDR, strains Pa58 and Pa1207 MDR and strain Pa1242 was classified as susceptible. The resistance identified in the strains was consistent with the amount of resistance genes identified in the strains, with the XDR strains being the ones that identified the greatest number of resistance genes transferred horizontally.

1. INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa, ubicua, presente en casi cualquier ambiente tanto terrestre como acuático, esto es debido a su increíble versatilidad metabólica lo que le permite adaptarse a esta amplia gama de nichos ecológicos, como humanos, plantas, animales y el medio ambiente (Gellatly & Hancock, 2013; Pirnay et al., 2009; Silby et al., 2011).

En humanos, es uno de los principales microorganismos nosocomiales asociados a infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos (Rumbaugh, 2014), tras la instalación de catéteres urinarios y/o intravenosos, generando bacteriemias (Morales-Espinosa et al., 2017), o en pacientes con asistencia ventilatoria automática, provocando infecciones del sistema respiratorio como neumonía (Morales-Espinosa et al., 2012), además, es la principal causa de infecciones crónicas en pacientes con fibrosis quística (Bhagirath et al., 2016; Moore et al., 2011).

P. aeruginosa posee un gran número de factores de virulencia que le permiten adaptarse a muchos nichos ecológicos y establecerse ahí, explicando así su implicación en una gran variedad de infecciones (Bartell et al., 2017; Gellatly & Hancock, 2013; Hauser & Ozer, 2011). Los factores de virulencia de *P. aeruginosa* se pueden clasificar en dos grupos: los factores asociados a la bacteria (estructuras de adherencia, movilidad o proteínas inmunogénicas) y que están implicados en procesos motrices, y los factores de virulencia que son secretados (enzimas degradativas, algunas toxinas y agentes quelantes, como sideroforos), este tipo de factores son altamente regulados por procesos de censado de quorum (QS) y están implicados en destrucción del tejido del hospedero y en la evasión de la respuesta inmune. Como se observa en la figura 1.

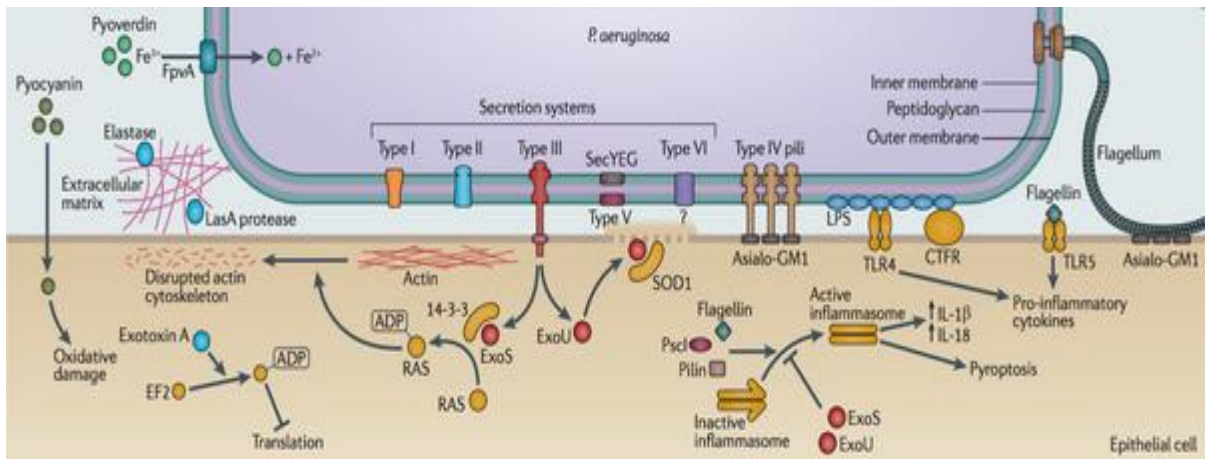


Figura 1. Factores de virulencia asociados a *P. aeruginosa*. Imagen tomada de Hauser & Ozer, 2011.

Además del grado de patogenicidad que presenta *P. aeruginosa*, otro aspecto que complica el tratamiento de las infecciones por este microorganismo es el arsenal de mecanismos de resistencia antimicrobiana que posee. Entre ellos podemos clasificarlos en: intrínsecos (ej. bombas de eflujo y porinas) e inducibles (ej. persistencia y tolerancia) y en mecanismos adquiridos mediante eventos de transferencia horizontal, como la utilización de enzimas que degradan o modifican al antibiótico (Breidenstein et al., 2011). Por lo cual, esta bacteria está clasificada dentro de los patógenos resistentes a antimicrobianos: ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* and *Enterobacter* spp., (Pendleton et al., 2013), y es considerada por la organización mundial de la salud como una prioridad crítica para investigación y desarrollo de nuevas estrategias antimicrobianas para el combate de infecciones por estos microorganismos (Khabbaz et al., 2017).

La enorme capacidad de adaptación de *P. aeruginosa* le permite pasar de organismo comensal en algunos ambientes a patógeno oportunista en otros, esto es debido principalmente por su gran y complejo genoma, a diferencia de otras bacterias el tamaño del genoma en *P. aeruginosa* no es resultado de eventos de duplicación, si no de la adquisición de nuevo material genético por eventos de transferencia horizontal. El genoma de *P. aeruginosa* tiene un tamaño entre los 5.2 Mpb y los 7.5 Mpb, y un porcentaje en promedio de guanina-citosina (G+C) de 67% (Stover et al., 2000).

A pesar de que las cepas de *P. aeruginosa* comparten características comunes, algunos aislados presentan rasgos fenotípicos específicos. La variación en el contenido genético de los genomas favorece este comportamiento, el genoma bacteriano se puede dividir en dos grandes grupos de genes: el primer conjunto de genes es más conservado entre miembros de la misma especie bacteriana independientemente de la fuente de aislamiento, y es denominado “genoma core” o “genoma central”, los genes que comprenden estas regiones son esenciales para la supervivencia de la bacteria, debido a que codifican para enzimas involucradas en procesos metabólicos primordiales, así como para mecanismos de replicación y conservación del material genético (Gil et al., 2004; Martínez-Carranza et al., 2018; Ye et al., 2013). En *P. aeruginosa* estos genes presentan solamente un 0.5%-0.7% de diversidad en su secuencia, lo que quiere decir que son altamente conservados (Cramer et al., 2011; Segerman, 2012) y representan alrededor del 88% del tamaño del genoma (Valot et al., 2015; Wolfgang et al., 2003).

Por otro lado, existen loci con un nivel alto de diversidad distribuidos alrededor del genoma, estas regiones son susceptibles a eventos de transferencia horizontal de genes (HGT, por sus siglas en inglés) entre bacterias de la misma especie o géneros completamente diferentes, e incluso entre la bacteria y su organismo hospedero (Dunning Hotopp, 2011; Heuer & Smalla, 2007; Pál et al., 2005b). Este conjunto de nuevo DNA foráneo conforma lo que se conoce como “genoma accesorio” de *P. aeruginosa* (Kung et al., 2010). Estas regiones tienen características genéticas específicas como: un contenido de G+C que difiere del que presenta normalmente el genoma de *P. aeruginosa* (66.6%), siendo más elevado o bajo (D’Argenio et al., 2003). La mayoría de los elementos móviles localizados en estas regiones son mosaicos genéticos y poseen frecuentemente genes que codifican para factores de movilización entre diferentes genomas, promoviendo así el intercambio genético e incrementando su variabilidad (Klockgether et al., 2004), estos procesos además pueden contribuir a la delección de ciertas regiones del genoma o a la generación de rearrreglos genómicos. Una última característica que permite la identificación de genes accesorios es la detección de “hotspots”, es decir, loci precisos en el “genoma core” los cuales actúan como sitios de inserción para los genes transferidos, entre los loci más

comunes se encuentran los genes de RNAt (RNA de transferencia) los cuales son blancos genéticos para la integración de elementos genéticos móviles (Mathee et al., 2008), de igual manera, las repeticiones directas o invertidas de las secuencias de inserción (IS) localizadas a lo largo del genoma favorecen la inserción de DNA exógeno (Patricia Siguier et al., 2014).

En *P. aeruginosa* se han descrito muchos elementos genéticos móviles (MGE, por sus siglas en inglés) como islas genómicas (GIs, por sus siglas en inglés), elementos conjugativos integrativos (ICE, por sus siglas en inglés), plásmidos, bacteriófagos, integrones, transposones, secuencias de inserción (Kung et al., 2010), estos elementos portan genes que confieren a *P. aeruginosa* la capacidad de adaptación a varios ambientes, incrementan su virulencia, confieren resistencia a distintos grupos de agentes antimicrobianos y permiten la utilización de diferentes sustratos como fuente de carbono y energía, incrementando la patogenicidad del microorganismo y ampliando sus nichos ecológicos (Brown et al., 2012; Jackson et al., 2012; Pál et al., 2005a).

Las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) han incrementado la información en las bases de datos permitiendo realizar análisis más detallados sobre genomas y transcriptomas de bacterias, logrando así un mejor entendimiento de la estructura, dinámica y plasticidad de los genomas bacterianos (Deurenberg et al., 2017), sin embargo, aún quedan muchas incógnitas en el estudio de los genomas bacterianos, sobre todo en aspectos cómo: la expresión y represión de genes adaptativos.

2. ANTECEDENTES

A finales de los años noventa se comenzó a trabajar sobre la estructura del genoma de *P. aeruginosa*, utilizando mapas cromosómicos generados a partir de digestiones enzimáticas del genoma completo obteniendo patrones electroforéticos en los cuales se identificaban genes marcadores a lo largo del genoma. Mediante estos estudios se demostró, primero, que el cromosoma de *P. aeruginosa* es propenso a sufrir eventos de recombinación provocando cambios en la arquitectura de su cromosoma, segundo, se propuso la existencia de 3 zonas de hipervariabilidad genética en el cromosoma, adyacentes a los genes *lipH*, *pilA* y *oprL-phnAB*, las cuales pueden sufrir ganancia o pérdida de material genético desde 1 kb hasta 300 kb (Römling et al., 1997).

Estudios posteriores documentaron que la plasticidad genética en estas zonas de hipervariabilidad es provocada por eventos de transferencia horizontal de genes (HGT) sufridos en el genoma, lo que les permite adquirir o perder material genético (Römling, D, et al., 1997; Wiedenbeck & Cohan, 2011). Estos segmentos de DNA fueron denominados elementos genéticos móviles (MGE) y en su mayoría proveen a la bacteria características adaptativas para sobrevivir a las condiciones de nicho en el que desarrollan (Kung et al., 2010; Waldor & Davis, 2014). Entre los MGE más comunes en *P. aeruginosa* se encuentran las islas genómicas (GIs), este tipo de elementos pueden poseer genes de diferentes orígenes (plásmidos, fagos, integrones, etc.) lo cual favorece la diversidad en los cromosomas (Kung et al., 2010).

Una extensa cantidad de GIs han sido descritas en *P. aeruginosa*, estas GIs han sido encontradas en algunas cepas, pero no en otras. Estudios realizados hasta la fecha han identificado y caracterizado varias islas. Entre ellas están: de PAGI-1 a PAGI-40 en cepas aisladas de diferentes fuentes y en diferentes regiones geográficas (Battle et al., 2008, 2009; Klockgether et al., 2004; Larbig et al., 2002; Liang et al., 2001; Nascimento et al., 2016; Silveira et al., 2016), a partir de un grupo clonal de cepas obtenidas de pacientes con fibrosis quística en Liverpool se reportaron las islas genómicas LESGI-1 a LESGI-5, además de 6 profagos identificados en estos genomas (Winstanley et al., 2009), por otra parte, en cepas de *P. aeruginosa* se han descrito también islas con importante participación en la

patogénesis de la bacteria como las islas de patogenicidad PAPI-1 y PAPI-2 (He et al., 2004; Morales-Espinosa et al., 2017).

En dos estudios previos, en cepas de *P. aeruginosa* de poblaciones mexicanas (adultos y niños) fueron caracterizadas varias islas genómicas (PAGI-1 a PAGI-4, PAPI-1 y PAPI-2 y el elemento conjugativo integrativo pKLC102) de acuerdo con el esquema propuesto por Morales-Espinosa et al. en 2012, donde se utilizaron genes específicos de cada una de las islas ubicados en el extremo 5', 3' y en la región media de la isla, posteriormente se identificaron genes marcadores de isla sobre el perfil electroforético por campos pulsados mediante hibridación para identificar el locus de inserción de cada una de las islas. Con respecto a esta caracterización se obtuvieron cepas que presentaron hasta 7 islas genómicas a lo largo de su genoma, demostrando que existen más regiones de hipervariabilidad en el genoma de *P. aeruginosa*. (Morales-Espinosa et al., 2012, 2017). A partir de esta caracterización las cepas que presentaron el mayor número de GIs fueron seleccionadas para este estudio.

Actualmente, con la publicación del primer genoma de *P. aeruginosa* (cepa PAO1) (Stover et al., 2000) y el posterior auge de las plataformas de secuenciación, se comenzaron a realizar estudios de genómica comparativa, donde se han identificado regiones de plasticidad genómica (RGP's) con fragmentos de DNA transferidos por eventos de HGT compartidos entre cepas aisladas de diferentes ambientes y fragmentos específicos de cepa (Battle et al., 2009; Mathee et al., 2008; Roy et al., 2010; Winstanley et al., 2009), sin embargo, muchas de estas regiones no han sido caracterizadas, por lo que se desconoce el impacto que estos fragmentos adquiridos de DNA puedan tener sobre la evolución de la patogénesis, el aumento de la resistencia a fármacos y desinfectantes, y los procesos de adaptación que pueda presentar *P. aeruginosa*.

3. JUSTIFICACIÓN

P. aeruginosa es un patógeno oportunista involucrado en el desarrollo de infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos. Es una de las causas principales de infecciones en tejido pulmonar, y es un microorganismo difícil de tratar debido a sus diversos mecanismos de resistencia a una amplia gama de agentes antibacterianos.

Actualmente, con los avances tecnológicos en genómica, transcriptómica y proteómica, un gran número de estudios están orientados a conocer el funcionamiento de la bacteria, tratando de identificar y comprender el impacto de la composición genética, específicamente aquellos genes únicos de cada cepa, sobre el genoma.

Además, se ha observado que el comportamiento de las cepas bacterianas está sometido a cambios ocasionados por presiones ejercidas por el medio ambiente en el que se desarrolla, provocando así, que la bacteria adquiera material genético que le permita sobrevivir al estrés ejercido por el medio, se han identificado fragmentos de DNA específicos de cepa o que son compartidos por grupos que se desarrollan en un mismo nicho, estos determinantes genéticos que favorecen el establecimiento, la colonización, la patogénesis y la resistencia antimicrobiana hacen que el tratamiento de infecciones provocadas por este tipo de microorganismos se vuelvan cada vez más difíciles de erradicar.

El estudio de la composición genética y la estructura cromosómica de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes mexicanos permitirá identificar, primeramente, elementos genéticos móviles específicos de nuestra región, así como genes asociados a virulencia y/o resistencia antimicrobiana; con esto se puede conocer cuál es el comportamiento de nuestras cepas y las posibles estrategias de tratamiento.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la plasticidad genómica en cepas mexicanas de *P. aeruginosa* mediada por el contenido de islas genómicas.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Secuenciar el genoma completo de seis cepas de *P. aeruginosa* asociadas a infecciones nosocomiales en pacientes adultos y pediátricos.
- Caracterizar el locus de inserción de cada una de las islas genómicas en el cromosoma de *P. aeruginosa*.
- Identificar y determinar el contenido genético de los elementos móviles de las cepas: islas genómicas, profagos, elementos conjugativos integrativos, integrones y transposones.
- Identificar genes involucrados en patogénesis y resistencia a antimicrobianos dentro de los elementos móviles presentes en los seis genomas de *P. aeruginosa*.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

5.1. CULTIVOS BACTERIANOS

Seis cepas de *P. aeruginosa* fueron seleccionadas de dos estudios previos, las cuales presentaron una frecuencia alta de islas genómicas de acuerdo con el esquema de caracterización propuesto por Morales-Espinosa *et al.*, 2012. Dos cepas (Pa58 y Pa84) fueron aisladas de secreción bronquial y dos cepas (Pa124 y Pa127) fueron aisladas de sangre, las cuatro cepas fueron aisladas de adultos con neumonía asociada a ventilador automático admitidos en la unidad de cuidados intensivos del Hospital de Alta Especialidad del Centro Médico Nacional Siglo XXI de la ciudad de México (Morales-Espinosa *et al.*, 2012). Otras dos cepas (Pa1207 y Pa1242) fueron aisladas de sangre de pacientes infantiles que presentaron una enfermedad subyacente como malformación de Chiari, y posteriormente desarrollaron neutropenia y bacteriemia durante su estancia hospitalaria (Morales-Espinosa *et al.*, 2017), estos pacientes fueron admitidos en el Hospital Pediátrico del Centro Médico Nacional Siglo XXI de la Ciudad de México.

Las siguientes cepas fueron utilizadas como controles positivos para la realización de los análisis genómicos: la cepa de *P. aeruginosa* PA14, la cual fue aislada de una quemadura (Berkeley, California, U.S.A.) (D. G. Lee *et al.*, 2006); Las cepas C y SG17M, aisladas de un paciente con fibrosis quística en Hanover, Alemania y de un río de Mulheim Alemania, respectivamente (Romling *et al.*, 1994; Römling *et al.*, 1997). La cepa *P. aeruginosa* PAO1, la cual es un aislado de herida (Melbourne, Australia; Holloway, 1955) (D. G. Lee *et al.*, 2006). Todas las cepas fueron identificadas como *P. aeruginosa* mediante pruebas bioquímicas clásicas y la prueba API 20NE (Biomeriux®). Todas las cepas fueron conservadas en glicerol al 15% a -70 °C.

5.2. AISLAMIENTO DEL DNA GENÓMICO Y SECUENCIACIÓN

El DNA genómico fue obtenido a partir de cultivos bacterianos de cada una de las cepas de estudio, incubados por 16 horas, la extracción del DNA fue realizada utilizando el kit de extracción DNeasy blood and Tissue Kit® de QIAGEN®. Todos los DNA's fueron ajustados a una concentración final de 100 ng/μl a 260/280 nm, utilizando el equipo Tecan

Genios[®], para ser enviados a secuenciar. La secuenciación fue realizada en el Centro de Análisis Genómico de la Universidad de Yale (YCGA, por sus siglas en inglés) utilizando la tecnología PacBio RS II single-molecule real-time (SMRT). Una biblioteca de fragmentos de 20-Kb fue preparada y secuenciada en cuatro celdas de SMRT con el sistema de unión P4 y una química de C2.

5.3. ENSAMBLAJE Y ANOTACIÓN

Las lecturas largas obtenidas de la secuenciación fueron utilizadas como semillas para el ensamblado de las lecturas más cortas, generando de 1 a 17 contigs dependiendo de la cepa, finalmente se ensambló el genoma completo a partir de los contigs obtenidos utilizando el protocolo HGAP/Quiver (Chin et al., 2013) en el portal SMRT v.3, el ensamble final tuvo una cobertura desde 83X hasta 181X dependiendo de la cepa. La anotación de los seis genomas fue realizada primero de manera automática utilizando el software de anotación del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI; Prokaryotic Genome Annotation Pipeline; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/) versión 4.2. Posteriormente, la anotación fue curada de manera automática utilizando la plataforma de Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local (BLASTx) y de manera manual tomando como molde las cepas de referencia PA14 y PAO1, para identificar genes de interés (ej. genes de virulencia y resistencia a antimicrobianos). La secuencia de todos los genomas fue depositada en la base de datos GenBank de NCBI bajo los siguientes números de acceso: Pa58 ([CP021775](#)), Pa84 ([CP021999](#)), Pa124 ([CP021774](#)), Pa127 ([CP022000](#)), Pa1207 ([CP022001](#)) y Pa1242 ([CP022002](#)) (Espinosa-Camacho et al., 2017a; Espinosa-Camacho et al., 2017b). Las cepas PAO1 y PA14 fueron utilizadas como genomas de referencia tanto para el ensamblaje como para la anotación de los seis genomas.

5.4. SEROTIPIFICACIÓN *IN SILICO*

La caracterización fenotípica del antígeno O de *P. aeruginosa* fue realizada *in silico* utilizando el programa PAST 1.0, el cual determina *in silico* la serotipificación de aislados de *P. aeruginosa* dentro de los serogrupos 1 al 11 (cubriendo los 20 serotipos conocidos) basado en un análisis por BLAST del grupo de genes involucrados en la biosíntesis del

antígeno O (Thrane et al., 2015). Este programa se encuentra disponible en la plataforma del Centro de Epidemiología Genómica (GCE; <https://cge.cbs.dtu.dk/services/>).

5.5. TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS (MLST) *IN SILICO*

La tipificación de secuencias multilocus (MLST) se realizó *in silico* utilizando el servidor MLST 1.8 server (Larsen et al., 2012) que utiliza el esquema para *P. aeruginosa* (<http://pubmlst.org/paeruginosa>), el cual comprende siete genes de metabolismo básico en el genoma de *P. aeruginosa*: *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nouD*, *ppsA* y *trpE* (Curran et al., 2004). Este programa se encuentra disponible en la plataforma del Centro de Epidemiología Genómica (GCE; <https://cge.cbs.dtu.dk/services/>).

5.6. IDENTIFICACIÓN DE ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES

Se identificaron los MGE como GIs, ICEs, Profagos, Integrones, Transposones y Secuencias de Inserción, así como genes asociados a la virulencia y resistencia a antimicrobianos en las seis cepas de *P. aeruginosa*. Las GIs y los ICEs fueron identificados con el programa IslandViewer3, el cual utiliza tres programas de predicción de GIs (IslandPath-DIMOB, SIGI-HMM, y IslandPick) (Dhillon et al., 2015). Las secuencias de las GIs previamente reportadas (PAGI-1 ([AF241171](#)), PAGI-2 ([AF440523](#)), PAGI-3 ([AF440524](#)), PAGI-4 ([AY258138](#)), PAPI-1 ([AY273869](#)), PAPI-2 ([AY273870](#)) y el elemento pKLC102 ([NC_019202](#))) fueron utilizadas como molde para localizar regiones homologas en nuestros genomas usando los programa Mauve v20150226 (Darling et al., 2010) y Artemis v16.0.0 (Rutherford et al., 2000). Los profagos se identificaron con el programa PHAST (Zhou et al., 2011), los integrones utilizando la base de datos INTEGRALL (Moura et al., 2009) , mientras que, para las secuencias de inserción se utilizó el programa Isfinder (P. Siguier, 2006), con el cual, también se buscó la presencia de transposones; todos los elementos móviles fueron curados manualmente utilizando versiones locales de BLASTn, BLASTp y BLASTx y los siguientes criterios de exclusión para eliminar falsos positivos: 1. Poseer un contenido diferente de G+C al del cromosoma, 2. Estar insertados adyacentes a genes de tRNA y/o a una integrasa, o presentar secuencias directas repetidas o invertidas, 3. Poseer genes de virulencia, resistencia a antimicrobianos o genes adaptativos. Para la identificación de

elementos genéticos móviles nuevos, estos no debían presentar homología con otro MGE o el porcentaje de identidad debía ser menor al 50% para poder hablar de un rearrreglo genético del MGE, mientras que, para la identificación de las regiones de plasticidad genómica nuevas, los locus identificados no debían estar reportados en ningún otro genoma de la especie *P. aeruginosa*. Los genes de virulencia se identificaron utilizando la base de datos Virulence Factor DataBase (VFDB) (B. Liu et al., 2019) y los genes de resistencia a antimicrobianos con la base de datos de resistencia a antibióticos: CARD (Jia et al., 2017).

5.7. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Se determinaron los perfiles de susceptibilidad de las seis cepas secuenciadas contra 20 antimicrobianos de uso clínico por el método de dilución en agar de acuerdo con los lineamientos establecidos por el Clinical and Laboratory Estándar Institute (CLSI, 2018). Las cepas de *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 fueron usadas como controles para validar el ensayo de susceptibilidad. Los antimicrobianos probados fueron carbenicilina (4-16 µg/ml), ticarcilina (4-16 µg/ml), piperacilina (1-4 µg/ml), ticarcilina/ácido clavulánico (4/2-16/2 µg/ml), piperacilina/tazobactam (1/4-4/4 µg/ml), ceftazidima (0.06-.25 µg/ml), ceftriaxona (0.03-0.12 µg/ml), cefotaxima (0.03-0.12 µg/ml), cefepima (0.015-0.12 µg/ml), imipenem (0.06-0.25 µg/ml), meropenem (0.008-0.06 µg/ml), aztreonam (0.06-0.25 µg/ml), amikacina (0.5-4 µg/ml), gentamicina (0.25-1 µg/ml), tobramicina (0.25-1 µg/ml), polimixina B (0.25-2 µg/ml), ciprofloxacina (0.004-0.015 µg/ml), lomefloxacino (1-4 µg/ml), norfloxacina (0.03-0.12 µg/ml), levofloxacina (0.008-0.06 µg/ml). Las diluciones se prepararon en un rango de 0.125 a 256 µg/ml de concentración para cada antimicrobiano en medio Müller-Hinton. Las placas de agar Müller-Hinton con las diferentes concentraciones de antimicrobiano se inocularon con 10 µl del inóculo estandarizado (10^8 bacterias/mL) de cada una de las cepas utilizando un robot Virtek ChipWriter®. Las placas inoculadas fueron incubadas a 37 °C durante 16 a 24 horas. Posteriormente, la lectura de las placas fue realizada. La cepa fue susceptible a un

antimicrobiano cuando se observó una inhibición del crecimiento por debajo o dentro del punto de corte establecido por el CLSI. La resistencia intermedia se determinó cuando hubo crecimiento por arriba del punto de corte, pero inhibición del desarrollo a una concentración mayor. Las cepas fueron resistentes cuando se observó crecimiento por arriba del punto de corte.

5.8. IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN GENES DE BOMBAS DE EFLUJO Y GENES REGULATORIOS DE BOMBAS DE EFLUJO.

A partir de los genomas de *P. aeruginosa* se extrajeron las secuencias de los genes involucrados en la formación de las bombas de eflujo MexAB-OprM (*mexA*, *mexB* y *oprM*) y MexXY-OprM (*mexX* y *mexY*), así como los genes involucrados en la cascada de regulación de las bombas MexAB-OprM (*mexR*, *armR*, PA3720, *nalC* y *nalD*) y MexXY-OprM (*mexZ*, PA5471, PA5470, *parR* y *parS*). Se realizó un alineamiento de cada uno de los genes anteriormente mencionados utilizando el software MegAlign y el algoritmo computacional ClustalW para identificar los posibles polimorfismos de nucleótido único (SNPs) entre las cepas de *P. aeruginosa* en estudio. La secuencia de la cepa de referencia PAO1 fue utilizada como control.

6. RESULTADOS

6.1. SECUENCIACIÓN DE LAS CEPAS DE *P. aeruginosa*

El análisis de las secuencias de 6 cepas mexicanas de *P. aeruginosa* mostró un tamaño de genoma entre 6.5 Mpb y 7.4 Mpb, con un contenido de G+C promedio de 65.86% (tabla 1).

Tabla 1. Características genómicas de seis cepas mexicanas de *P. aeruginosa*.

Cepa	Tamaño del Genoma	Total de Genes	CDS	rRNAs	tRNAs	ncRNAs	Pseudo genes	Arreglos CRISPR	% GC
Pa58	7,241,575 pb	7,006	6,683	4	63	4	244	1	65.80
Pa84	6,566,724 pb	6,282	6,063	4	63	5	139	2	66.23
Pa124	7,008,516 pb	6,696	6,486	4	63	4	131	0	65.84
Pa127	7,148,302 pb	6,856	6,572	4	63	4	205	0	65.74
Pa1207	7,411,863 pb	7,153	6,825	4	65	4	247	0	65.73
Pa1242	7,050,510 pb	6,735	6,308	4	65	4	346	0	65.83

Las cepas Pa58, Pa84, Pa124 y Pa127 fueron aisladas de adultos que desarrollaron neumonía asociadas a respirador automático (Morales-Espinosa et al., 2012), mientras que, las cepas Pa1207 y Pa1242 fueron aisladas de sangre de niños que desarrollaron neutropenia y posteriormente bacteriemia secundaria a neumonía adquirida en la comunidad y enfermedad de Chiari, respectivamente (Morales-Espinosa et al., 2017).

Las secuencias de los genomas de las cepas de *P. aeruginosa* se depositaron en la base de datos del GenBank (NCBI) con los siguientes números de acceso: Pa58 ([CP021775](#)), Pa84 ([CP021999](#)), Pa124 ([CP021774](#)), Pa127 ([CP022000](#)), Pa1207 ([CP022001](#)) y Pa1242 ([CP022002](#)); (Espinosa-Camacho et al., 2017a; Espinosa-Camacho et al., 2017b).

6.2. SEROTIPIFICACIÓN

El análisis *in silico* del cluster de genes *ihfB/himD* y *wbpM* (Thrane et al., 2015) que codifican para la generación del antígeno O específico en *P. aeruginosa* mostró 4 diferentes serotipos, el serotipo O11 fue el más frecuente en 3 cepas (Pa58, Pa124 y Pa127), la cepa Pa84 presentó el serotipo O4, la cepa Pa1207 el serotipo O6 y la cepa Pa1242 presentó el serotipo O2.

6.3. TIPIFICACIÓN DE SECUENCIAS MULTILOCUS (MLST)

La tipificación de la secuencia multilocus (MLST) mostró que dos cepas (Pa124 y Pa127) son del tipo de secuencia ST309, de acuerdo con un estudio realizado por Morales-Espinosa *et al.*, en el 2017, las clonas que presentan este ST309 pueden ser consideradas como clonas potenciales de alto riesgo, ya que presentan características genéticas y fenotípicas de las clonas de alto riesgo como: la presencia de elementos móviles que favorecen la diseminación y el intercambio de material genético, son cepas con un perfil fenotípico multidrogo-resistencia, presentan genes de virulencia y han sido identificadas en otras regiones del mundo, pudiendo llegar a convertirse en un problema de salud pública a nivel hospitalario. La cepa Pa58 presentó el ST308, la cepa Pa1207 fue ST155 y la cepa Pa1242 presentó un ST277, este tipo de ST277 ha sido identificado en cepas epidémicas en hospitales de Brasil con un perfil de multidrogo resistencia y una rápida diseminación (Silveira *et al.*, 2016). La cepa Pa84 presentó una nueva combinación de alelos (*acsA* 11, *aroE* 5, *guaA* 37, *mutL* 3, *nuoD* 1, *ppsA* 60 y *trpE* 182), la cual aún no se le ha asignado un ST por la base de datos de MLST para *P. aeruginosa* (Jolley *et al.*, 2018).

6.4. ARQUITECTURA CROMOSÓMICA DE LAS CEPAS MÉXICANAS DE *P. aeruginosa*

La arquitectura cromosómica de nuestras cepas de *P. aeruginosa* se determinó utilizando la arquitectura de las cepas PAO1 y PA14 como referencia (Fig. 2A y 2B). Observamos que las cepas de pacientes adultos mostraban el mismo reordenamiento cromosómico y una sintenia similar a la cepa PA14 (Fig. 2B), la cual presenta una inversión cromosómica por recombinación homóloga entre los extremos 3' de los operones *rrnA* y *rrnB* con respecto a la cepa PAO1. Por otro lado, las cepas aisladas de niños (Pa1207 y Pa1242) mostraron dos posibles eventos de recombinación e inversión consecutivos. El primer evento ocurrió entre los operones *rrnA* y *rrnD*, formando dos operones híbridos: *rrnA/D* 5'→3' y *rrnD/A* 5'→3' y consecuentemente una gran inversión del segmento de DNA ubicado entre los operones *rrnA* y *rrnD*. Posteriormente, el segundo evento de recombinación ocurrió entre el operón *rrnB* y el operón híbrido *rrnD/A* 5'→3', formando dos nuevos operones híbridos: *rrnB/A* y *rrnD/B* (Fig. 2C). Este último evento llevó a cabo una nueva inversión del DNA, recuperando la sintenia cromosómica y el reordenamiento

de un gran segmento de DNA ubicado entre los loci *birA* y *dnaE*, en relación con el cromosoma de la cepa PAO1 (Fig. 2C). La repetición de este comportamiento en nuestras cepas indicó que no ocurren de manera aleatoria y probablemente confieren ventajas adaptativas para establecerse en el ambiente anfitrión.

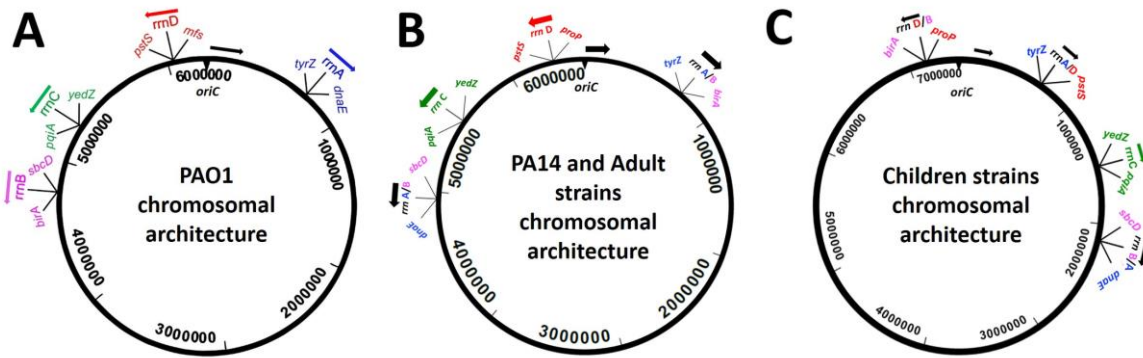


Figura 2. Arquitectura cromosómica dada por los operones ribosomales de las cepas de referencia: (A) PAO1, (B) PA14 y (C) la nueva disposición identificada en cepas de *P. aeruginosa* aisladas de niños. Las flechas representan la dirección de transcripción de los operones.

6.5. ELEMENTOS MÓVILES ENCONTRADOS EN EL CROMOSOMA DE LAS CEPAS MEXICANAS DE *P. aeruginosa*

El análisis global de los cromosomas de las 6 cepas mostró un total de 21 islas genómicas (GIs): de las cuales 7 han sido previamente reportadas y 14 son islas nuevas identificadas en nuestras cepas; además se identificaron 4 islotes nuevos; 4 elementos conjugativos integrativos (ICEs) diferentes, tres de ellos identificados en el presente estudio; 28 diferentes profagos, 9 ya descritos y 19 profagos nuevos; 7 elementos IS; 2 transposones, de los cuales 1 no han sido previamente reportados; 2 arreglos tipo CRISPR y 1 CRISPR-Cas, además de 1 integrón clase 1 (tabla 2).

Previamente, un total de 89 regiones de plasticidad genómica (RGPs, por sus siglas en inglés) se han descrito a lo largo del cromosoma de *P. aeruginosa* (Klockgether et al., 2011). Además, nosotros identificamos un total de 13 nuevas RGPs en diferentes loci del cromosoma de nuestras cepas (tabla 2).

Tabla 2. Elementos genéticos móviles identificados en cepas mexicanas de *P. aeruginosa*.

Locus	RGP	Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
PA0263.1	2	PAGI-50		PAGI-51	PAGI-51		
PA0613	3	LES-Prophage1 ^a	LES-Prophage1 ^a	LES-Prophage1 ^a	LES-Prophage1 ^a	LES-Prophage1 ^a	LES-Prophage1 ^a
PA0729.1	5	PAGI-15 like ^a	PAGI-15 like ^a			Prophage-Mx9	Prophage-Mx10
PA0818	6	Prophage-Mx7	Prophage-Mx8	Phage CF79 like ^a	Phage CF79 like ^a	Islet-Mx2	Phage CF79 like ^a
PA0976.1	7	ExoU-C like		ExoU-D	ExoU-D		
PA1191	10			LES-Prophage6 ^a	LES-Prophage6 ^a		
PA1243	12	CRISPR-Cas array					
PA1796.3	17	Phage F116 like ^a				Prophage-Mx6	Prophage-Mx6
PA1964	19		Phage YMC ^a	Prophage-Mx16			
PA2035	20					IS-Mx7	
PA2216	23	PAGI-41	PAGI-1 ^a	PAGI-42	PAGI-43	PAGI-44	PAGI-45
PA2571	26	ICEPa-Mx3		ICEPa-Mx3	ICEPa-Mx3		
PA2583.1	27	PAGI-46				PAGI-47	
PA2736.1	28	IS-Mx1	Islet-Mx1	Transposon-Mx1	Transposon-Mx1		
PA3536	35	Prophage-Mx1	Prophage-Mx1				
PA3768	36		Prophage-Mx13	Prophage-Mx14	Prophage-Mx15	Islet-Mx3	
PA4541.1	41	pKLC102 like ^a	pKLC102 like ^a			pKLC102 like ^a	pKLC102 like ^a
PA4673.1	42	Prophage-Mx11				Prophage-Mx12	
PA1934	52					IS-Mx6	Islet-Mx4
PA2793	56	Prophage-Mx2		Prophage-Mx3	Prophage-Mx3	Prophage-Mx4	Prophage-Mx5
PA5149.1	62	PAGI-48					PAGI-49
PA0068	63			Prophage-Mx17	Prophage-Mx17		
PA2581.1	72	Phage BR153 like ^a					
PA1579	75			p34998-293.973kb like ^a	p34998-293.973kb like ^a		
PA5290	79			Prophage-Mx18	Prophage-Mx18	Prophage-Mx19	
PA2593	85					LESGI-2 ^a	
PA5160.1	87			PAGI-6 like ^a	PAGI-6 like ^a		

PA3960	88	PAGI-7 like ^a		PAGI-7 like ^a	PAGI-7 like ^a
PA0609	90 ^b	ICEPa-Mx1			
PA5530	91 ^b			ICEPa-Mx2	
PA3057	92 ^b	p34998-293.973kb like ^a			
PA3655	93 ^b			p34998-293.973kb like ^a	
PA2749	94 ^b	Tn6162 like ^a		Tn6162 like ^a	
PA0804	95 ^b			ICEPa-Mx3	
PA2250	96 ^b	IS-Mx2			
PA1155	97 ^b	PAGI-52			
PA4584	98 ^b	Phage JBD67 like ^a			
PA0004	99 ^b		IS-Mx3	IS-Mx4	IS-Mx5
PA3452	100 ^b		Phage JBD30 like ^a		
PA2283	101 ^b		Phage CF5 like ^a	Phage CF5 like ^a	
PA5548	102 ^b		Class 1 integron ^a	Class 1 integron ^a	PAGI-53

La primera columna muestra los loci de inserción de cada uno de los elementos genéticos móviles (MGE) identificados en nuestras cepas con respecto a los loci de la cepa de referencia PAO1; la segunda columna muestra las regiones de plasticidad genómica (RGP) en el cromosoma (RGP-2 a -102), utilizando un número progresivo de acuerdo con la nomenclatura establecida por Klockgether et al., 2011. El acrónimo MX hace referencia a nuevos MGE encontrados en nuestras cepas de *P. aeruginosa*.

^a MGE parcial o completo previamente descrito en otras cepas.

^b Nuevas regiones de plasticidad genómica identificadas en nuestras cepas de *P. aeruginosa*.

6.6. ISLAS GENÓMICAS IDENTIFICADAS EN CEPAS MEXICANAS DE *P. aeruginosa*.

Las islas genómicas (PAGI) nuevas, fueron asignadas con números arábigos progresivos, a partir de la última isla identificada hasta el momento de escribir esta tesis y respetando la nomenclatura asignada por los diferentes autores (Battle et al., 2008, 2009; Klockgether et al., 2004; Larbig et al., 2002; Liang et al., 2001; Nascimento et al., 2016; Silveira et al., 2016).

6.6.1. REESTRUCTURACIÓN DE LA ISLA GENÓMICA PAGI-1

La isla genómica PAGI-1 fue descrita en la cepa X24509, la cual fue aislada de un paciente con infección de vías urinarias en Estados Unidos de Norteamérica, esta isla esta insertada adyacente al locus PA2216 (gen *gguc*) de la región de plasticidad genómica 2 (RGP-2) (Klockgether et al., 2011); esta isla está formada por 51 ORFs y se le atribuyen funciones de evasión de la respuesta inmune y desintoxicación de especies reactivas de oxígeno (Liang et al., 2001). Por otro lado, en la cepa LESB58 (una clona epidémica de Liverpool), se describió la isla LESGI-4 que es idéntica a PAGI-1 (Winstanley et al., 2009).

Con relación a nuestras cepas, solo la cepa Pa84 presenta la isla PAGI-1 con un 99% de identidad e insertada en el mismo locus (PA2216). En el resto de nuestras cepas (cepas Pa58, Pa124, Pa127, Pa1207 y Pa1242) en el locus PA2216 se identificó un MGE de diferente tamaño y composición genética para cada una de las cepas. Sin embargo, este elemento genético en todas las cepas presentó los 30 primeros ORFs de la isla PAGI-1 y el resto de los ORFs de cada MGE fue muy variable, formando diferentes mosaicos genéticos de diferente origen (figura 3, tabla 2).

Por ejemplo, en la cepa Pa58, nosotros nombramos a este nuevo elemento PAGI-41 [nomenclatura asignada, según se va caracterizando (Battle et al., 2008, 2009; Klockgether et al., 2004; Larbig et al., 2002; Liang et al., 2001; Nascimento et al., 2016; Silveira et al., 2016)], el cual presentó un tamaño de 184,009 pb, con un contenido de G+C de 59.49%, y un total de 214 ORFs; el 43% de los genes identificados codifican para proteínas de función hipotética, en esta cepa se encuentran presentes los primeros 32 ORFs de PAGI-1, con un 100% de identidad (Liang et al., 2001), conservando entre ellos los genes *pqiA* y *pqiB* que codifican para proteínas implicadas en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno;

siete diferentes deshidrogenasas de la familia acyl-CoA, y alcohol deshidrogenasas involucradas en diferentes procesos metabólicos, como degradación de ácidos grasos; el gen *fadE36* que codifica para una aminoglucósido transferasa reportada en cepas de *Mycobacterium tuberculosis*; el ORF23 que codifica para la transposasa *ISPa1635* de la familia IS4 flanqueada por sus respectivas secuencias repetidas invertidas. En los nuevos ORFs (del ORF48 al ORF96) que forman este nuevo elemento se encuentran los genes asociados a plásmidos descritos en otros géneros bacterianos: con un 98% de identidad con el elemento pGES5 de *Aeromonas hydrophila* y un 96% con el elemento pSDENCHOLpb de *Sterolibacterium denitrificans*, identificándose los genes *oriT*, *repA*, *parA* y *parC* necesarios para la replicación, así como, genes necesarios para la transferencia del elemento móvil (*mobC*) y presentando un sistema de restricción y modificación tipo II conformado por una metiltransferasa y una endonucleasa (Paer71), esta última involucrada en la defensa contra infecciones virales. A partir del ORF72 y hasta el ORF91 se identificó un integrón clase 1, el cual confiere resistencia a diferentes grupos de antimicrobianos, ya que posee el gene *aac(6')-II* que codifica para una aminoglucósido N-acetiltransferasa; un gen (*bla_{GES-1}*) que codifica para una beta-lactamasa (GES-1) de espectro extendido clase A; en el extremo 3' del integrón clase 1 está presente el sistema *tniR/QBA* asociado a la transposición de un genoma a otro; además en este integrón se encuentra el transposón TnPa38 (ORF76 al ORF84), con una secuencia de inserción *ISPa38* de la familia Tn3 en su extremo 5', el transposón TnPa38 ha sido reportado en la cepa de *P. aeruginosa* DK2, el cual está compuesto por 8 ORF's: 3 son proteínas hipotéticas, una DNA invertasa, una nucleotidiltransferasa, un proteína con dominio cupin asociado a modificaciones en carbohidratos de la pared de diferentes bacterias y la transposasa *ISPa38* encargada de la movilización del elemento. Este integrón clase 1, también posee dos transposasas TnAs3 de la familia Tn3, lo que podría favorecer el intercambio de material genético de este elemento, confiriendo resistencia a antimicrobianos a las bacterias receptoras de la misma especie u otros géneros. La isla PAGI-41 presenta una duplicación de ORFs que corresponde del ORF122 al ORF132, repitiéndose en sintenia del ORF133 al ORF143 que en su mayoría corresponden a proteínas hipotéticas, aunque, dentro de esta zona de duplicación los

ORF124 y ORF130 codifican para dos proteínas asociadas a bacteriófagos, lo cual supone que esta duplicación es debida a eventos separados de infección por el mismo fago. Del ORF 144 al ORF 164 se identificó el transposón Tn4652, el cual tiene 100% de identidad con el transposón identificado en p12936-OXA de *P. aeruginosa* y otros plásmidos de diferentes géneros como: pLTGPAF-6F de *Klebsiella* sp.; pLM16A1 de *Achromobacter* sp; y el pRMAN01 de *Ralstonia menitolilytica*, además en el transposón Tn4652 se observó un operón de resistencia a mercurio; una bomba de eflujo muy similar a las pertenecientes a la familia Czc, relacionada con la expulsión de metales pesados como cobalto, zinc y cadmio; dos proteínas asociadas a cointegración (TnpS y TnpT) características de la familia de transposones Tn3, las cuales son de origen plasmídico; además, una serie de proteínas hipotéticas y una transposasa ISPa38 de la familia Tn3, la cual le puede estar proporcionando la movilidad al transposón Tn4652 entre diferentes especies bacterianas. Adyacente al transposón Tn4652 se encontró la secuencia de inserción (ISPa42), la cual porta un operón que codifica para los componentes que conforman una bomba de eflujo de la familia RND, posiblemente involucrada en el transporte de metales pesados. Del ORF 173 al ORF 201 de la isla PAGI-41 se encontró el transposón TnPa42 de la familia Tn3 que porta un sistema de resistencia a cobre identificado en diferentes cepas del género *Pseudomonas*, el transposón TnPa42 también presentó las proteínas TnpS y TnpT asociadas a la cointegración de los transposones, sin embargo, llama la atención que TnPa42 no presenta un elemento de movilidad como una resolvasa y/o transposasa. Finalmente, el extremo 3' de la isla PAGI-41 está conformado por varios ORFs que codifican para proteínas hipotéticas, en esta región se identificó una secuencia de inserción simple de la familia IS4 (ISPa1635). Con la inserción de la isla PAGI-41, hubo una delección de 11 ORFs cromosómicos (del locus PA2218 al PA2228) en la cepa Pa58, con relación al cromosoma de la cepa PAO1, aunque esta delección también es observada en la cepa X24509 con la inserción de la isla PAGI-1 (Liang et al., 2001) (figura 3 y tabla suplementaria S1).

En la cepa Pa124 se identificó un elemento genético al cual nombramos isla genómica PAGI-42, insertada en el locus PA2216, esta isla presentó un tamaño de 190,735 pb y un contenido de G+C de 59.39%. PAGI-42 está conformada por 200 ORFs, de los cuales

los primeros 31 ORFs presentan una identidad del 100% con la isla genómica PAGI-1, a partir del ORF32, se identificaron dos transposasas ISPa32 de la familia IS3, una región de 64 ORFs que en su mayoría codifican para proteínas hipotéticas, con algunos productos relacionados a proteínas de fagos (fago MD8 en el género *Pseudomonas*). En esta isla PAGI-42, se identificó un ORF que codifica para el transposón Tn4652 (resistencia a mercurio), el cuál esta interrumpido por un fragmento de DNA que corresponde a 22 ORFs (ORF107 al ORF128), los cuales codifican para un sistema de transporte a metales como el fierro, incluidos un sideróforo para su captación; para dos sistemas de eflujo de la familia RND; para transportadores tipo ABC, posiblemente involucrados en el transporte de metales; para un sistema de transporte de oligopéptidos; para una transposasa ISPa95 de la familia IS5 con una delección en su extremo 3'; para un componente del sistema de secreción tipo II (*exeA*), el cual posee actividad de ATPase necesaria para la unión a peptidoglicano, al correcto plegamiento y funcionamiento de los canales de transporte. Este Tn4652 está asociado a una transposasa ISAzs36 de la familia IS481 reportada en el plásmido pAB510f de la cepa *azospirillum* sp. B510. Por último, hacia el extremo 3' de la isla PAGI-42 se identifica el transposón TnPa42 (ORF129-ORF157) de resistencia a cobre identificado en la isla PAGI-41 de la cepa Pa58. (figura 3 y tabla S1).

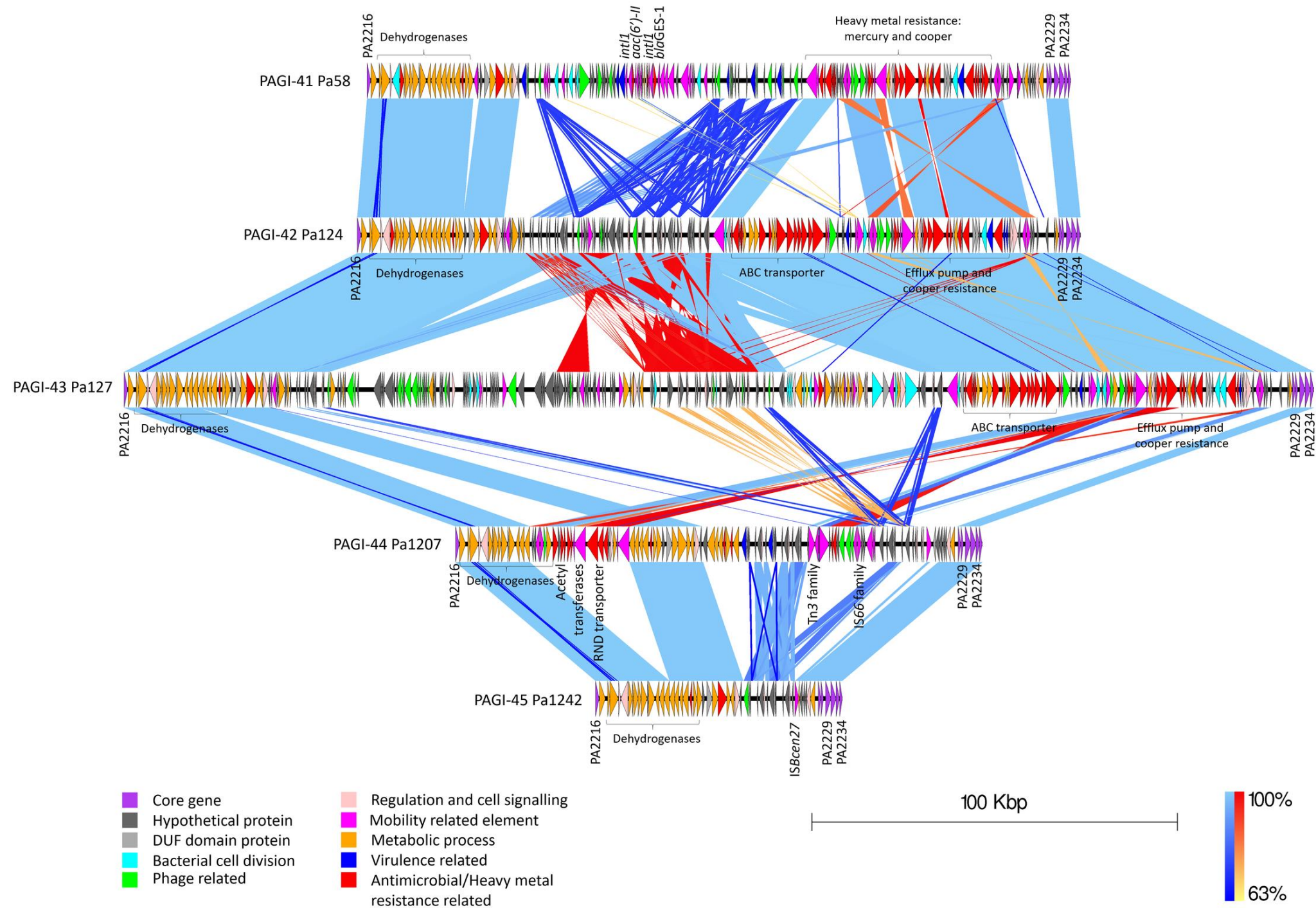
En la cepa Pa127 se identificó una isla de gran tamaño, insertada en el locus PA2216 y denominada isla genómica PAGI-43. Esta isla fue el elemento genético más grande, con un tamaño de 323,244 pb, un contenido de G+C de 58.95% y 304 ORFs. El 43% de los ORFs identificados corresponden a proteínas hipotéticas. Esta isla presenta los primeros 30 ORFs homólogos a PAGI-1, del ORF232 al ORF304 son homólogos con las islas PAGI-41 y PAGI-42, que comprenden los operones de resistencia a metales pesados como mercurio y cobre. Sin embargo, la isla PAGI-43 presenta regiones específicas de la isla (del ORF31 al ORF 231), formando un nuevo mosaico genético en la región media de la isla, donde se identificó la presencia de un profago críptico que comparte el extremo 5' con el profago MD8 reportado en *Pseudomonas* y el extremo 3' con el profago Tyrion NC_031077 reportado en *Enterobacter*, este profago tiene un tamaño de 119 ORFs, donde alrededor del 80% de los genes que lo conforman codifican para proteínas con función hipotética y el 20% restantes

para componentes estructurales del fago, como proteínas de la cola y de la cápside, además, de genes asociados a la replicación del fago como una DNA polimerasa y algunas enzimas terminasas. Adyacente a este profago se identificaron una serie de genes que codifican para helicasas, como el sistema RuvABC encargado de resolver la estructura de Holliday durante el proceso de recombinación homóloga en una amplia gama de bacterias, también para múltiples copias de proteínas sintetasas asociadas para RNAt, como aquellas encargadas de unir a los aminoácidos: aspartato, prolina y glicina, siendo de las sintetasas menos comunes en ciertos genomas bacterianos. (figura 2 y tabla S1).

En relación con las cepas de niños, en la cepa Pa1207 se determinó la isla genómica PAGI-44, insertada también en el locus PA2216, esta isla presentó un tamaño de 136,419 pb, con un porcentaje de G+C de 58.51% y 108 ORFs, el 44% de los ORFs que la componen codifican para proteínas con función hipotética, esta isla al igual que en las cepas anteriores conserva los primeros 30 ORFs de PAGI-1, sin embargo, entre el ORF15 y el ORF16 se encuentra la inserción del transposón TnPa42. El TnPa42 presenta los genes para la resolvasa y transposasa ISPa42, este transposón no está presente en la isla PAGI-41 de la cepa Pa58. La mayoría de los ORFs identificados, posteriores a los ORFs homólogos con PAGI-1, fueron ORFs que codifican para proteínas hipotéticas, además, se identificó una serie de secuencias de inserción en tándem, dos de ellas la ISPa42 de la familia Tn3; ISPsy29 de la familia IS3; y las secuencias de inserción ISPpu19 y ISPsy43 de la familia IS66, estas secuencias de inserción deben estar participando en aumentar la variabilidad genética en esta región, incorporando o removiendo material genético, también se identificaron ORFs que codifican para proteínas asociadas a cointegración (TnpS y TnpT) (figura 3 y tabla S1).

Finalmente, se identificó la isla genómica PAGI-45 en la cepa Pa1242, insertada en el locus PA2216, la cual presentó un tamaño de 59,880 pb, con un porcentaje de G+C de 60.31% y un total de 45 ORFs. Al igual que en las cepas anteriores de *P. aeruginosa*, esta isla conservó los primeros 30 ORFs de PAGI-1, el resto de los ORFs identificados codifican para proteínas con función hipotética, solamente se identificó la secuencia de inserción ISBcen27 de la familia ISNY (figura 3 y tabla S1).

Figura 3. Estructura de las islas genómicas localizadas en la RGP 23, adyacente al locus PA2216 en las cepas mexicanas de *P. aeruginosa*.



En esta figura se puede observar la variación entre las islas genómicas insertadas adyacente al locus PA2216. Las franjas de azul cielo a azul marino muestran la homología directa entre los distintos segmentos de los MGES, mientras que, las franjas de rojo a amarillo muestran la homología entre segmentos que presentan una inversión en la secuencia de los MGES. Los diferentes ORFs que conforman a los MGES están clasificados por colores de acuerdo con su función.

6.6.2. RESTRUCTURACIÓN DE LAS ISLAS GENÓMICAS LESGI-3, PAGI-2 y PAGI-3

Las islas PAGI-2 y PAGI-3 fueron previamente identificadas e insertadas en el locus PA2819.1 del cromosoma de la cepa C (aislada de un paciente con fibrosis quística) y en el locus PA2819.2 del cromosoma de la cepa SG17M (aislada de agua del río en la ciudad de Mulheim, Alemania) respectivamente (Larbig et al., 2002). Ambas cepas pertenecen a la clona C de un grupo de cepas caracterizadas en Alemania (Romling et al., 1994). La isla PAGI-2 presenta un tamaño de 104,955 pb, un contenido de G+C de 64.7% y está compuesta por 113 ORFs, mientras que, la isla PAGI-3 presenta un tamaño de 103,304 pb, un contenido de G+C de 59.2% y está compuesta de 105 ORFs, PAGI-3 tiene 60% de identidad con la isla PAGI-2. La isla LESGI-3, fue reportada en la cepa epidémica de Liverpool LESB58, insertada en el locus PA2583.1 (Winstanley et al., 2009), esta isla presenta un tamaño de 110, 571 pb, un contenido de G+C de 64.46% y está compuesta de 107 ORFs, LESGI-3 presenta un 79% de identidad con la isla PAGI-2 y 54% de identidad con la isla PAGI-3.

En las cepas Pa58 y Pa1207 se encontró una isla diferente en cada cepa, las cuales fueron asignadas como PAGI-46 y PAGI-47 respectivamente, estas islas en ambas cepas están insertadas en el locus PA2583.1 en la región de plasticidad genómica 27 (RGP-27) adyacente a un RNAt-Gly (PA2583.1). ambas islas comparten fragmentos con las islas PAGI-2, PAGI-3 y LESGI-3.

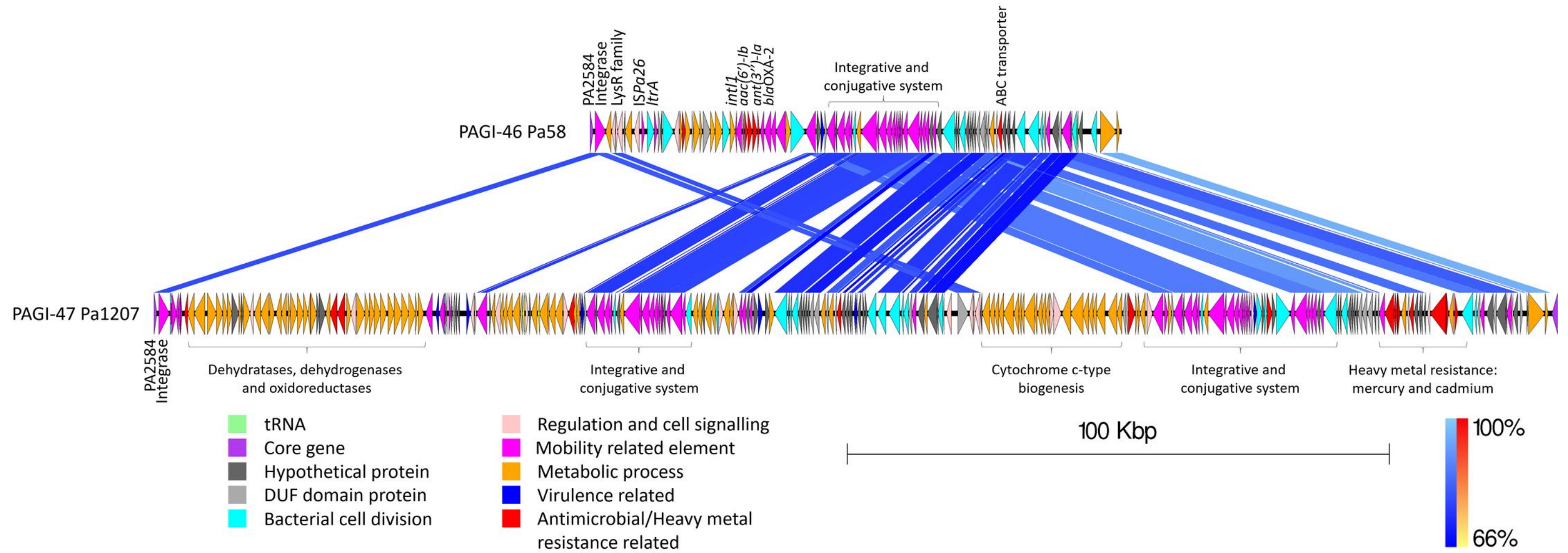
La isla genómica identificada en la cepa Pa58 se le asignó el nombre PAGI-46, con un tamaño de 93,010 pb, un contenido de G+C de 62.77% y 101 ORFs anotados. El extremo 3' de esta isla (del ORF41 hasta el ORF101) presenta homología con las islas PAGI-2, PAGI-3 (del ORF44 al ORF120) y LESGI-3 (del ORF46 al ORF107), compartiendo con las tres islas un sistema de conjugación e integración, tres genes que codifican para metiltransferasas y un sistema de transportadores tipo ABC. El extremo 5' de la isla PAGI-46 es el que presenta una composición genética nueva, conformada por 40 ORFs, esta región comparte una homología del 75% con una región del cromosoma de la cepa A05 de *Burkholderia lata* y un 71% con una parte del cromosoma de la cepa F709 de *Bordetella bronchiseptica*, ambas especies asociadas a infecciones oportunistas en pacientes inmunocomprometidos confinados en unidades de cuidados intensivos (Clements et al., 2018; Leong et al., 2018; Parcell et al., 2018). Entre los genes más relevantes en la región 5' se encontró la presencia de una peroxidasa, el gen *ltrA* que

codifica para un grupo de movilidad intrón II (targetrons) que puede realizar inserciones programadas de DNA con alta frecuencia y especificidad, el gen *ltrA* que puede incrementar la inserción de nuevo material genético (LaRoche-Johnston et al., 2018), otorgando mayor variabilidad a esta región de la isla, es muy probable que el gen *ltrA* haya sido transferido por la transposasa *ISPa26* de la familia IS5 ya que se encuentra flanqueado por dos transposasas de esta familia. Además, se identificó en esta isla un integrón clase 1, este integrón ha sido reportado en diferentes cepas de la familia Enterobacteriaceae y en el género *Pseudomonas* (Deng et al., 2015), el integrón clase 1 posee cuatro genes asociados a resistencia antimicrobiana: dos que confieren resistencia a aminoglucósidos (*aacA4* y *aadA1*), una β -lactamasa OXA-2 que confiere resistencia de espectro extendido a todos los miembros del grupo de las cefalosporinas y baja actividad a carbapenémicos (imipenem) y el gen *qacG2* que confiere resistencia a compuestos cuaternarios de amonio que se encuentran en muchos agentes antisépticos y desinfectantes de uso en hospitales. En el extremo 3' del integrón clase 1 se identificó el módulo *tniQBA*, asociado a muchos transposones, este módulo está encargado de la transposición del integrón (Deng et al., 2015) (figura 4 y tabla S1).

En la cepa Pa1207 se identificó la isla genómica asignada como PAGI-47, con un tamaño de 251,827 pb, un contenido de G+C del 63.13% y 278 ORFs anotados. Esta isla está compuesta hacia su extremo 3' (ORF165 al ORF278) por 113 ORFs que corresponden a la isla PAGI-2 completa, hacia el extremo 5' (del ORF1 al ORF164) no hay identidad con algún elemento hasta ahora reportado, dentro de esta región se identificaron dos transposasas de la familia IS3 (*ISPsy37* [ORF2 y ORF3] e *IS222* [ORF4]) y una transposasa de la familia *IS110* [ORF5], además se identificaron duplicaciones de ORFs que codifican para acyl-CoA dehydrogenase y acetyl-CoA hydrolase [ORF7 al ORF10], ambos productos están involucrados en varios procesos metabólicos principalmente en la degradación de ácidos grasos de cadena larga (Guzik et al., 2014). Del ORF35 al ORF42 se identificó el operón *MmsAB* el cual está involucrado en el metabolismo de la valina/Isoleucina (Steele et al., 1992). En general la región 5' de la isla se puede asociar con funciones metabólicas, del ORF47 al ORF60 se identificaron vestigios de un transposón de la familia Tn3 con una identidad del 65%, otras transposasas presentes fueron *ISAli6* y *ISPsy37* de la familia IS256 e IS3 respectivamente, así como, el gen *tnpT* que codifica para un componente de cointegración y una relaxasa,

el resto de los ORFs codifican para proteínas de función hipotética. Además, se identificó el gen *bacA* (ORF64) que codifica para la biosíntesis de una bacitracina, la cual actúa como un agente antibiótico principalmente contra microorganismos Gram positivos (Konz et al., 1997), el operon VapBC fue identificado entre el ORF82 y el ORF83, el cual codifica para un sistema toxina-antitoxina del tipo II, descrito por primera vez en la cepa G19 de *Salmonella dublin* (Pullinger & Lax, 1992), además, identificaron genes (ORF84 al ORF100) que codifican para proteínas (TraG y TraD) asociadas a un sistema de conjugación e integración (Zatyka, 2002). Finalmente, la región media de la isla presenta del ORF133 al ORF158 genes que codifican para proteínas con función hipotética (figura 4 y tabla S1).

Figura 4. Estructura de las islas genómicas localizadas en la RGP27, adyacente al locus PA2583.1 en las cepas de *P. aeruginosa* Pa58 y Pa1207.



En esta figura se puede observar la variación entre las islas genómicas insertadas adyacente al locus PA2583.1. Las franjas de azul cielo a azul marino muestran la homología directa entre los distintos segmentos de los MGES. Los diferentes ORFs que conforman a los MGES están clasificados por colores de acuerdo con su función.

6.6.3. RESTRUCTURACIÓN DE LA ISLA PAGI-8

La isla PAGI-8 fue descrita en la cepa PSE09 de *P. aeruginosa*, esta isla tiene un tamaño de 16,195 pb, un contenido de G+C de 54.1% y 12 ORFs anotados, se encuentra insertada adyacente a un RNAt^{Phe} en el locus PA5149.1. Esta isla codifica para un componente del sistema de secreción tipo IV, una ATPasa, un regulador transcripcional de unión a zinc, dos secuencias de inserción del grupo IS407, además de algunas proteínas hipotéticas (Battle et al., 2009).

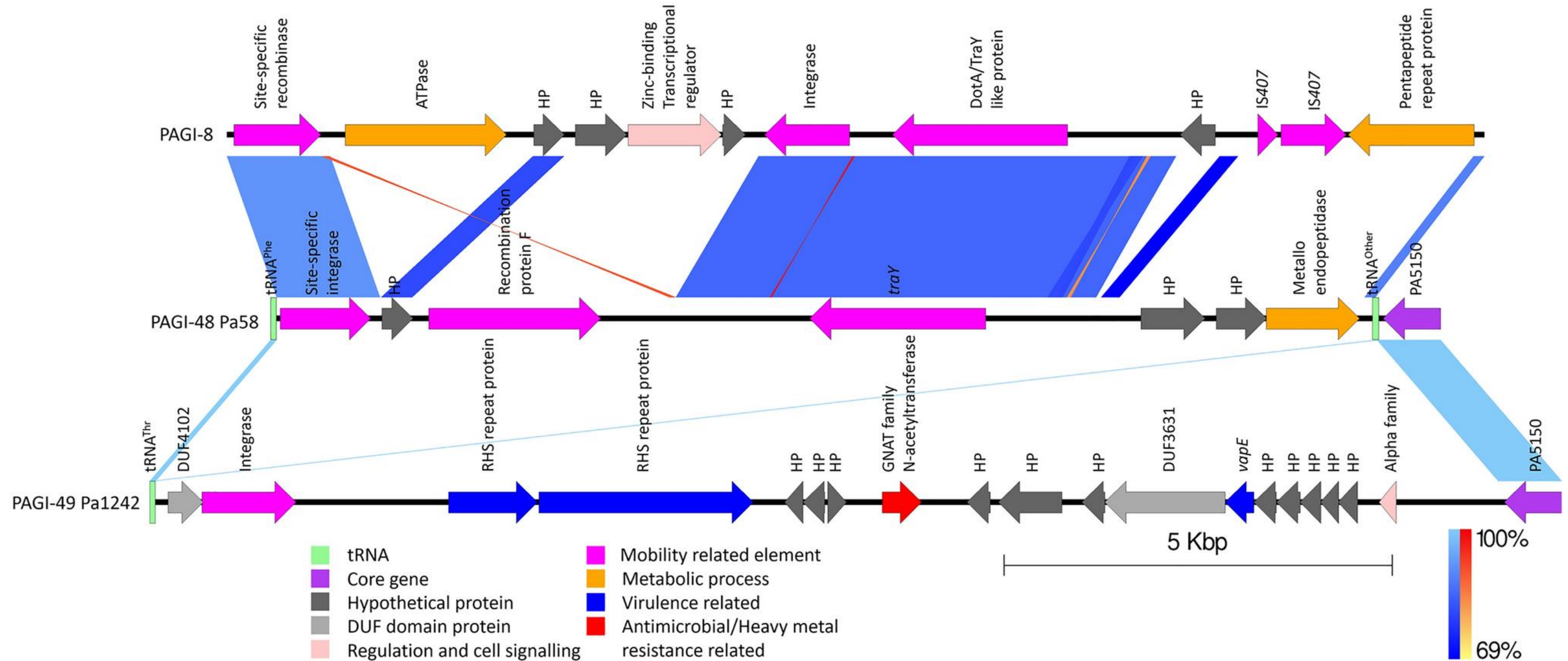
En la cepa Pa58 se identificó una GI insertada adyacente al locus PA5149.1 en la región de plasticidad 62 (RGP62), la cual se nombró PAGI-48, presenta el 48% de identidad con la isla genómica PAGI-8, con un tamaño de 13,902 pb, un contenido de G+C de 54.21% y con 8 ORF anotados, comparte con la isla PAGI-8 el ORF 1 y el ORF2 que codifican para una integrasa asociada a fagos y una proteína hipotética, respectivamente, también comparte el ORF4 que codifica para una proteína de transferencia conjugal de la familia TraY/DotA. En esta cepa se identificaron 5 nuevos ORFs: 2 de ellos codifican para proteínas hipotéticas (ORF 5 y ORF 6), el ORF 3 que codifica para una proteína de recombinación, el ORF 7 que codifica para una metalo peptidasa de la familia LmmA/IrrE y el ORF8 que codifica para un RNAt para un aminoácido no especificado (figura 5 y tabla S1).

En la cepa Pa1242 se identificó una GI insertada también adyacente al locus PA5149.1 (RGP62), sin embargo, no comparte homología con la isla PAGI-8 a pesar de compartir el mismo locus de inserción. Tampoco comparte homología con ningún otro elemento móvil reportado hasta el momento. Esta isla se nombró como PAGI-49, tiene un tamaño de 16,831 pb, tiene un contenido de G+C de 60.88% y presentó 19 ORFs. En la isla PAGI-49, 14 de los 19 ORFs fueron proteínas con función hipotética (74%), el ORF2 codifica para una integrasa asociada a fago la cual podría estar involucrada en la integración de la isla. Los ORFs 3 y 4 codifican para proteínas de la familia RHS, esta familia pertenece a la categoría de toxinas polimórficas de las exotoxinas bacterianas (Jamet & Nassif, 2015), este tipo de toxinas presentan actividad contra células fagocíticas (Kung et al., 2012) y también se ha demostrado su papel en la competencia inter-bacteriana contra cepas de *E. coli*

(Koskiniemi et al., 2013; Ma et al., 2017). El ORF8 codifica para una N-acetiltransferasa de la familia GNAT, esta familia presenta un dominio de transferencia de grupos acetilo asociado con resistencia a aminoglucósidos (Favrot et al., 2016). El ORF13 codifica para una proteína asociada a virulencia VapE, el mecanismo de acción de esta proteína no está definido aún, sin embargo, se ha reportado su presencia en cepa virulentas y su ausencia en cepas no virulentas, esto hace que se asocie con cepas altamente patogénicas. Finalmente, el ORF19 codifica para un regulador transcripcional de la familia Alfa (figura 5 y tabla S1).

En el resto de las cepas (Pa84, Pa124, Pa127 y Pa1207) no se localizaron vestigios de PAgI-8 a lo largo de sus genomas.

Figura 5. Estructura de las islas genómicas localizadas en la RGP62, adyacente al locus PA5149.1 en las cepas de *P. aeruginosa* Pa58 y Pa1242.



En esta figura se puede observar la variación entre las islas genómicas insertadas adyacente al locus PA5149.1. Las franjas de azul cielo a azul marino muestran la homología directa entre los distintos segmentos de los MGES, mientras que, las franjas de rojo a amarillo muestran la homología entre segmentos que presentan una inversión en la secuencia de los MGEs. Los diferentes ORFs que conforman a los MGES están clasificados por colores de acuerdo con su función.

6.6.4. NUEVAS ISLAS GENÓMICAS (PAGI-50 y PAGI-51)

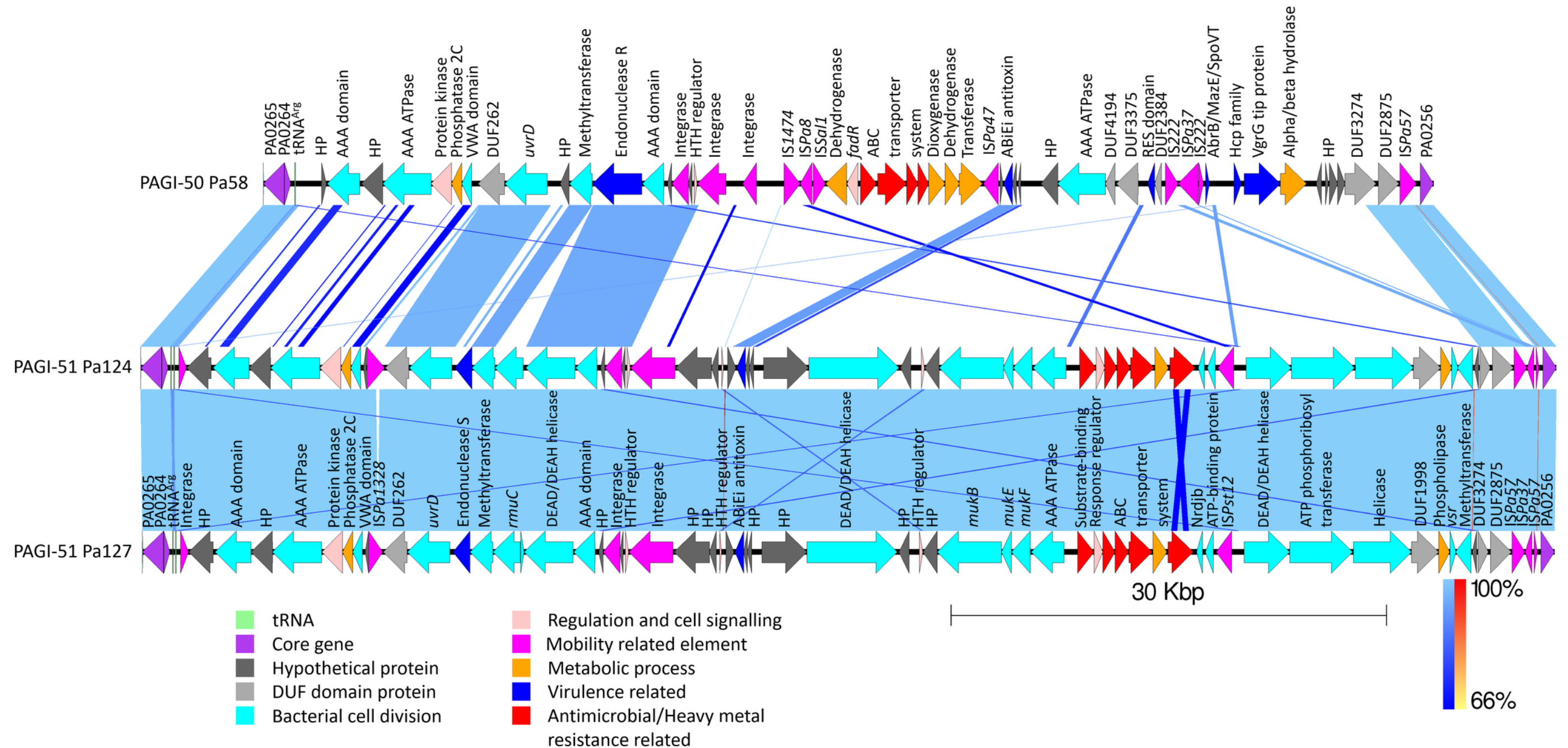
En las cepas Pa58, Pa124 y Pa127 se identificó una GI no reportada hasta el momento, esta isla se encontró insertada en el locus PA0263.1 en la región de plasticidad 2 (RGP2), a pesar de que en esta región de plasticidad se ha descrito la inserción fragmentos de DNA no caracterizados en las cepas de referencia: PAO1, PA14, LESB58 y PA7 (Mathee et al., 2008), las islas identificadas en nuestras cepas no presentan homología con estas regiones previamente descritas.

En la cepa Pa58 se identificó una isla insertada adyacente a un RNAt^{-Arg} en el locus PA0263.1, esta isla tiene un tamaño de 77,291 pb, un contenido de G+C de 57.41% y con 56 ORFs anotados. Esta isla se nombró como PAGI-50, en esta isla el 52% de los ORFs codifican para proteínas con función hipotética, tanto en el extremo 5' como en el extremo 3'. En esta isla se identificaron 7 transposasas a lo largo de la isla. En el ORF1 se identificó la transposasa *ISPa57* de la familia IS3, del ORF8 al ORF10 se encontraron tres componentes del sistema de secreción tipo IV; en el ORF13 y el ORF14 se identificaron las transposasas *ISPa37* de la familia IS30 e IS222 de la familia IS3, respectivamente, seguido a estas transposasas se encontraron 10 ORFs que codifican para proteínas con función hipotética (ORF15-ORF24); en el ORF25 se identificó la transposasa *ISPa47* de la familia IS630; del ORF 26 al ORF34 se encontró un operón que codifica para un sistema de transporte tipo ABC, este sistema se ha descrito en cepas de la especie *Salmonella typhimurim* y está involucrado en el transporte de algunos aminoácidos; el ORF35 al ORF37 se identificaron tres transposasas: *ISSa1* de la familia IS66, *ISPa8* de la familia IS5/IS118 e *IS1474* de la familia IS21, respectivamente; en el ORF40 se encontró un regulador transcripcional de la familia XRE relacionado al bacteriófago λ , esta familia de reguladores poseen un dominio de unión a DNA y actúan como represores en el bacteriófago para detener el estado lítico (Schubert et al., 2007). En el ORF42 se encontró una integrasa asociada a fagos. Del ORF44 al ORF47 se identificó un sistema de restricción modificación, compuesto por una ATPasa, la endonucleasa Eco571, tanto la subunidad R como la subunidad S y una metiltransferasa (Eco571), este sistema ha sido reportado en muchas bacterias e interesantemente previene la infección por bacteriófagos destruyendo el DNA foráneo (Vasu & Nagaraja, 2013). Finalmente, en el

extremo 3' de la isla se encontró el gen *terY*, que codifica para una proteína de resistencia a telurito (figura 6 y Tabla S1).

En las cepas Pa124 y Pa127 se identificó una GI con un porcentaje de identidad del 99% entre ellas y con un porcentaje de identidad del 64% con respecto a la isla encontrada en la cepa Pa58. Esta isla esta insertada adyacente a un RNAt^{Arg} en el locus PA0263.1 en ambas cepas. Esta isla fue nombrada como PAGI-51. En la cepa Pa124 la isla tiene un tamaño de 94,087 pb, un porcentaje de G+C de 59.65% y con 61 ORFs, mientras que, en la cepa Pa127 la isla tiene un tamaño de 93,829 pb, tiene un contenido de G+C de 59.63% y presenta 61 ORFs. Ambas Islas comparten los mismos ORFs. El extremo 3' (del ORF34 al ORF61) de la isla PAGI-51 es homologo con el extremo 3' de la isla PAGI-50, además los primeros dos ORFs en ambas islas son iguales, estos ORFs codifican para la transposasas *ISPa57* y una proteína hipotética. En la isla PAGI-51 se identificó un sistema de transporte del tipo ABC del ORF10 al ORF23, este sistema es diferente al encontrado en la isla PAGI-50, ya que además de ser utilizados para el transporte de algunos péptidos y aminoácidos, este sistema le confiere la capacidad a la bacteria de desintoxicarse de compuesto sulfurados. En la isla PAGI-51 se encontró del ORF25 al ORF27 el complejo MukBEF de condensinas reportado en *E. coli* que tienen un papel muy importante en la organización y la segregación del cromosoma (Yamazoe et al., 1999). Esta isla comparte con la isla PAGI-50 el sistema de restricción modificación ((Kedzierska & Hayes, 2016)571) y el gen de resistencia a telurito (figura 6 y tabla S1).

Figura 6. Estructura de las islas genómicas localizadas en la RGP2, adyacente al locus PA0263.1 en las cepas de *P. aeruginosa* Pa58, Pa124 y Pa127.



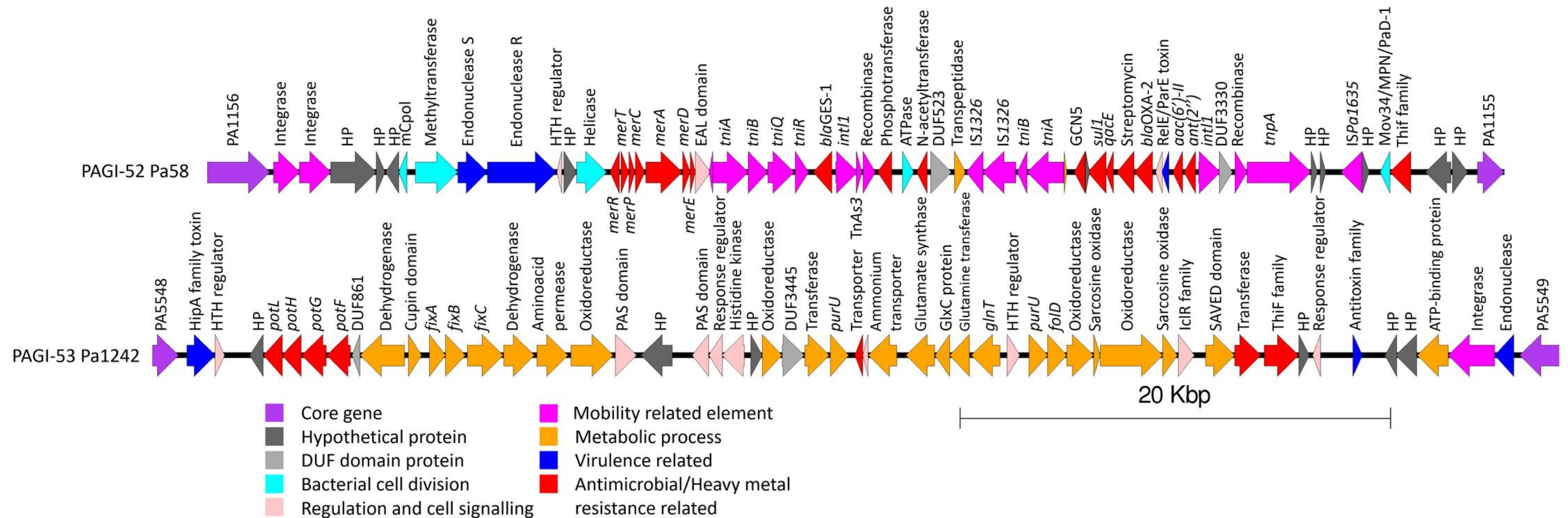
En esta figura se puede observar la variación entre las islas genómicas insertadas adyacente al locus PA0263.1. Las franjas de azul cielo a azul marino muestran la homología directa entre los distintos segmentos de los MGES, mientras que, las franjas de rojo a amarillo muestran la homología entre segmentos que presentan una inversión en la secuencia de los MGES. Los diferentes ORFs que conforman a los MGES están clasificados por colores de acuerdo con su función.

6.6.5. NUEVAS ISLAS GENÓMICAS (PAGI-52 y PAGI-53)

En la cepa Pa58 identificamos una nueva isla flanqueada por los loci PA1156 y PA1155 en un nuevo RGP (RGP97). Este elemento tiene 61 ORF y algunos de ellos son determinantes de resistencia antimicrobiana y metales pesados, además, de genes asociados con la movilidad. En el extremo 5' de la isla (ORF1 y ORF2) encontramos una integrasa de sitio específico; un sistema de restricción y modificación compuesto por una endonucleasa y una metiltransferasa, la endonucleasa formada por las subunidades R y S (ORF8 y ORF9) como las reportadas en PAGI-50; del ORF13 al ORF20 se encuentra un operón de resistencia a mercurio (*merE*, *merD*, *merA*, *merC*, *merP*, *merT* y *merR*) relacionado con el transposón TnAs3 (ORF22 al ORF25). Además, presenta dos integrasas del integron clase 1 (ORF27 y ORF50), el primer integron solo contiene el gen *bla_{GES-1}* que confiere resistencia a antibióticos beta-lactámicos, mientras que, el segundo integron presenta tres genes de resistencia a aminoglucósidos [*ant(2'')*], *aac(6')*-II y una streptomycin adeniltransferasa], un sistema toxina-antitoxina tipo II, una oxacilina beta-lactamasa clase D (OXA-2), el gen *qacE* delta1 que confiere resistencia a compuestos cuaternarios de amonio y el gen *sul1* que confiere resistencia a sulfonamidas. Además, esta isla tiene las secuencias de inserción: IS1326 (ORF35 y ORF36) e ISPa1635 (ORF56), las cuales podrían incrementar la plasticidad y el intercambio genético de este elemento (figura 7 y tabla S1).

En la cepa Pa1242 una nueva isla genómica fue identificada entre los locus PA5548 y PA5549 en una nueva RGP (RGP102), denominada PAGI-53. Este elemento contiene 52 ORFs y posiblemente representa una isla metabólica, debido a que posee ciertas enzimas involucradas en reacciones de deshidrogenación y oxido-reducción para compuestos como: FAD o sarcosina, además, esta isla presenta un sistema de transporte tipo ABC para poliaminas (ORF4-ORF7); un complejo de flavoproteínas para la transferencia de electrones (ORF11-ORF13) el cual ha sido reportado en bacterias anaerobias capaces de degradar tolueno (Vogt et al., 2019); esta isla también presenta dos módulos toxina-antitoxina, uno de ellos de la familia HigBA (ORF1-ORF2) (Kedzierska & Hayes, 2016; Y. Liu et al., 2020); finalmente, en el extremo 3' de la isla fue encontrada una integrasa de sitio específico (ORF51) (figura 7 y tabla S1).

Figura 7. Estructura de la isla genómica localizada en la RGP97, adyacente al locus PA1155 y la isla genómica localizada en la RGP102, adyacente al locus PA5548 en las cepas de *P. aeruginosa* Pa58 y Pa1242, respectivamente.



En esta figura se pueden observar las islas genómicas insertadas adyacente al locus PA115 y PA5548. Los diferentes ORFs que conforman a los MGEs están clasificados por colores de acuerdo con su función.

6.6.6. INSERCIONES DE GENES EN LA ISLA PAPI-2

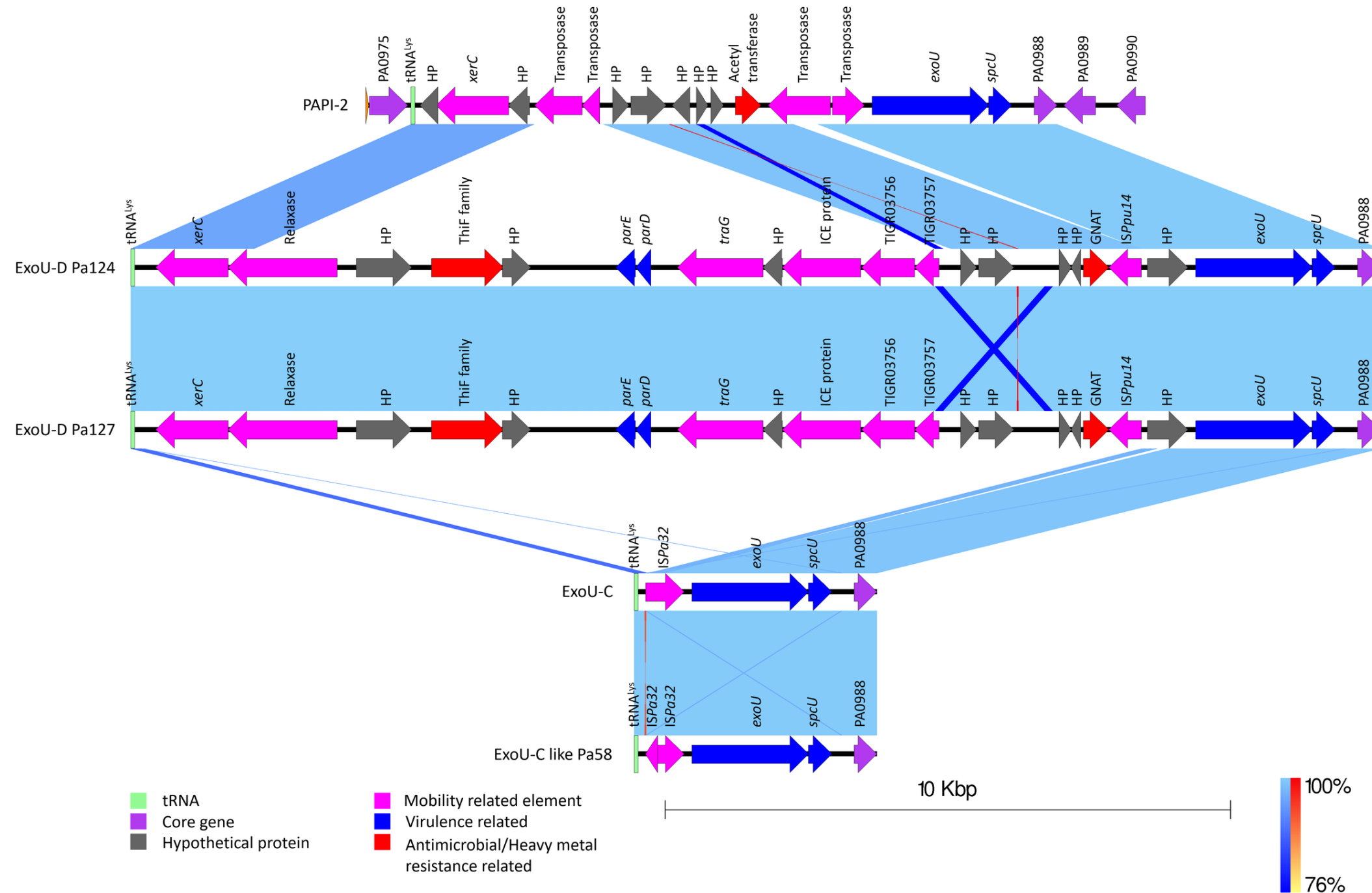
La isla PAPI-2 fue previamente identificada en la cepa de referencia PA14 insertada adyacente a un RNAt^{Lys} en el locus PA0976.1. La isla PAPI-2 presenta un tamaño de 10,722 pb, presenta un contenido de G+C de 56.4% y está compuesta por 17 ORFs (He et al., 2004). En este locus también se han reportado las islas ExoU tipo A, B y C, estas islas son híbridos de la isla PAPI-2, conservando el gen *exoU* (Kulasekara et al., 2006).

En tres cepas se identificó una GI insertada adyacente al locus PA0976.1 en la región de plasticidad genómica 7 (RGP7).

En la cepa Pa58 se identificó una isla que presentó homología con el extremo 3' de la isla de patogenicidad PAPI-2 (últimos 4 ORFs), además, presentó todos los ORF de la isla ExoU C, por lo que llamamos a este elemento híbrido, ExoU C-like, con un tamaño de 3,298 pb, un porcentaje de G+C de 58.43% y 4 ORFs anotados, esta isla conserva el gen *exoU*, el cual codifica para una citotoxina con actividad de fosfolipasa, y el gen *spcU*, el producto de este gen actúa como una chaperona para el transporte de la citotoxina, estos dos genes son primordiales para conferirle la característica de patogenicidad a la isla genómica, además, posee dos transposasas IS*Pa32* de la familia IS3 trunca en el extremo 5' de la isla que muy probablemente están involucradas en su movilización (Figura 8 y tabla S1).

En las cepas Pa124 y Pa127, se identificó una GI de 24 ORFs, insertada en el locus PA0976.1, la cual se denominó isla ExoU D. Este elemento estaba estrechamente relacionado con la isla PAPI-2 y las islas ExoU. La isla ExoU D tiene un 83% de homología con PAPI-2, pero tiene una delección de los ORFs 5, 4 y 12, que corresponden a las transposasas. Sin embargo, conservaba los genes *exoU* y *spcU*, lo que le otorgaba la propiedad de ser un elemento de patogenicidad. Esta isla comparte nueve ORF (ORF6 a ORF14) con la isla ExoU A, que corresponden a un sistema de toxina-antitoxina de la familia RelE/ParE y parte de un sistema de conjugación de tipo Tra. Además, comparte con la isla ExoU B, una proteína de formación de enlaces disulfuro (ORF16) y una N-acetiltransferasa (ORF17). La isla ExoU D tiene un conjunto de proteínas hipotéticas (ORF3-ORF5) y una transposasa de la familia IS66 (ORF18) (Figura 8 y Tabla S1).

Figura 8. Estructura de las islas genómicas localizadas en la RGP7, adyacente al locus PA0976.1 en las cepas de *P. aeruginosa* Pa58, Pa124 y Pa127.



En esta figura se puede observar la variación entre las islas genómicas insertadas adyacente al locus PA0976.1. Las franjas de azul cielo a azul marino muestran la homología directa entre los distintos segmentos de los MGES, mientras que, las franjas de rojo a amarillo muestran la homología entre segmentos que presentan una inversión en la secuencia de los MGEs. Los diferentes ORFs que conforman a los MGEs están clasificados por colores de acuerdo con su función.

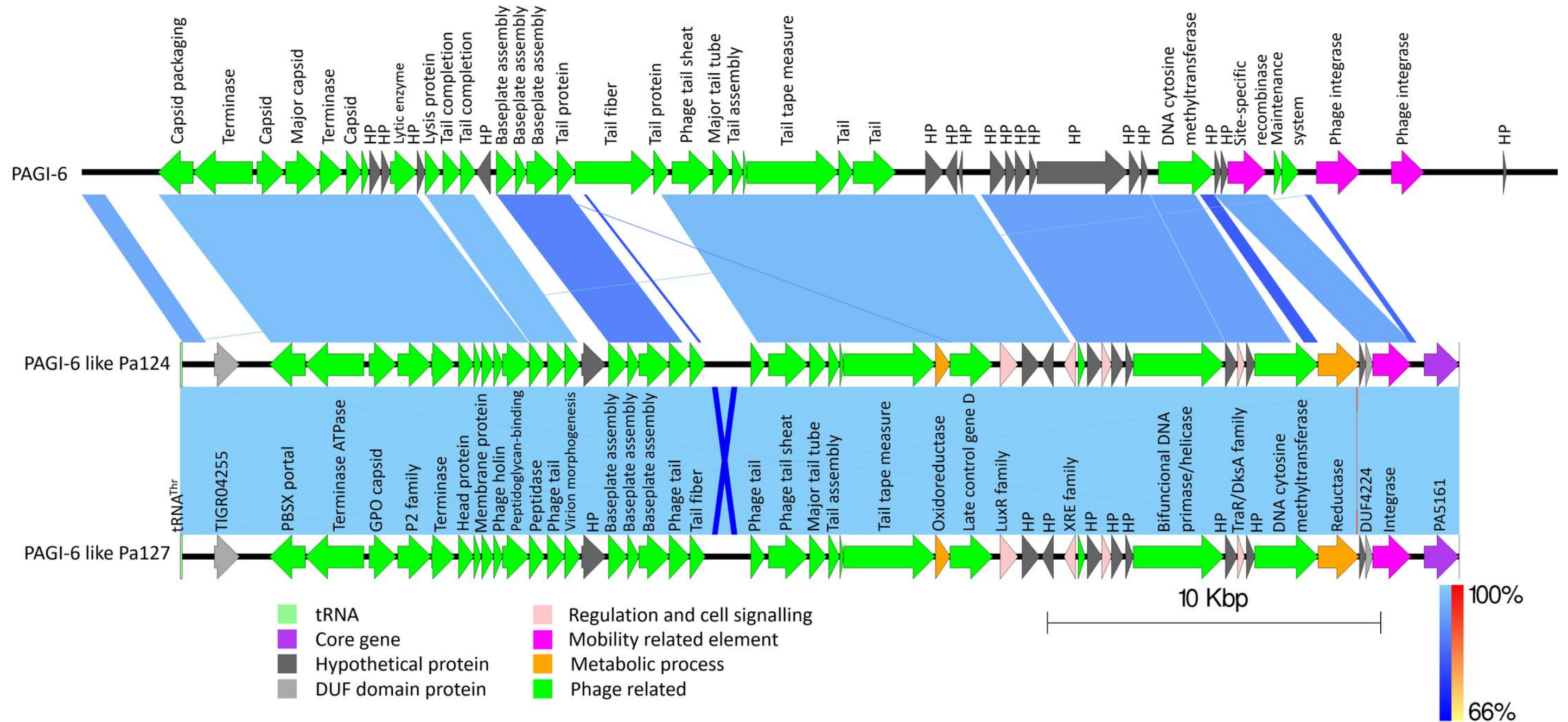
6.6.7. INSERCIÓN DE GENES DE LA ISLA PAGI-6

La isla PAGI-6 fue descrita en la cepa PSE09 de *P. aeruginosa*, esta isla tiene un tamaño de 44,302 pb, tiene un contenido de G+C de 60.6% y 47 ORFs anotados esta isla está integrada adyacente a un RNAt^{Thr} en el locus PA5160.1. La isla PAGI-6 posee una alta homología con el fago citotóxico CTX descrito en la cepa PA158 de *P. aeruginosa*, este fago pertenece a la familia de fagos R-piocina, que codifican para una bacteriocina (Battle et al., 2009; Nakayama et al., 1999). Sin embargo, el fago CTX se encuentra insertado en un locus diferente (PA2603.1) y es más pequeño (35,538 pb) que la isla PAGI-6, además la isla PAGI-6 no posee los genes *ctx* y *int*, que codifican para la citotoxina CTX y su integrasa (Nakayama et al., 1999).

En dos de nuestras cepas (Pa124 y Pa127) se identificó una GI compartida con 100% de identidad entre ellas, estas islas están integradas adyacentes a un RNAt^{Thr} en el locus PA5160.1, con un tamaño de 36,235 pb, con un contenido de G+C de 62.52% y 46 ORFs anotados. Estas islas presentaron 80% de identidad con la isla PAGI-6 y 74% con el fago CTX. Las islas identificadas en las cepas Pa124 y Pa127 perdiendo el ORF11, ORF15 y ORF20 de la isla PAGI-6 que codifican para proteínas hipotéticas y también perdieron los últimos 5 ORFs de la isla PAGI-6 que codifican para componentes del fago, como dos integrasas y una proteína de mantenimiento del fago. Las islas además incorporaron 6 ORFs a lo largo de la isla, 5 de ellos codifican para proteínas con función hipotética y el gen *cysH* en el ORF43 que codifica para una fosfoadesina fosfosulfato reductasa involucrada en el metabolismo del sulfuro. (Figura 9 y tabla S1).

En el resto de las cepas (Pa58, Pa84, Pa1207 y Pa1242) no se localizaron vestigios ni de la isla PAGI-6 ni del fago CTX a lo largo del genoma.

Figura 9. Estructura de las islas genómicas localizadas en la RGP87, adyacente al locus PA5160.1 en las cepas de *P. aeruginosa* Pa124 y Pa127.



En esta figura se puede observar la variación entre las islas genómicas insertadas adyacente al locus PA5160.1. Las franjas de azul cielo a azul marino muestran la homología directa entre los distintos segmentos de los MGES, mientras que, las franjas de rojo a amarillo muestran la homología entre segmentos que presentan una inversión en la secuencia de los MGES. Los diferentes ORFs que conforman a los MGES están clasificados por colores de acuerdo con su función.

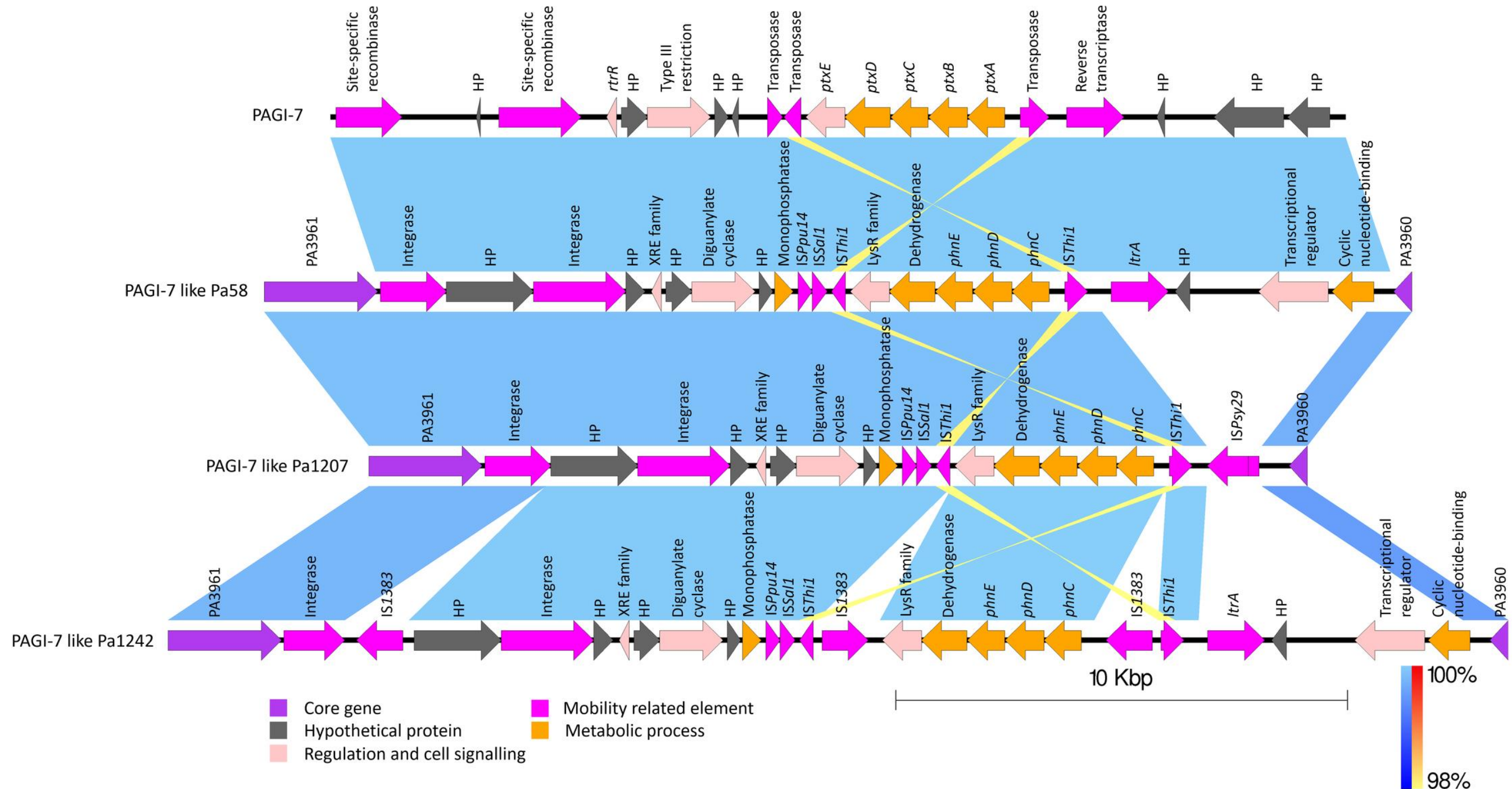
6.6.8. INSERCIÓN DE GENES EN LA ISLA PAGI-7

La isla PAGI-7 fue descrita en la cepa PSE9 insertada en el locus PA3961 con un tamaño de 22,479 pb, tiene un contenido de G+C de 55.8% y presenta 20 ORFs, esta isla codifica para múltiples ORFs relacionados a movilidad, reguladores transcripcionales y para un operón *ptxABCDE* que es requerido para la oxidación de fosfitos a fosfatos.

En las cepas Pa58, Pa1207 y Pa1242 se identificó la isla PAGI-7 insertada en el locus PA3961 en la región de plasticidad 88 (RGP88). En la cepa Pa58 se identificó la isla PAGI-7 con 100% de identidad con los 20 ORFs de la isla. La cepa Pa1207 presentó 100% de homología con los primeros 16 ORFs de la isla PAGI-7, perdiendo los últimos 4 ORFs del extremo 3' de la isla, tres de estos ORFs codifican para proteínas de función hipotética y un ORF para una transcriptasa reversa. Finalmente, en la cepa Pa1242 se identificó 100% de homología con los 20 ORFs de la isla PAGI-7, sin embargo, se identificó la inserción de 3 ORFs nuevos que codifican para tres transposasas de la familia *IS110* (figura 10 y tabla S1).

En las cepas Pa84, Pa124 y Pa127 no se identificaron vestigios de la isla PAGI-7 a lo largo de su genoma.

Figura 10. Estructura de las islas genómicas localizadas en la RGP88, adyacente al locus PA3961 en las cepas de *P. aeruginosa* Pa58, Pa1207 y Pa1242.



En esta figura se puede observar la variación entre las islas genómicas insertadas adyacente al locus PA3961. Las franjas de azul cielo a azul marino muestran la homología directa entre los distintos segmentos de los MGES, mientras que, las franjas de rojo a amarillo muestran la homología entre segmentos que presentan una inversión en la secuencia de los MGES. Los diferentes ORFs que conforman a los MGES están clasificados por colores de acuerdo con su función.

6.6.9. ISLA LESGI-2

Solamente en la cepa Pa1207 se identificó una GI con 100% de homología con la isla LESGI-2 en el locus PA2593 previamente reportado para la inserción de este elemento, esta isla conserva los 18 ORFs reportados para este elemento entre ellos el operón completo para la biosíntesis de pioluteorina, este compuesto actúa como un agente antifúngico el cual juega un papel importante en la asociación de muchas especies del género *Pseudomonas* con plantas (Nowak-Thompson et al., 1999).

6.6.10. ISLAS GENÓMICAS HÍBRIDAS ENTRE LA ISLA DE PATOGENICIDAD PAPI-1 Y EL ELEMENTO pKLC102

La isla PAPI-1 fue previamente identificada en la cepa de referencia PA14, ha sido documentado su inserción adyacente a un RNAt-Lys en el locus PA4541.1. La isla PAPI-1 presenta un tamaño de 107,899 pb, tiene un contenido de G+C de 59.7% y está compuesta por 115 ORFs (He et al., 2004), los cuales codifican principalmente para factores de adhesión como el pili tipo IV. En este locus (PA4541.1) también se ha reportado en la cepa C del grupo clonal C de *P. aeruginosa* aislada de un paciente con fibrosis quística, la inserción del elemento pKLC102, el cual tiene la característica de coexistir como plásmido o como isla genómica incorporada en el cromosoma, este elemento tiene un tamaño de 103,532 pb, tiene un contenido de G+C de 60.93% y está compuesto por 103 ORFs (Klockgether et al., 2004), posee una identidad del 74% con PAPI-1, conservando los ORFs del operón que codifica para el pili tipo IV.

En cuatro de nuestras cepas (Pa58, Pa84, Pa1207 y Pa1242) se identificó un elemento móvil que conforma un híbrido entre PAPI-1 y pKLC102, el cual está insertado en el locus PA4541.1 de la región de plasticidad genómica 41 (RGP41) del cromosoma. La isla identificada presenta pequeñas diferencias genéticas entre las cuatro cepas, sin embargo, en general se observó que en todas las cepas este elemento móvil perdió (en relación a los ORFs que componen PAPI-1) el sistema de dos componentes *rCSB-R*, el operón que codifica para la fimbria tipo CupD, una proteína de inmunidad a colicina y una proteína que codifica para piocina S5; además (con respecto al elemento pKLC102) se perdieron también una

serie de proteínas de función hipotética, un sistema de transportadores tipo ABC y una integrasa relacionada a fago (tabla S1).

De manera particular, en la cepa Pa58 el elemento híbrido presentó un tamaño de 87,649 pb, un contenido de G+C de 60.65% y 85 ORFs anotados, esta isla presentó 81% de identidad con PAPI-1 y 85% de identidad con el elemento pKLC102. El análisis completo de los ORFs mostró la inserción de 8 ORFs nuevos, la mayoría de ellos codifican para proteínas hipotéticas, el ORF3 codifica para la transposasa *IS_{rs07}* de la familia *ISk256* (tabla S1).

En la cepa Pa84, la isla presentó un tamaño de 90,361 pb, un porcentaje de C+G de 60.08% y con 88 ORFs anotados, esta isla posee 77% de identidad con PAPI-1 y 83% de identidad con el elemento pKLC102. En esta isla se encontró la inserción de 9 ORFs, los primeros 5 ORFs (ORF3 al ORF7) codifican para un regulador transcripcional de la familia TetR, 3 deshidrogenasas y una proteína hipotética, los otros 4 ORFs codifican para proteínas con función hipotética (tabla S1).

En la cepa 1207, la isla presentó un tamaño de 102,273 pb, con un contenido de G+C de 60.63% y 97 ORFs anotados, esta isla tiene 66% de identidad con PAPI-1 y 69% de identidad con pKLC102. En esta isla se identificó la inserción de 20 ORFs entre el ORF27 y el ORF48, esta región comprende un transposón *TnAs1* de la familia *Tn3* reportado en cepas de *Aeromonas salmonicida* y está conformada por un operón que codifica para resistencia a mercurio, además del sistema *tniQAB* necesario para la cointegración. Entre el ORF59 y el ORF70 se identificó una inserción de 10 ORFs que codifican para proteínas de función hipotética (tabla S1).

Finalmente, la cepa PA1242 presentó una isla con 106, 553 pb de longitud, con un porcentaje de G+C de 59.34 % y con 103 ORFs anotados, esta isla tiene un 65% de identidad con PAPI-1 y 70% de identidad con el elemento pKLC102. En esta isla se identificó una inserción de 4 ORFs entre el ORF2 y el ORF7 que codifican para proteínas hipotéticas, entre el ORF39 y el ORF42 se identificaron 2 transposasas de la familia *IS3* y entre el ORF50 y el ORF61 se encontraron 10 ORFs nuevos, uno codifica para una integrasa asociada a fagos y 2 transposasas de la familia *IS3*, el resto de los ORFs de esta región codifican para proteínas con función hipotética (tabla S1).

6.7. ELEMENTOS CONJUGATIVOS INTEGRATIVOS (ICEs)

Los elementos conjugativos integrativos (ICEs, por sus siglas en inglés), son elementos genéticos móviles (MGE, por sus siglas en inglés), con la capacidad de integrarse al cromosoma de la célula hospedera mediante recombinación homóloga de sitio específico (Johnson & Grossman, 2015), este tipo de elementos podrían denominarse como un elemento híbrido ya que comparte características con otros MGE, como la capacidad de escindir y transferirse de los plásmidos y algunos bacteriófagos, sin embargo, los ICEs no tienen la capacidad de autorreplicarse como un plásmido (Wozniak & Waldor, 2010). Además, pueden poseer un conjunto de genes que le confieren al hospedero una ventaja adaptativa con respecto al resto de la población, como ocurre con las islas genómicas, los integrones y los transposones (Wozniak & Waldor, 2010). Estas características indican que los ICEs actúan como factores de movilización genética promoviendo la transferencia horizontal de determinantes de virulencia y resistencia a agentes antimicrobianos, así como otros genes adaptativos (Zakharova & Viktorov, 2015).

En la cepa Pa58 se identificó un ICE insertado entre el locus PA0609 (*trpE*) y el locus PA0610 (*prrN*), esta zona del cromosoma no ha sido descrita como una región de plasticidad genómica, por lo cual se le asignó el número consecutivo de acuerdo con el orden dado por Klockgether *et al.* en el 2011, nombrándola región de plasticidad genómica 90 (RGP90). Este ICE presenta el 61% de homología con el elemento ICEAd1 de *Achromobacter denitrificans*, tiene el 56% de identidad con el transposón Tn4371 de *Ralstonia oxalatica* y el 33% de identidad con el plásmido pV139-a de *E. coli*. Este elemento se nombró como ICEPaMx-1, posee un tamaño de 45,214 pb, un contenido de G+C de 64.15% y con 50 ORFs anotados. El ORF1 codifica para una integrasa con el dominio 4102 asociado a fagos. En el extremo 5' del elemento se identificó el operón de resistencia a arsénico *arsABCD* entre el ORF4 y el ORF8. En el ORF10 se identificó el gen *ble_{MBL}* que codifica para una proteína que cataliza reacciones de sustitución nucleofílica, este gen confiere resistencia a bleomicina, el cual es un antibiótico antitumoral producido por *Streptomyces verticillus*, este antibiótico se utiliza para desacelerar el crecimiento de células cancerígenas y como tratamiento para combatir el sarcoma de Kaposi, relacionado con el virus del SIDA (Du et al., 2000). En el ORF22 se

identificó el gen *repA* que está involucrado en la replicación de DNA, mientras que, en el ORF24 se encontró el gen *parA* que codifica para una ATPasa y en el ORF25 el gen *parB* que codifica para una proteína con unión a DNA, este sistema es necesario para la partición y segregación del DNA al momento de la replicación sobre todo en plásmidos (Bignell & Thomas, 2001). Del ORF29 al ORF35 se encontró un operón que codifica para una bomba de eflujo de la familia MF (major facilitator, por sus siglas en inglés), este operón contiene los genes *emrA* y *emrB* que codifican para los componentes estructurales de la bomba, se ha demostrado que este sistema de eflujo confiere resistencia contra ácido nalidixico (Lin et al., 2017). Finalmente, en el extremo 3' del ICE encontramos del ORF36 al ORF50 el operón *trbBCDEJKLFGHI* que codifican para la formación de un aparato requerido para la translocación física de DNA (Li et al., 1999), estas estructuras son frecuentemente encontradas en plásmidos y son característicos de los ICEs facilitando la escisión del elemento móvil del cromosoma y transferirse a una célula receptora para su posterior integración (Zakharova & Viktorov, 2015) (figura 11 y tabla S1).

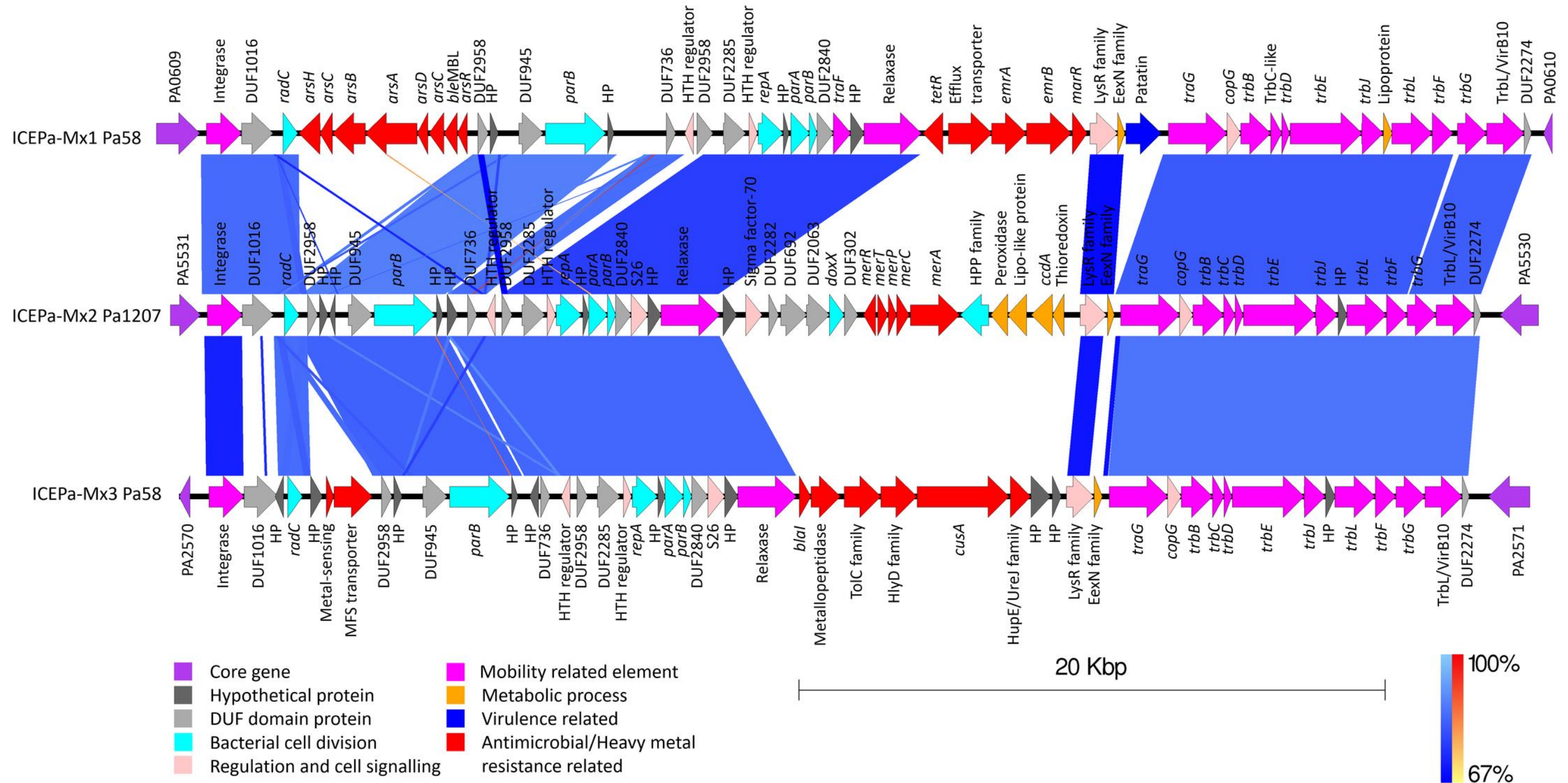
En la cepa Pa1207 se identificó un ICE entre el locus PA5530 y el locus PA5531 (*tonB1*), esta zona no ha sido descrita como una región de plasticidad genómica, denominándola región de plasticidad genómica 91 (RGP91). Este ICE presenta 61% de homología con el ICEPaMx-1 y 68% de identidad con el elemento ICEPaeSP. Este elemento se nombró ICEPaMx-2, tiene 43,471 pb, un porcentaje de G+C de 65.43% y con 55 ORFs anotados. Tanto los primeros 23 ORFs del elemento ICEPa1207-1 (del ORF1 al ORF23) como los últimos 15 ORFs (del ORF41 al ORF55) son compartidos con el elemento ICEPaMx-1, perdiendo únicamente el operon *arsABCD* de resistencia a arsénico identificado en el elemento ICEPaMx-1. La región única que presenta el elemento ICEPaMx-2 entre el ORF24 y el ORF40, corresponde a un operón de resistencia a mercurio, además, el ORF29 y el ORF39 codifican para un citocromo C oxidasa y una proteína de biogénesis del citocromo con actividad tiol reductasa, las cuales se ha reportado que están asociadas a la división y proliferación de plásmidos (Deshmukh et al., 2003). La región única del elemento ICEPaMx-2 no está reportada en ningún otro elemento móvil, sin embargo, presenta 100% de

identidad con una región del cromosoma de la cepa de *P. aeruginosa* F30658 y 91% de identidad con la cepa de *P. aeruginosa* AR_0111 (figura 11 y tabla S1).

En las cepas Pa58, Pa124, Pa127 y Pa1207 se identificó un ICE no reportado aún el cual se nombró ICEPaMx-3, este elemento presenta el 100% de identidad entre las cepas Pa58, Pa124 y Pa127 insertado en el locus PA2570 en la región de plasticidad genómica 26 (RGP26) descrito en las cepas PA14 y PA7 (Mathee et al., 2008), el elemento ICEPaMx-3 presentó un tamaño de 42,888 pb, tiene un contenido de G+C de 65.58% y 49 ORFs anotados. Este ICE presentó 100% de identidad con el cromosoma de varias cepas de *P. aeruginosa*, 64% de identidad con el elemento ICE-kks de *Acidovorax* sp. KKS102 y 62% de identidad con el elemento ICEPaCAM-1 de *P. aeruginosa* N17-01173. Mientras que, en la cepa Pa1207 el ICE identificado presentó 84% de identidad con respecto al elemento ICEPaMx-3 por lo cual se determinó que es el mismo elemento, esta insertado entre el locus PA0804 (oxidoreductasa) y el locus PA0805 (proteína hipotética) en una región de plasticidad genómica no caracterizada aún, se le asignó el nombre RGP94. El ICEPaMx-3 en la cepa Pa1207 tiene un tamaño de 42,356 pb, tiene un contenido de G+C de 64.99% y 48 ORFs anotados. El 39% de los ORFs identificados en el elemento ICEPaMx-3 codifican para proteínas de función hipotética. En el ORF21 se encontró el gen *parA* que codifica para una ATPasa y en el ORF22 el gen *parB* que codifica para una proteína con unión a DNA, este sistema es necesario para la partición y segregación del DNA al momento de la replicación sobre todo en plásmidos (Bignell & Thomas, 2001). El ORF27 codifica para un represor de penicilinasas (Blal), esta proteína actúa como un regulador negativo bloqueando la expresión de algunas β -lactamasas (Wittman et al., 1993). Del ORF29 al ORF31 se encontraron tres componentes de la bomba de eflujo CusA de la familia RND que está asociada a la expulsión de metales pesados (Long et al., 2011). Finalmente, en el extremo 3' del ICE encontramos del ORF35 al ORF49 el operón *trbBCDEJKLFGHI* que codifica para la formación de un aparato requerido para la translocación física de DNA (Li et al., 1999) (figura 11 y tabla S1).

En las cepas Pa58, Pa124, Pa127 y Pa1207 se identificó el mismo ICE el cual presenta un tamaño de 46,513 pb, un contenido de G+C de 63.14% y 51 ORFs anotados, este elemento comparte un 100% de identidad con el extremo 5' (del ORF35 al ORF82) del plásmido p34998-293.973 kb de *Enterobacter hormaechei subsp. steigerwaltii*, con el plásmido p35734-141.404 kb de *Enterobacter cloacae* y con el plásmido 2964TF de *Klebsiella pneumoniae*. El fragmento identificado en nuestras cepas codifica principalmente para un transportador ABC (del ORF25 al ORF28) y una bomba de eflujo de la familia RND (del ORF29 al ORF38), así como el operón *trbBCDEJKLFGHI* en el extremo 3' del elemento (del ORF39 al ORF51). A pesar de que en las cuatro cepas el elemento es el mismo, cada cepa presenta un locus de inserción diferente, en la cepa Pa58 se encontró entre el locus PA3057 (proteína hipotética) y el locus PA3058 (*peIG*), en una zona no identificada como región de plasticidad genómica, por lo que se le nombró RGP92. En las cepas Pa124 y Pa127 se encontró insertado en el locus PA1579 en la región de plasticidad genómica 75 (RGP75) descrita previamente en la cepa PA7 (Roy et al., 2010). Mientras que, en la cepa Pa1207 se identificó entre el locus PA3655 (*tsf*) y el locus PA3656 (*rpsB*), al igual que en la cepa Pa58 esta región de plasticidad no ha sido reportada aún por lo cual se le asignó el nombre de RGP93 (tabla S1).

Figura 11. Estructura de las islas genómicas localizadas en la RGP88, adyacente al locus PA3961 en las cepas de *P. aeruginosa* Pa58, Pa1207 y Pa1242.



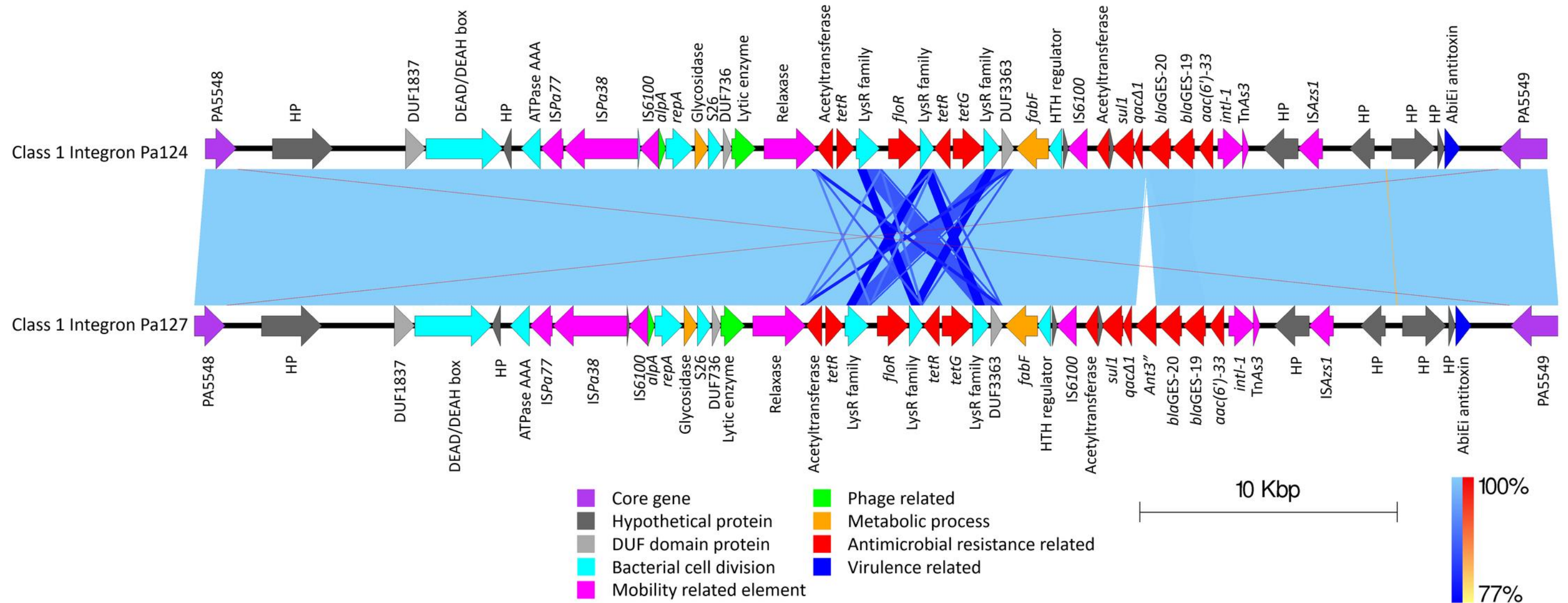
En esta figura se puede observar la variación entre los ICEs insertados adyacente al locus PA3961. Las franjas de azul cielo a azul marino muestran la homología directa entre los distintos segmentos de los MGES, mientras que, las franjas de rojo a amarillo muestran la homología entre segmentos que presentan una inversión en la secuencia de los MGEs. Los diferentes ORFs que conforman a los MGES están clasificados por colores de acuerdo con su función.

6.8. INTEGRONES

En las cepas Pa124 y Pa127 se identificó un integrón clase 1 reportado en diversas cepas de la familia Enterobacteriaceae, este elemento está integrado adyacente al locus PA5548, en este locus no se había reportado la inserción de ningún elemento genético móvil y por lo tanto nosotros le asignamos a esta zona del cromosoma RGP-102 conforme al número consecutivo establecido hasta el momento (Klockgether et al., 2011). El integrón tiene un tamaño de 48,548 pb, 56.61% de G+C y 43 ORFs anotados para la cepa Pa124, mientras que, en la cepa Pa127 presenta un tamaño de 49,403 pb, un porcentaje de G+C de 56.56% y 45 ORFs anotados. Este integrón presenta 99% de identidad entre las dos cepas diferenciándose solamente por la presencia de más de un ORF en la cepa Pa127.

Este integrón está conformado por genes que codifican para determinantes de resistencia a antimicrobianos, como: *aac(6')*-33, que codifica para una acetiltransferasa, el gen *ant(3'')*-1a que codifica para una nucleotidiltransferasa (solamente en la cepa Pa127) y dos proteínas de la familia N-acetiltransferasa, estos productos le confieren la característica de ser resistentes a aminoglucósidos, dos alelos del gen *bla_{GES}* (19 y 20) que codifican para una β -lactamasa clase A, las cuales son enzimas con actividad extendida que actúan sobre todos los agentes antimicrobianos del grupo de los β -lactámicos, un transportador de compuestos de amonio (QacE delta), el gen *sul1* de resistencia a sulfonamidas, un sistema de transporte de tetraciclinas (*tetG* y *tetR*) y el gen *floR* de resistencia a cloranfenicol (figura 12 y tabla S1).

Figura 12. Estructura del integron clase 1 localizado en el locus PA5548 de las cepas de *P. aeruginosa* Pa124 y Pa127.



En esta figura se puede observar la variación entre los integrones insertados adyacente al locus PA5548. Las franjas de azul cielo a azul marino muestran la homología directa entre los distintos segmentos de los MGES, mientras que, las franjas de rojo a amarillo muestran la homología entre segmentos que presentan una inversión en la secuencia de los MGEs. Los diferentes ORFs que conforman a los MGEs están clasificados por colores de acuerdo con su función.

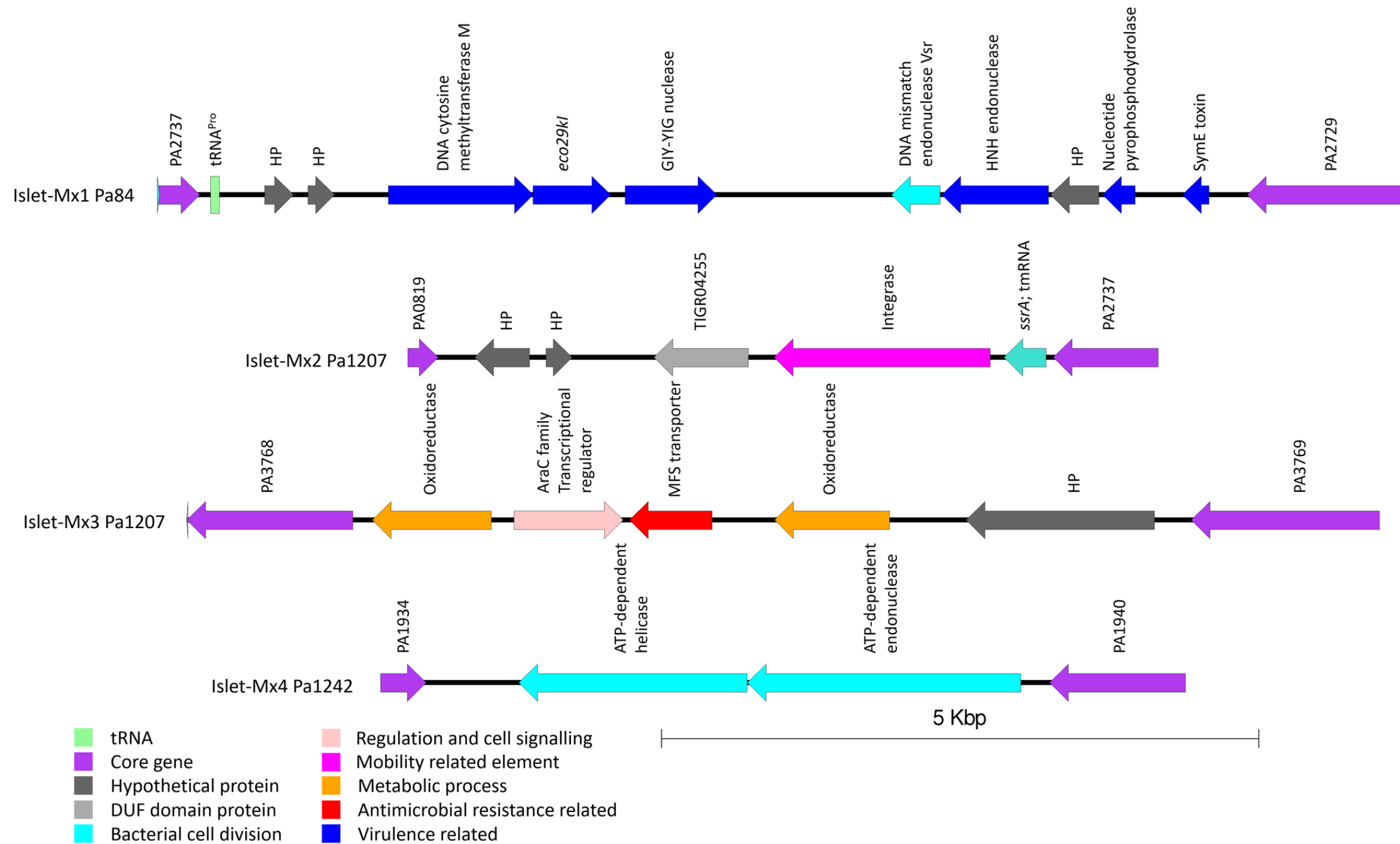
6.9. ISLOTES

Se identificaron nuevos islotes genómicos en las cepas Pa84, Pa1207 y Pa1242, que corresponden a regiones de DNA cuyo tamaño es inferior a 10 kb (Hacker & Carniel, 2001). Asignamos Islet-Mx1 (cepa Pa84) a una región de DNA insertada adyacente a tRNA^{Pro} (locus PA2736.1); este elemento genético está en la RGP28. Previamente, la inserción de la isla LESGI-1 en la cepa LESB58 se describió en este RGP; este elemento genético tiene un tamaño de 7.906 pb, un 55,86% de composición G+C y 10 ORF. Islet-Mx1 se caracteriza por la presencia de la endonucleasa de restricción Eco29kl del plásmido pSACII 1 de la cepa 29 de *E. coli*, otras tres endonucleasas autodirigidas de diferentes familias estructurales, una citosina metiltransferasa M de DNA, una pirofosfodrolasa de nucleótidos y una toxina de la familia SymE, que forman parte del sistema toxina-antitoxina tipo I; sin embargo, el gen de la antitoxina no se identificó dentro del elemento. El resto del elemento correspondió a proteínas hipotéticas (figura 13 y tabla S1).

En la cepa Pa1207 se identificaron dos islotes (Islet-Mx2 e Islet-Mx3), el islet-Mx2 se encontró insertado adyacente al locus PA0819 en la RGP6. Tiene un tamaño de 4783 pb, un 55,86% de contenido de G+C y cinco ORF, tres de los cuales son proteínas hipotéticas; además, tiene una integrasa específica de sitio en el extremo 3' del elemento y un tmRNA (ssrA). El islet-Mx3 se insertó adyacente al locus PA3768 en la RGP36. Tiene un tamaño de 6.549 pb, un 60% de contenido de G+C y cinco ORF, que codifican una oxidorreductasa dependiente de NADP, un regulador transcripcional de la familia AraC, un transportador MFS y una proteína hipotética (figura 13 y tabla S1).

En la cepa Pa1242, se identificó el islet-Mx4 insertado adyacente al locus PA1934. En este locus, la isla PAGI-11 se describió en la cepa PSE09 de *P. aeruginosa*; sin embargo, Islet-Mx4 no tiene homología con PAGI-11. Islet-Mx4 tiene un tamaño de 5,203 pb, un contenido de G+C del 56,67% y está formado por dos ORF. El primer ORF codifica una helicasa dependiente de ATP, mientras que el segundo ORF tiene un codón de parada prematuro que lo convierte en una proteína truncada (figura 13 y tabla S1).

Figura 13. Estructura de los islotes localizados en las cepas de *P. aeruginosa* Pa84, Pa1207 y Pa1242.



En esta figura se puede observar la variación entre los islotes localizados en las cepas Pa84, Pa1207 y Pa1242. Los diferentes ORFs que conforman a los MGEs están clasificados por colores de acuerdo con su función.

6.10. ELEMENTOS DE SECUENCIAS DE INSERCIÓN

Identificamos siete nuevos elementos compuestos por genes asociados con secuencias de inserción de tipo movilización y transposasas. El MGE se nombró consecutivamente de acuerdo con las siguientes nomenclaturas: IS-Mx seguido del número correspondiente. IS-Mx1 se identificó en la cepa Pa58 insertada adyacente al locus PA2736.1 en la RGP28. Previamente en este locus, se informó la inserción de la isla LESGI-1 en cepas epidémicas de LES; sin embargo, este nuevo elemento no tiene homología con la isla LESGI-1. IS-Mx1 tiene un tamaño de 6,190 pb, un 60.04% de G+C y siete ORF; este elemento tiene una duplicación de la transposasa IS222 y una copia de la transposasa *ISPa37*. Además, tiene un sistema toxina-antitoxina tipo I de la familia SymE y un nucleótido pirofosfohidrolasa; el resto de los ORFs son proteínas hipotéticas (figura 14 y tabla S1).

Se identificó la IS-Mx2 en la cepa Pa58, insertada adyacente al locus PA2250 en una nueva RGP (RGP96). Este elemento tiene un tamaño de 1,965 pb, un contenido de G+C del 60.04% y posee cuatro ORF. Además, identificamos una transposasa *ISPa20*, la proteína de la familia de repeticiones Sel1, y el resto eran proteínas hipotéticas (figura 14 y tabla S1).

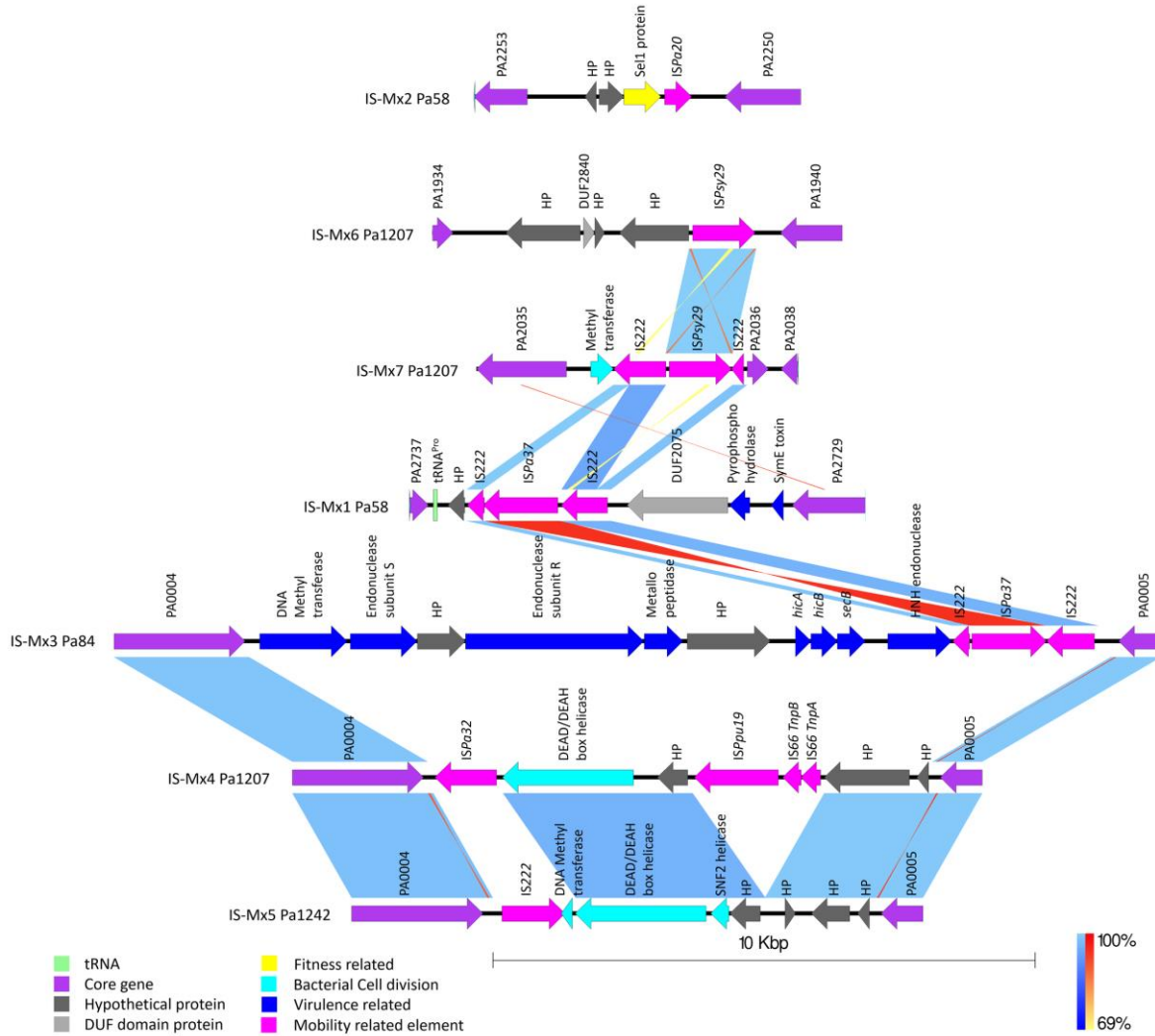
Se identificó la IS-Mx3 en la cepa Pa84, insertada adyacente al locus PA0004 en un nuevo RGP (RGP99). Este elemento tiene un tamaño de 15,401 pb, posee un contenido de G+C del 55.88% y tiene 13 ORF. Tiene dos transposasas diferentes (IS222 e *ISPa37*), que intervienen en su movilización; también tiene un sistema de modificación-restricción tipo I y un sistema toxina-antitoxina de tipo II de la familia HicAB, una metalopeptidasa M48 y una subunidad de translocasas SecB (figura 14 y tabla S1).

Asimismo, en el mismo RGP (RGP-99), junto al locus PA0004 de la cepa Pa1207, se identificó un elemento diferente denominado IS-Mx4. Tiene un tamaño de 9,108 pb, un 55.88% de G+C y ocho ORF. Este elemento presentó las transposasas *ISPa32* e *ISPpu19* junto con sus secuencias de inserción TnpA y TnpB; el resto de los ORF fueron proteínas hipotéticas. Además, en el mismo RGP (RGP99) pero en la cepa Pa1242, se identificó un elemento IS-Mx5 diferente con 6,779 pb, 55.65% de contenido de G+C y ocho ORF. Además, identificamos una transposasa IS222, una DNA-metiltransferasa específica de sitio, una

helicasa de caja DEAD/DEAH y una proteína de dominio de la familia helicasa/SNF2; el resto de los ORFs fueron proteínas hipotéticas (figura 14 y tabla S1).

Por otro lado, identificamos dos nuevos MGE (IS-Mx6 e IS-Mx7) en la cepa Pa1207. IS-Mx6, se insertó adyacente al locus PA1934 en la RGP52. Inicialmente, la isla PAGI-11 reportada en la cepa PSE09 de *P. aeruginosa* se describió en este locus; sin embargo, IS-Mx6 no tiene homología con PAGI-11. IS-Mx6 tiene un tamaño de 4,770 pb, un contenido de G+C de 54.04% y seis ORFs, donde el último ORF codifica para la transposasa ISPsy29 de la familia IS3; el resto de los ORFs codifican proteínas hipotéticas. IS-Mx7 se insertó adyacente al locus PA2035 en la RGP20; este elemento tiene un tamaño de 2,536 pb, 57.76% de G+C y cuatro ORFs. Se identificó una duplicación de la transposasa IS222, una transposasa ISPsy29 y una proteína que contiene el dominio metiltransferasa con alta homología con el locus PA2036 (figura 14 y tabla S1)

Figura 14. Estructura de los elementos de secuencias de inserción (IS) localizados en las cepas de *P. aeruginosa* Pa58, Pa84, Pa1207 y Pa1242.



En esta figura se puede observar la variación entre los elementos de secuencias de inserción (IS) localizados en las cepas Pa58, Pa84, Pa1207 y Pa1242. Las franjas de azul cielo a azul marino muestran la homología directa entre los distintos segmentos de los MGES, mientras que, las franjas de rojo a amarillo muestran la homología entre segmentos que presentan una inversión en la secuencia de los MGEs. Los diferentes ORFs que conforman a los MGEs están clasificados por colores de acuerdo con su función.

6.11. REPETICIONES PALINDRÓMICAS CORTAS AGRUPADAS Y REGULARMENTE INTERESPACIADAS (CRISPR)

Dos cepas presentaron secuencias tipo CRISPR en sus genomas, en la cepa Pa58 se encontró solamente una secuencia tipo CRISPR con un tamaño de 627 pb, con la secuencia repetida directa consenso: GTTCACTGCCGTATAGGCAGCTAAGAAA y 10 secuencias espaciadoras (figura 15).

Figura 15. Estructura de la secuencia CRISPR en la cepa de *P. aeruginosa* Pa58.

- CRISPR start position:1645503 CRISPR end position:1646130 CRISPR length:627
- DR consensus: GTTCACTGCCGTATAGGCAGCTAAGAAA
- DR length: 28 Number of spacers: 10

1645503	GTTCACTGCCGTATAGGCAGCTAAGAAA	ACCAGAGCCTGTGGATTCGGGCCCAAGGAA	1645562
1645563	GTTCACTGCCGTATAGGCAGCTAAGAAA	AGGATCGGCCCGCAGGTTGCGCTGGAAGTCGCG	1645622
1645623	GTTCACTGCCGTATAGGCAGCTAAGAAA	TACTCGCCCTGGTCGCCTGCCTGGTCGCGCTG	1645682
1645683	GTTCACTGCCGTATAGGCAGCTAAGAAA	GCGACGAGATCGAGGACGGCGACACTACCCTG	1645742
1645743	GTTCACTGCCGTATAGGCAGCTAAGAAA	CTTGTCGCGGATGTACGCATCGCCCAGAGGT	1645802
1645803	GTTCACTGCCGTATAGGCAGCTAAGAAA	ATCGTACCGCCGCGCTGCAAATCGAGGTCGCC	1645862
1645863	GTTCACTGCCGTATAGGCAGCTAAGAAA	ATGATGGTTTTTCGGTCTGTCGGACACAGTC	1645922
1645923	GTTCACTGCCGTATAGGCAGCTAAGAAA	GCGGGAATTCACGGCGAACAACCTCGCCTCTC	1645982
1645983	GTTCACTGCCGTATAGGCAGCTAAGAAA	GGGGAGGGTTGCGCCAGGGCGGCGGGCCTC	1646042
1646043	GTTCACTGCCGTATAGGCAGCTAAGAAA	TTATGGGCCGCTGGGCATCGATATGAAGAAC	1646102
1646103	GTTCACTGCCGTATAGGCAGCTAAGAAA		1646130

Las secuencias sombreadas en amarillo indican la repetición directa consenso en el arreglo y las secuencias sombreadas en colores indican los espaciadores en el arreglo tipo CRISPR.

En la cepa Pa84 se identificaron dos secuencias tipo CRISPR, la primera tiene un tamaño de 1067 pb, presenta 17 secuencias espaciadoras y una secuencia repetida directa consenso de 29 pb: CGGTTTCATCCCCACGCATGTGGGGAACAC (figura 16). La segunda secuencia tipo CRISPR, tiene un tamaño de 578 pb, con 9 secuencias espaciadoras y una secuencia repetida directa consenso de 29 pb: CGGTTTCATCCCCACACCCGTGGGGAACAC, la cual es idéntica a la secuencia repetida directa de la secuencia anterior (figura 17). Ambas secuencias están flanqueando a un operón que codifica para las proteínas asociadas a CRISPR (CAS) del tipo I-E descritas por primera vez como un sistema de inmunidad hacia componentes plasmídicos en *E. coli* por Brouns *et al.*, en el 2008 (figura 18 y tabla S1).

Figura 16. Estructura de la primera secuencia CRISPR en la cepa Pa84 de *P. aeruginosa*.

- CRISPR start position: 4328236 CRISPR end position: 4329303 CRISPR length: 1067
- DR consensus: CGGTTTCATCCCCACGCATGTGGGGAACAC
- DR length : 29 Number of spacers : 17

4328236	CGGTTTCATCCCCACGCATGTGGGGAACAC	ATCGTCTCCAGCAGCACGCGGACGCGGTCTT	4328296
4328297	CGGTTTCATCCCCACGCATGTAGGGAACAC	TCTGCGGTGCTCGGGGCGGTCCGCTCCATCAC	4328357
4328358	CGGTTTCATCCCCACGCATGTGGGGAACAC	GGCCGCTCGTAGCCCCACGGCCGCACCGGCGA	4328418
4328419	CGGTTTCATCCCCACGCATGTGGGGAACAC	ACCAAGTCGATGGCACCCTCGGCGATCTGGT	4328479
4328480	CGGTTTCATCCCCACGCATGTGGGGAACAC	CCGAAGGCACAGACGGTCGGGTTCCGCTACTA	4328540
4328541	CGGTTTCATCCCCACGCATGTGGGGAACAC	CGAGCGGAGGGGGCGCCGGTGAGTAACGAAGC	4328601
4328602	CGGTTTCATCCCCACGCATGTGGGGAACAC	AACAACCCGTTTGGCACGGACAAGGTTCCGGG	4328662
4328663	CGGTTTCATCCCCACGCATGTGGGGAACAC	GGGCTGCCATCGAGCCAGAGGACTTTTCCAG	4328723
4328724	CGGTTTCATCCCCACGCATGTGGGGAACAC	GGCAATGGGGGAAGAGATACCGCGGGCTGCGC	4328784
4328785	CGGTTTCATCCCCACGCATGTGGGGAACAC	CCGGATGGCTTGTGAAGAACGAGTAGTACCG	4328845
4328846	CGGTTTCATCCCCACGCATGTGGGGAACAC	ATCGTAGAGCCGACGCCGTTCCAGCGCGATAA	4328906
4328907	CGGTTTCATCCCCACGCATGTGGGGAACAC	CTGTGCTTTCAGCCTGTTCTGTAAGTCCGTTGTA	4328968
4328969	CGGTTTCATCCCCACGCATGTGGGGAACAC	CGCTCTGCCGCTGAGTGCATCGACTGGAGCGA	4329029
4329030	CGGTTTCATCCCCACGCATGTGGGGAACAC	TCCTCGGCAGCACTTCCGATCCAGTACGCAGC	4329090
4329091	GGGTTTCATCCCCACGCATGTGGGGAACAC	ATTGCCGTTTCGAACCGGGGCGCCGATTGAT	4329151
4329152	CGGTTTCATCCCCACGCATGTGGGGAACAC	GCACCGTCATCGGCTATATCGGCGAAGACGGTC	4329213
4329214	CGGTTTCATCCCCACGCATGTGGGGAACAC	ATGCCGGTCTTTCGAACAGACGCCGATTGT	4329274
4329275	AGGTTTCATCCCCACGCATGTGGGGAACAC		

Las secuencias sombreadas en amarillo indican la repetición directa consenso en el arreglo y las secuencias sombreadas en colores indican los espaciadores en el arreglo tipo CRISPR.

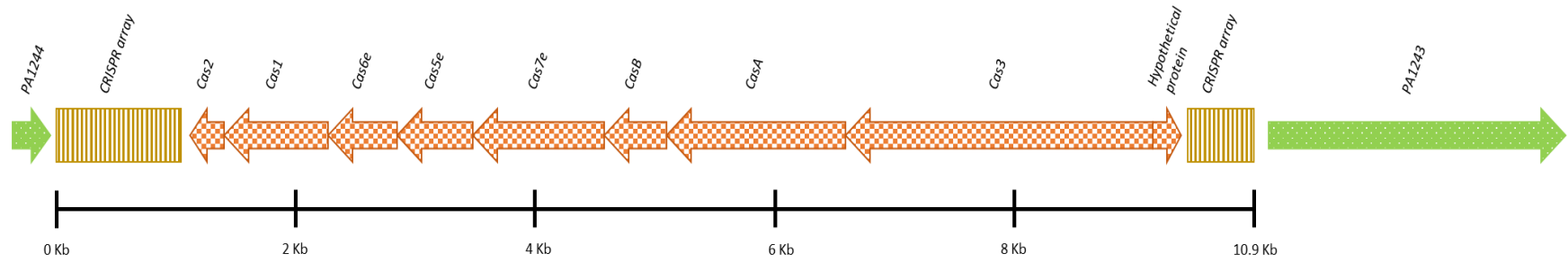
Figura 17. Estructura de la segunda secuencia CRISPR en la cepa Pa84 de *P. aeruginosa*.

- CRISPR start position: 4338539 CRISPR end position: 4339117 CRISPR length: 578
- DR consensus: CGGTTTCATCCCCACACCCGTGGGGAACAC
- DR length: 29 Number of spacers: 9

4338539	CAGTCATCCCCACGCCGTGGGGAACAC	CCCCACCCCTGGCCGCGGGTTGGGTCTTCCAT	4338599
4338600	CGGTTTCATCCCCACACCCGTGGGGAATAC	CCCAGTCCGTTGGAATTGCTGCCCTGGAGCAG	4338660
4338661	CGGTTTCATCCCCACACCCGTGGGGAACA	CGCCCGCGTGAAGGAGGCCGCATCTGATGCAGG	4338722
4338723	CGGTTTCATCCCCACACCCGTGGGGAACAC	ACCCAGCCAAGGGTTTCGGCGTGAACGCGCAG	4338783
4338784	CGGTTTCATCCCCACACCCGTGGGGAACAC	ATCATGTTGCGCGGGATGTTCTTCTCGTTGAG	4338844
4338845	CGGTTTCATCCCCACACCCGTGGGGAACAC	AGTCCATGCGGTGCGGCCATTCGATGATCGC	4338905
4338906	CGGTTTCATCCCCACACCCGTGGGGAACAC	CAGTCGAAGCGGCCGAATGGCGGCGCTGGG	4338966
4338967	CGGTTTCATCCCCACACCCGTGGGGAACAC	GCGAGCTGTGCGCCCTCGGCGCGCTAGCGC	4339027
4339028	CGGTTTCATCCCCACACCCGTGGGGAACAC	AGATCCACCTCAAGCTCCATCTGCGCAATGGT	4339088
4339089	CGGTTTCATCCCCACACCCGTGGGGAACAC		4339117

Las secuencias sombreadas en amarillo indican la repetición directa consenso en el arreglo y las secuencias sombreadas en colores indican los espaciadores en el arreglo tipo CRISPR.

Figura 18. Estructura del operón CRISPR-Cas en la cepa de *P. aeruginosa* Pa84.



Las flechas verdes indican los genes adyacentes al operón CRISPR-Cas, los rectángulos amarillos indican las secuencias CRISPR que flanquean el operón y las flechas naranjas indican los genes asociados a CRISPR tipo I-E.

6.12. SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

De acuerdo con el ensayo de susceptibilidad a compuestos antimicrobianos, la cepa Pa127 fue la que presentó el perfil de resistencia más amplio, siendo resistente a 19 de los 20 antimicrobianos probados, solamente fue sensible a polimixina B. Las cepas Pa58 y Pa124 fueron resistentes a 18 de 20 antimicrobianos, Pa58 fue sensible a polimixina B y aztreonam, mientras que, la cepa Pa124 fue sensible a polimixina B y presentó una resistencia intermedia (según el criterio descrito en el apartado de metodología) a imipenem. La cepa Pa1207 presentó un perfil de resistencia intermedio, siendo resistente a todos los β -lactámicos, con excepción del aztreonam, y a los aminoglucósidos, excepto la gentamicina, esta cepa fue sensible a polimixina B y a todas las fluoroquinolonas probadas. La cepa Pa84 solamente fue resistente a imipenem, ciprofloxacino y levofloxacino, además, esta cepa presentó resistencia intermedia a carbenicilina, ceftazidima y norfloxacino, y fue susceptible al resto de los antimicrobianos. Por otro lado, la cepa Pa1242, fue susceptible a 19 de los 20 antimicrobianos y solamente presentó resistencia intermedia a polimixina B (tabla 3).

Basados en el esquema de estratificación fenotípica para perfiles de resistencia o susceptibilidad a antimicrobianos (Magiorakos et al., 2012), tres de las cepas (Pa58, Pa124 y Pa127) fueron clasificadas como extensivo droga resistentes (XDR) ya que fueron resistentes por lo menos a un antimicrobiano de cada grupo probado, pero sensible a antimicrobianos de dos grupos, dos cepas (Pa84 y Pa1207) fueron clasificadas como moderadamente resistentes (MDR), siendo resistentes por lo menos a un antimicrobiano en 3 o más grupos y una cepa (Pa1242) fue clasificada como susceptible, ya que solo fue resistente a un agente antimicrobiano (polimixina B).

Tabla 3. Perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de cepas mexicanas de *P. aeruginosa*.

Antimicrobiano/Cepa	Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
Carbenicilina	R	I	R	R	R	S
Ticarcilina	R	S	R	R	R	S
Piperacilina	R	S	R	R	R	S
Ticarcilina / Clavulanato	R	S	R	R	R	S
Piperacilina/ Tazobactam	R	S	R	R	R	S
Ceftazidima	R	I	R	R	R	S
Ceftriaxona	R	S	R	R	R	S
Cefotaxima	R	S	R	R	R	S
Cefepime	R	S	R	R	R	S
Imipenem	R	R	I	R	R	S
Meropenem	R	S	R	R	R	S
Aztreonam	S	S	R	R	S	S
Amikacina	R	S	R	R	R	S
Gentamicina	R	S	R	R	S	S
Tobramicina	R	S	R	R	R	S
Polimixina B	S	S	S	S	S	R
Ciprofloxacina	R	R	R	R	S	S
Lomefloxacina	R	S	R	R	S	S
Norfloxacino	R	I	R	R	S	S
Levofloxacina	R	R	R	R	S	S
	XDR	MDR	XDR	XDR	MDR	SUS

R: resistente, I: resistencia intermedia y S: susceptible; XDR: extensivamente droga resistente, MDR: moderadamente resistente y SUS: susceptible.

6.13. RELACIÓN GENÉTICA Y FENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA Y ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVILES

De acuerdo con el fenotipo y la presencia de genes de resistencia en elementos móviles, las cepas Pa58, Pa124 y Pa127 presentaron un perfil de resistencia de extensivo-drogo resistente, este fenotipo se explicaría por la presencia de genes adquiridos a través de transferencia horizontal. Como es el integron clase 1, el cual está presente e insertado en el cromosoma de las cepas Pa124 y Pa127, en este integron está presente una doble copia del gen *bla_{GES}* (alelos 19 y 20, respectivamente). Mientras que en la cepa Pa58, éste integron se encuentra presente en dos islas (PAGI-41 y PAGI-46). En la isla PAGI-41 el integron posee la betalactamasa GES-1 y en PAGI-46 está presente el gen de la betalactamasa OXA-2. Estas betalactamasas de espectro extendido podrían ser las responsables de la resistencia a todos los miembros del grupo de los betalactámicos en

estas tres cepas. Cabe mencionar que todas las cepas de *P. aeruginosa* poseen intrínsecamente las betalactamasas AmpC y la OXA-50, estas dos betalactamasas se encuentran funcionando de manera basal al estímulo del antimicrobiano, cuando aumenta este estímulo las betalactamasas presentan una sobreexpresión lo que causa un efecto directo sobre la resistencia en la cepa. Además, en el integron clase 1 de las tres cepas, se encontró una acetil transferasa (AAC[6']-33) y una nucleotidiltransferasa (ANT[3'']-1a), estas enzimas son responsables de producir modificaciones en aminoglucósidos, pudiendo ser ésta la causa de la resistencia a este grupo de antimicrobianos. Cabe destacar que en el integron clase 1, también se encontró la presencia de los genes *sul1* y *floR* que confieren resistencia a sulfonamidas y cloranfenicol, respectivamente, sin embargo, estos antimicrobianos no fueron probados ya que se sabe que *P. aeruginosa* es intrínsecamente resistente a ambos. Además, las tres cepas (Pa58, Pa124 y Pa127) presentaron una mutación en el gen *gyrA* que provocó el cambio de una serina por una leucina en el aminoácido 83, lo cual confiere resistencia a todos los antimicrobianos del grupo de las fluoroquinolonas. Finalmente, solo en la cepa Pa58, se identificaron varios genes de enzimas modificadoras de antimicrobianos: una N-acetiltransferasa (*aac4*), una adeniltransferasa (*aadA1*) presente dentro de la isla PAGI-46.

Las otras tres cepas (Pa84, Pa1207 y Pa1242) no presentaron genes de resistencia antimicrobiana en elementos móviles. Sin embargo, Pa84 presenta resistencia a tres de los antimicrobianos de las fluoroquinolonas y de los beta-lactámicos, la resistencia puede deberse a mecanismos intrínsecos como lo son las bombas de eflujo, la sobreexpresión de las betalactamasas cromosómicas AmpC y/o OXA-50. La cepa Pa1242 solo presenta resistencia a polimixina B, explicable por la presencia de una mutación en el gen *parR* del sistema de dos componentes ParR-ParS. La cepa Pa1207 presenta un fenotipo de multi-drogo resistencia, donde solo es resistente a betalactámicos y aminoglucósidos, en esta cepa se identificó una mutación para el gen *oprM*, el cual codifica para la porina OprM componente de las bombas MexAB (para eflujo de beta-lactámicos) y MexXY (para eflujo de aminoglucósidos).

6.14. MUTACIONES EN BOMBAS DE EFLUJO

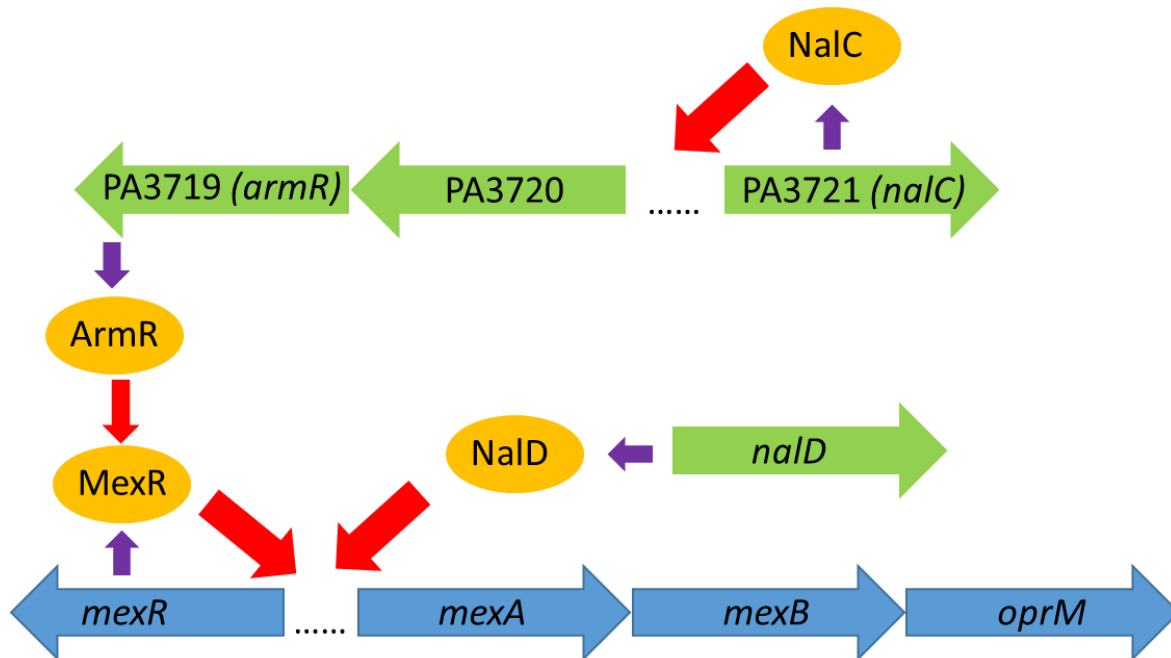
A pesar de los genes de resistencia identificados en los elementos genéticos móviles de las diferentes cepas de *P. aeruginosa*, esta bacteria posee mecanismos intrínsecos que amplían el rango de resistencia a diferentes grupos de agentes antimicrobianos, entre estos mecanismos se han identificado el uso de bombas de eflujo y porinas. Estos sistemas además están regulados por diferentes vías las cuales favorecen o reprimen la expresión de los componentes que conforman la bomba de acuerdo con estímulos ejercidos por el ambiente. Mutaciones específicas han sido identificadas en cepas clínicas a diferentes niveles de las vías de regulación de las bombas de eflujo y porinas incrementando la resistencia antimicrobiana en las cepas.

En nuestra población se identificaron nuevas mutaciones en componentes de la vía de regulación de las bombas de eflujo MexAB-oprM, MexXY-OprM, que posiblemente estén relacionadas con la resistencia alta identificada en nuestras cepas. Además, se identificaron mutaciones en los genes que interactúan con la expresión de las bombas de eflujo, como el sistema de dos componentes ParRS, la comparación se realizó con respecto a la cepa de referencia PAO1 ya que esta cepa presenta un fenotipo sensible y baja actividad de bombas de eflujo (Morita et al., 2001).

6.14.1. BOMBA DE EFLUJO MexAB-OprM

La bomba de eflujo MexAB-OprM, es una de las bombas de eflujo más importantes en *P. aeruginosa* debido a que está involucrada en la expulsión de diferentes grupos de antimicrobianos (Fernández & Hancock, 2012), en nuestras cepas se identificaron diferentes mutaciones tanto en los componentes estructurales (MexA, MexB y OprM) de la bomba de eflujo, como en los genes que codifican para proteínas involucradas en la red de regulación de esta bomba (MexR, ArmR, PA3720, NalC y NalD) (figura 19).

Figura 19. Red de regulación de la bomba de eflujo MexAB-OprM en la cepa de referencia PAO1.



Las flechas en color azul indican los genes estructurales de la bomba de eflujo MexAB-OprM, las flechas en verde indican los genes involucrados en la vía de regulación de la bomba. Las flechas en morado indican la formación de la proteína, los círculos naranjas representan la proteína. Las flechas en rojo indican represión. Los puntos indican el espacio intergénico donde se localizan los sitios de regulación transcripcional.

El gen *mexA* es el primer gen del operón de la bomba MexAB-OprM, tiene un tamaño de 1152 pb y codifica para la proteína de fusión de la membrana periplasmática de la bomba. La cepa Pa1242 fue la que presentó el mayor número de mutaciones a nivel de nucleótidos (15), mientras que, la cepa Pa1207 solamente presentó una mutación, por otra parte, las cepas aisladas de adultos presentaron de 6 a 11 mutaciones a lo largo del gen (tabla 4), todas las cepas compartieron la mutación de la posición 432 de una adenina por una guanina, esta mutación ya ha sido reportada en otras cepas clínicas, casi todas las mutaciones localizadas en este gen fueron mutaciones sinónimas por lo cual no hubo una afectación en la estructura o en la función de la proteína, la mayoría de estas mutaciones ya han sido reportadas anteriormente. Solamente las cepas Pa124 y Pa127 presentaron una mutación no descrita (A226-C) que dio lugar a un cambio de aminoácido por una sustitución de una lisina por una glutamina (K76-Q) en la posición 76 de la proteína (tabla 5), este

cambio se encuentra dentro del dominio α -hairpin que tiene la función de interactuar con la porina OprM para fusionar la bomba con este segmento (Akama et al., 2004), esta mutación no ha sido reportada y se desconoce cuál sería el cambio a nivel fenotípico, ya que dentro del dominio no forma parte de los aminoácidos de unión con la porina OprM.

Tabla 4. Mutaciones en el gen *mexA* (nucleótidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
G117-A	G117-A	G117-A	G117-A		
		A226-C	A226-C		
C249-T		C249-T	C249-T		
T333-C	T333-C	T333-C	T333-C		T333-C
A345-G	A345-G	A345-G	A345-G	A345-G	A345-G
C384-A		C384-A	C384-A		
G447-A	G447-A	G447-A	G447-A		G447-A
					C633-T
					A639-G
T655-C		T655-C	T655-C		T655-C
					G702-A
T729-C	T729-C	T729-C	T729-C		T729-C
					C732-T
					A738-G
					C780-T
					C789-G
					G792-A
	T1002-C	T1002-C	T1002-C		T1002-C
		T1095-C	T1095-C		T1095-C

En la tabla se observan los distintos polimorfismos identificados en el gen *mexA*, la primera letra representa el nucleótido en la cepa silvestre, el número indica la posición del nucleótido que presenta el cambio y la segunda letra indica al nucleótido presente en la cepa en estudio.

Tabla 5. Mutaciones en la proteína MexA (aminoácidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
		K76-Q	K76-Q		

En la tabla se observan los cambios de aminoácidos identificados en la proteína MexA, la primera letra representa el aminoácido en la cepa silvestre, el número indica la posición del aminoácido que presenta el cambio y la segunda letra indica el aminoácido presente en la cepa en estudio.

El gen *mexB* codifica para el componente de membrana interna de la bomba de eflujo MexAB-OprM, el gen tiene un tamaño de 3141 pb. Las cepas presentaron de 5 a 22 mutaciones a lo largo del gen, la mayoría de estas mutaciones son sinónimas y no afectaron a la estructura y/o función de la proteína (tabla 6), todas las cepas presentaron las mutaciones A495-G y T2730-C), mutaciones previamente reportadas en cepas de *P. aeruginosa*, mientras que, la cepa Pa58 fue la que presentó el mayor número de mutaciones específicas no reportadas (11). Solamente la cepa Pa58 presentó mutaciones no sinónimas en el extremo 3' del gen, la mutación G2870-A que produce un cambio de una glicina por un ácido aspártico (G957-D) esta mutación se encuentra entre los dominios transmembrana TM10 y TM11, esta mutación no ha sido reportada por lo que no se sabe si el cambio de carga de que confiere el ácido aspártico afecte al plegamiento de las α -hélice de los dominios transmembrana (Sennauser *et al.*, 2009). Además, la cepa Pa58 presentó la modificación del codón TCC por el codón GAG en las posiciones 3121 a 3123, esto modificó el aminoácido en la posición 1041 pasando de una serina a ácido glutámico (S1041-E) y en la posición 3125 se presentó una mutación de timina por citosina (T3125-C) modificando el aminoácido en la posición 1042 de una valina a una alanina (V1042-A)(Tabla 7), ambos cambios mutacionales están localizados en el extremo carboxilo terminal de la proteína y no forman parte de ningún dominio, estas mutaciones no han sido reportados en ninguna otra cepa por lo cual se desconoce cuál sea su función en la estructura de la proteína.

Tabla 6. Mutaciones en el gen *mexB* (nucleótidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
				C69-T	
		A351-G	A351-G		
A495-G	A495-G	A495-G	A495-G	A495-G	A495-G
C537-T					
G591-A					
C600-G					
				C621-T	
T642-C		T642-C	T642-C		
		C784-T	C784-T		
A804-C	A804-C	A804-C	A804-C		
					C909-T
G1287-A					
					G1362-A
T1749-C	T1749-C	T1749-C	T1749-C		
C1920-T					
A1938-G	A1938-G	A1938-G	A1938-G		
T2067-C	T2067-C	T2067-C	T2067-C		
A2079-G	A2079-G	A2079-G	A2079-G		
		T2226-C	T2226-C		
T2280-C	T2280-C	T2280-C	T2280-C	T2280-C	
T2730-C	T2730-C	T2730-C	T2730-C	T2730-C	T2730-C
G2870-A					
A2892-G		A2892-G	A2892-G		
				C2940-T	
C2949-T		C2949-T	C2949-T		
	G3117-A	G3117-A	G3117-A	G3117-A	G3117-A
G3120-T					
T3121-G					
C3122-A					
C3123-G					
T3125-C					

En la tabla se observan los distintos polimorfismos identificados en el gen *mexB*, la primera letra representa el nucleótido en la cepa silvestre, el número indica la posición del nucleótido que presenta el cambio y la segunda letra indica al nucleótido presente en la cepa en estudio.

Tabla 7. Mutaciones en la proteína MexB (aminoácidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
G957-D					
S1041-E					
V1042-A					

En la tabla se observan los cambios de aminoácidos identificados en la proteína MexB, la primera letra representa el aminoácido en la cepa silvestre, el número indica la posición del aminoácido que presenta el cambio y la segunda letra indica el aminoácido presente en la cepa en estudio.

El gen *oprM* codifica para la porina de la bomba de flujo MexAB-OprM, tiene un tamaño de 1458 pb. En este gen se encontraron en las cepas aisladas de adultos (Pa58, Pa84, Pa124 y Pa127) entre 16 a 22 mutaciones a lo largo del gen (tabla 8), sin embargo, todas estas mutaciones generan cambios sinónimos en la proteína, estas mutaciones ya han sido reportadas en otras cepas clínicas de *P. aeruginosa*. mientras que, las cepas aisladas niños (Pa1207 y Pa1242) presentaron de 2 a 3 mutaciones (tabla 8), las mutaciones encontradas en las cepas de niños no han sido reportadas aún y son específicas para estas cepas, estas mutaciones generan cambios no sinónimos en la proteína (tabla 9). En la cepa Pa1242 se encontró un cambio en la posición 781 de una guanina por una adenina (G781-A) generando una modificación en la secuencia de aminoácidos de una alanina por una treonina (A261-T), esta mutación se encuentra en un loop entre los dominios α -hélice H4 y H5 de la porina (Akama et al., 2004), al ser una mutación no reportada no se conoce la modificación a nivel de la estructura cuaternaria de la proteína, ya que ambos aminoácidos son hidrófobos. Por otra parte, en la cepa Pa1207 en la posición 1450 se identificó una deleción de una base (C1450- ∇) en el extremo 3' del gen lo cual hizo que el marco de lectura sufriera un desplazamiento provocando un alargamiento del gen de 1458 pb a 1665 pb, por lo tanto, generando una proteína más larga por la adición de 69 aminoácidos. Esta deleción provocó cambios en los últimos dos aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de la proteína, sustituyendo una glutamina por una arginina (Q484-R) y una alanina por una leucina (A485-L), estos cambios no han sido reportados en ninguna otra cepa de *P. aeruginosa*.

Tabla 8. Mutaciones en el gen *oprM* (nucleótidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
C7-A		C7-A	C7-A		
C63-T					
C253-T	C253-T	C253-T	C253-T		
G579-A	G579-A	G579-A	G579-A		
C585-T				C595-T	C595-T
G750-A	G750-A	G750-A	G750-A		
C768-T	C768-T	C768-T	C768-T		
					G781-A
T840-C	T840-C	T840-C	T840-C		
T903-C	T903-C	T903-C	T903-C		
		C975-T	C975-T		
A987-G		A987-G	A987-G		
T1017-C	T1017-C	T1017-C	T1017-C		
T1074-C	T1074-C	T1074-C	T1074-C		
G1143-C	G1143-C	G1143-C	G1143-C		
G1146-C	G1146-C	G1146-C	G1146-C		
C1167-T	C1167-T	C1167-T	C1167-T		
G1206-A	G1206-A	G1206-A	G1206-A		
					C1260-T
T1263-C	T1263-C	T1263-C	T1263-C		
T1353-C	T1353-C	T1353-C	T1353-C		
C1449-G	C1449-G	C1449-G	C1449-G		
				C1450-∇	
T1455-C	T1455-C	T1455-C	T1455-C		

En la tabla se observan los distintos polimorfismos identificados en el gen *oprM*, la primera letra representa el nucleótido en la cepa silvestre, el número indica la posición del nucleótido que presenta el cambio y la segunda letra indica al nucleótido presente en la cepa en estudio. La figura ∇ representa una delección.

Tabla 9. Mutaciones en la proteína OprM (aminoácidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
					A261-T
				Q484-R	
				A485-L	

En la tabla se observan los cambios de aminoácidos identificados en la proteína OprM, la primera letra representa el aminoácido en la cepa silvestre, el número indica la posición del aminoácido que presenta el cambio y la segunda letra indica el aminoácido presente en la cepa en estudio.

El gen *mexR* codifica para el represor transcripcional del operon de la bomba de eflujo MexAB-OprM, este gen tiene un tamaño de 444 pb. Solamente en las cepas de adultos (Pa58, Pa84, Pa124, Pa127) se identificaron de 4 a 5 mutaciones en el gen *mexR* (tabla 10), las cepas de niños (Pa1207 y Pa1242) presentan el mismo genotipo que la cepa silvestre (PAO1). Todas las mutaciones identificadas en este gen ya han sido reportadas por

otros autores. Las cepas Pa58, Pa124 y Pa127 presentaron las mismas 5 mutaciones (C264-T, G327-A, T377-A, G384-A y G411-A), mientras que la cepa Pa84 comparte 3 mutaciones con el resto de las cepas de adultos (T377-A, G384-A y G411-A) y presenta una mutación diferente (C223-T). Solamente la mutación T377-A generó un cambio no sinónimo a nivel de aminoácidos provocando un cambio de una valina por ácido glutámico en el aminoácido 126 (tabla 11), este cambio se encuentra en el carboxilo terminal de la proteína y ya ha sido reportado en otras cepas de *P. aeruginosa*, este cambio se asocia a un incremento en la resistencia a diferentes antimicrobianos (Vaez *et al.*, 2014), debido a que el cambio de carga generado por el ácido glutámico impide la formación del dímero en la estructura cuaternaria de la proteína (Wilke *et al.*, 2008).

Tabla 10. Mutaciones en el gen *mexR* (nucleótidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
	C223-T				
C264-T		C264-T	C264-T		
G327-A		G327-A	G327-A		
T377-A	T377-A	T377-A	T377-A		
G384-A	G384-A	G384-A	G384-A		
G411-A	G411-A	G411-A	G411-A		

En la tabla se observan los distintos polimorfismos identificados en el gen *mexR*, la primera letra representa el nucleótido en la cepa silvestre, el número indica la posición del nucleótido que presenta el cambio y la segunda letra indica al nucleótido presente en la cepa en estudio.

Tabla 11. Mutaciones en la proteína MexR (aminoácidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
V126-E	V126-E	V126-E	V126-E		

En la tabla se observan los cambios de aminoácidos identificados en la proteína MexR, la primera letra representa el aminoácido en la cepa silvestre, el número indica la posición del aminoácido que presenta el cambio y la segunda letra indica el aminoácido presente en la cepa en estudio.

El gen *armR* codifica para el péptido ArmR, el gen *armR* tiene un tamaño de 162 pb, el péptido ArmR actúa como un antirepresor de la proteína MexR, interactuando directamente con el represor MexR y formando un impedimento estérico que bloquea la unión con el sitio promotor de la bomba MexAB-OprM generando así una sobreexpresión de la bomba. En el gen *armR* se identificaron de 2 a 5 diferentes mutaciones (tabla 12), de las cuales 3 generaron cambios no sinónimos a nivel de la secuencia de aminoácidos (tabla

13). En la cepa Pa58 se identificaron las 5 mutaciones, en las posiciones 38 (C38-T), 48 (A48-G), 62 (G62-C), 84 (C84-T) y 95 (A95-G), de las cuales solamente 3 produjeron los siguientes cambios en la proteína, en la posición 13 de la secuencia de aminoácidos se sustituyó una treonina por una isoleucina (T13-I), en la posición 21 hubo un cambio de una serina por una treonina (S21-T) y en la posición 32 se sustituyó una tirosina por una cisteína (Y32-C), por otro lado, en las cepas Pa124 y Pa127 se identificaron 2 mutaciones en las posiciones 62 (G62-C) y 84 (C84-T) al igual que en la cepa Pa58. Se sabe que del aminoácido 29 al aminoácido 50 del péptido ArmR tienen una interacción directa con la proteína MexR (Wilke *et al.*, 2008), por lo cual, el cambio de tirosina por cisteína es el único que podría afectar esta interacción, sin embargo, ninguna de estas modificaciones ha sido reportadas aún.

Tabla 12. Mutaciones en el gen *armR* (nucleótidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
C38-T					
A48-G					
G62-C		G62-C	G62-C		
C84-T		C84-T	C84-T		
A95-G					

En la tabla se observan los distintos polimorfismos identificados en el gen *armR*, la primera letra representa el nucleótido en la cepa silvestre, el número indica la posición del nucleótido que presenta el cambio y la segunda letra indica al nucleótido presente en la cepa en estudio.

Tabla 13. Mutaciones en la proteína ArmR (aminoácidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
T13-I					
S21-T		S21-T	S21-T		
Y32-C					

En la tabla se observan los cambios de aminoácidos identificados en la proteína ArmR, la primera letra representa el aminoácido en la cepa silvestre, el número indica la posición del aminoácido que presenta el cambio y la segunda letra indica el aminoácido presente en la cepa en estudio.

El gen PA3720 codifica para una proteína hipotética que forma parte de un operón junto con el gen *armR*, el gen PA3720 tiene un tamaño de 426 pb y aún no se ha establecido cuál es su participación en la regulación de la expresión de la bomba MexAB-OprM. En tres de nuestras cepas se identificaron de 10 a 12 diferentes mutaciones (tabla 14), la mayoría de ellas producen cambios sinónimos en la proteína, sin embargo, 3 de estas mutaciones dieron lugar a cambios no sinónimos (tabla 15). Debido al poco estudio que tiene este gen

sobre la regulación de la bomba MexAB-OprM ninguna de las mutaciones identificadas en nuestras cepas ha sido reportadas, además, no se cuenta con una estructura cristalográfica para poder identificar los dominios de la proteína. En las cepas Pa58, Pa124 y Pa127 se encontró en la posición 130 un cambio mutacional de citosina por timina (C130-T) lo que ocasionó un cambio a nivel de aminoácidos de una arginina por una cisteína (R44-C), este cambio podría generar un plegamiento diferente en la proteína debido a que se podría formar un puente disulfuro entre esta cisteína y la cisteína en la posición 83 ya existente en la proteína. En las mismas cepas se encontró en el nucleótido 170 una mutación de una citosina por una adenina (C170-A) generando un cambio de una treonina por ácido glutámico en el aminoácido 57 (T57-E), al igual que la mutación anterior este cambio puede generar un cambio en el plegamiento de la proteína ya que el ácido glutámico confiera una carga negativa a la proteína, y finalmente, en las cepas Pa124 y Pa127 se identificó una mutación en la posición 239 de una timina por una citosina (T239-C) cambiando una valina por una alanina en la secuencia de aminoácidos (V80-A).

Tabla 14. Mutaciones en el gen PA3720 (nucleótidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
T46-C		T46-C	T46-C	T46-C	
G111-A		G111-A	G111-A		
C130-T		C130-T	C130-T		
G156-A		G156-A	G156-A		
A169-G		A169-G	A169-G		
C170-A		C170-A	C170-A		
G189-A		G189-A	G189-A		
G210-A					
		T239-C	T239-C		
A306-G		A306-G	A306-G		
T327-C					
C372-G					
A390-G		A390-G	A390-G		

En la tabla se observan los distintos polimorfismos identificados en el gen PA3720, la primera letra representa el nucleótido en la cepa silvestre, el número indica la posición del nucleótido que presenta el cambio y la segunda letra indica al nucleótido presente en la cepa en estudio.

Tabla 15. Mutaciones en la proteína PA3720 (aminoácidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
R44-C		R44-C	R44-C		
T57-E		T57-E	T57-E		
		V80-A	V80-A		

En la tabla se observan los cambios de aminoácidos identificados en la proteína PA3720, la primera letra representa el aminoácido en la cepa silvestre, el número indica la posición del aminoácido que presenta el cambio y la segunda letra indica el aminoácido presente en la cepa en estudio.

El gen *nalC* codifica para la proteína NalC, esta proteína actúa como un regulador transcripcional negativo del operón ArmR-PA3720, el represor NalC tiene un tamaño de 642 pb y juega un papel importante en la vía de regulación de la bomba MexAB-OprM, debido a que en condiciones silvestres bloquea la expresión del operón ArmR-PA3720 evitando la formación del péptido ArmR, el cual no puede interactuar con el represor MexR, logrando una disminución en la expresión de la bomba MexAB-OprM (Fernández & Hancock, 2012), es por esto que en cepas clínicas se han identificado un gran número de mutaciones en el gen *nalC* provocando que este gen sea afuncional y por lo tanto aumentando la sobreexpresión de la bomba MexAB-OprM (Braz *et al.*, 2016), sin embargo la estructura tridimensional de la proteína aún no se ha desarrollado. En las cepas Pa58, Pa124 y Pa127 se identificaron un mayor número de mutaciones (de 15 a 13 mutaciones), mientras que, en las cepas Pa84, Pa1207 y Pa1242 se encontraron de 2 a 3 mutaciones (tabla 16), sin embargo, solamente 3 mutaciones confirieron un cambio en la cadena de aminoácidos (tabla 17). Todas las cepas compartieron las mutaciones en las posiciones 212 (G212-A) y 625 (A625-C), generando el cambio de aminoácidos en las posiciones 71 (G71-E) y 209 (S209-R) de la proteína, estas mutaciones ya están bien caracterizadas y se sabe que aumentan hasta 3.8 veces la expresión de la bomba de eflujo MexAB-OprM haciendo más resistente a las cepas que presentan estos cambios mutacionales (Braz *et al.*, 2016). La cepa Pa58 presentó otro cambio no sinónimo en la posición 237 (T237-A) generando una sustitución del aminoácido ácido aspártico por ácido glutámico (D79E), esta mutación se localiza entre la α -hélice 4 y la α -hélice 5 de la proteína, sin embargo, el cambio en el plegamiento de la proteína probablemente presente una variación ya que ambos aminoácidos confieren carga negativa.

Tabla 16. Mutaciones en el gen *nalC* (nucleótidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
T12-G		T12-G	T12-G		
T15-C		T15-C	T15-C		
T69-C		T69-C	T69-C		T69-C
A123-T		A123-T	A123-T		
G129-A		G129-A	G129-A		
G147-A		G147-A	G147-A		
G177-A		G177-A	G177-A		
G212-A	G212-A	G212-A	G212-A	G212-A	G212-A
T237-A					
	G258-A				
C354-T		C354-T	C354-T		
G369-A					
T411-C		T411-C	T411-C		
T444-C		T444-C	T444-C		
T447-C		T447-C	T447-C		
A625-C	A625-C	A625-C	A625-C	A625-C	A625-C

En la tabla se observan los distintos polimorfismos identificados en el gen *nalC*, la primera letra representa el nucleótido en la cepa silvestre, el número indica la posición del nucleótido que presenta el cambio y la segunda letra indica al nucleótido presente en la cepa en estudio.

Tabla 17. Mutaciones en la proteína NalC (aminoácidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
G71-E	G71-E	G71-E	G71-E	G71-E	G71-E
D79-E					
S209-R	S209-R	S209-R	S209-R	S209-R	S209-R

En la tabla se observan los cambios de aminoácidos identificados en la proteína NalC, la primera letra representa el aminoácido en la cepa silvestre, el número indica la posición del aminoácido que presenta el cambio y la segunda letra indica el aminoácido presente en la cepa en estudio.

La regulación de la bomba de eflujo MexAB-OprM es compleja debido a que la cascada de regulación presenta vías alternas que pueden modular la sobreexpresión o la represión de la bomba. El gen *nalD* que tiene un tamaño de 639 pb y codifica para la proteína NalD, la cual, actúa como un represor transcripcional de la bomba de eflujo MexAB-OprM ya que se une a un segundo sitio promotor de la bomba, entre el sitio promotor al que se une el represor MexR y el inicio de la transcripción del gen *mexA* (Morita et al., 2006). Solamente en las cepas de adultos (Pa58, Pa84, Pa124 y Pa127) se identificaron de 1 a 4 mutaciones diferentes en este gen (tabla 18). Sin embargo, todas las mutaciones son sinónimas y no generan cambios de aminoácidos. Estas mutaciones ya han sido reportadas previamente en otras cepas de *P. aeruginosa*.

Tabla 18. Mutaciones en el gen *nalD* (nucleótidos)

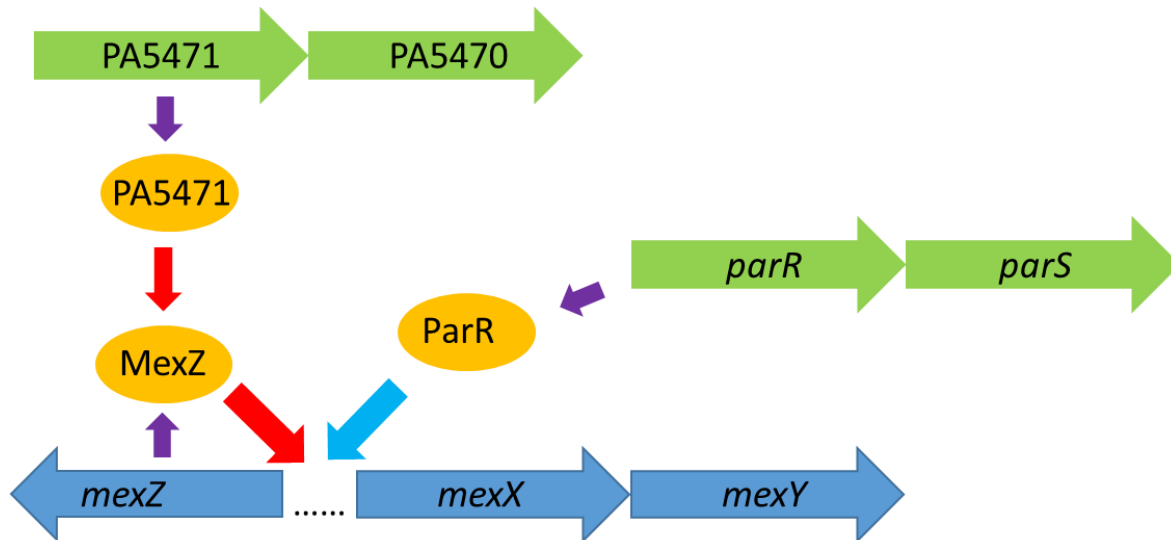
Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
G78-A					
		C169-T	C169-T		
T295-C		T295-C	T295-C		
T450-C					
G477-A					
	T555-C				

En la tabla se observan los distintos polimorfismos identificados en el gen *nalD*, la primera letra representa el nucleótido en la cepa silvestre, el número indica la posición del nucleótido que presenta el cambio y la segunda letra indica al nucleótido presente en la cepa en estudio.

6.14.2. BOMBA DE EFLUJO MexXY-OprM

La bomba de eflujo MexXY-OprM es la única bomba reportada en *P. aeruginosa* que está involucrada en la expulsión de aminoglucósidos (Fernández & Hancock, 2012; Gurjeet Singh Kohli, 2018; Sobel et al., 2005), por lo cual es de gran relevancia en cepas clínicas debido a que este grupo de antibióticos son utilizados para el tratamiento de infecciones adquiridas en el hospital (Ratjen et al., 2009), en nuestras cepas se identificaron diferentes mutaciones tanto en los componentes estructurales de la bomba de eflujo MexXY-OprM, como en genes que codifican para proteínas involucradas en la red de regulación de esta bomba (figura 20).

Figura 20. Red de regulación de la bomba de eflujo MexXY en la cepa PAO1.



Las flechas en color azul indican los genes estructurales de la bomba de eflujo MexXY, las flechas en verde indican los genes involucrados en la vía de regulación de la bomba. Las flechas en morado indican la formación de la proteína, los círculos naranjas indican la proteína. La flecha celeste indica activación. Las flechas en rojo indican represión. Los puntos indican el espacio intergénico donde se localizan los sitios de regulación transcripcional.

El gen *mexX* es el primer gen del operón MexXY de la bomba de eflujo MexXY-OprM, este gen tiene un tamaño de 1191 pb y codifica para la proteína de unión periplasmática MexX. En nuestras cepas se encontraron de 6 a 7 diferentes mutaciones a lo largo del gen (tabla 19), la mayoría de las mutaciones generaron cambios sinónimos excepto 5 mutaciones (tabla 20), estos cambios de aminoácidos de la cadena peptídica se observaron en los extremos de la proteína (N-terminal y C-terminal). Todas las cepas compartieron las mutaciones en las posiciones 985 (A985-C), 997 (T997-G) y 1072 (T1072-C), estas mutaciones son no sinónimas y produjeron modificaciones en la proteína en la región carboxilo terminal modificando los aminoácidos 329 (K329-Q), 331 (L331-V) y 358 (W358-R), estos aminoácidos se encuentran dentro del dominio $\alpha+\beta$ de la proteína, el cual está encargado de fijar a la proteína de membrana interna a la bomba de eflujo, de los tres cambio encontrados el único que podría causar un cambio es la mutación W358-R9, aunque ambos aminoácidos son polares, el triptófano es un aminoácido aromático mientras que la arginina no lo es y presenta carga positiva pudiendo modificar el plegamiento de la proteína, en las otras dos mutaciones el cambio de lisina por glutamina no afectaría tanto ya que ambos aminoácidos son polares, de igual forma en el cambio de leucina por valina ambos aminoácidos son alifáticos y no polares. En la cepa Pa84 se encontró una mutación en la posición 12 de una adenina por una citosina (A12-C) que generó un cambio de una glutamina por una histidina (Q4-H), esta mutación está localizada en el extremo amino terminal de la proteína. Mientras que, en la cepa Pa58 se identificó una mutación en la posición 88 de una guanina por una adenina (G88-A) produciendo un cambio del aminoácido alanina por treonina (A30-T), esta mutación se encuentra entre el primer dominio β (β -1) y el extremo amino terminal de la proteína, muy probablemente este cambio afecte el plegamiento de la proteína debido a que la alanina es una aminoácido no polar mientras que la treonina es una aminoácido polar y esta región de la proteína MexX es la encargada de unirse con la proteína MexY pudiendo generar un desacoplamiento de ambas proteínas.

Tabla 19. Mutaciones en el gen *mexX* (nucleótidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
	A12-C				
G88-A					
T147-C		T147-C	T147-C		
T198-C		T198-C	T198-C		T198-C
T201-G		T201-G	T201-G		T201-G
	C264-T				
	T558-C	T558-C	T558-C		
				G606-T	
A985-C	A985-C	A985-C	A985-C	A985-C	A985-C
T991-G	T991-G	T991-G	T991-G	T991-G	T991-G
	C1035-T			C1035-T	C1035-T
T1072-C	T1072-C	T1072-C	T1072-C	T1072-C	T1072-C
					C1110-T
					C1173-G

En la tabla se observan los distintos polimorfismos identificados en el gen *mexX*, la primera letra representa el nucleótido en la cepa silvestre, el número indica la posición del nucleótido que presenta el cambio y la segunda letra indica al nucleótido presente en la cepa en estudio.

Tabla 20. Mutaciones en la proteína MexX (aminoácidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
	Q4-H				
A30-T					
K329-Q	K329-Q	K329-Q	K329-Q	K329-Q	K329-Q
L331-V	L331-V	L331-V	L331-V	L331-V	L331-V
W358-R	W358-R	W358-R	W358-R	W358-R	W358-R

En la tabla se observan los cambios de aminoácidos identificados en la proteína MexX, la primera letra representa el aminoácido en la cepa silvestre, el número indica la posición del aminoácido que presenta el cambio y la segunda letra indica el aminoácido presente en la cepa en estudio.

El gen *mexY* codifica para el componente de membrana interna de la bomba de eflujo MexXY-OprM, el gen tiene un tamaño de 3138 pb. En este gen se identificaron de 5 a 28 mutaciones, siendo la cepa Pa58 la que presentó el mayor número de mutaciones (28) y la cepa Pa84 el menor número de mutaciones (5) (tabla 21), todas las cepas compartieron la mutación C1512-T, la mayoría de estas mutaciones son sinónimas. La mayoría de las mutaciones que causaron cambios no sinónimos en la proteína se encuentran de la región media hacia el extremo carboxilo terminal (tabla 22). En la cepa Pa58 se identificaron 4 mutaciones no sinónimas en la proteína, solamente en esta cepa se encontraron las mutaciones I536-V y G589-A, estas mutaciones se localizan en el dominio transmembrana TM7 de la proteína y muy probablemente estos cambios no afecten ni la estructura ni el plegamiento de la proteína ya que ambas sustituciones son no polares, la mutación Q840-

E fue localizada en las cepas Pa58, Pa84, Pa1207 y Pa1242, esta mutación se encuentra en el dominio PC2 que conforma el poro de la proteína, siendo uno de los dominios más importantes debido a que por ahí se transporta el gradiente de electrones para realizar el eflujo, este cambio podría afectar la función de la proteína ya que el ácido glutámico confiere carga negativa, la mutación N1036-T fue identificada en las cepas Pa58, Pa124 y Pa127 dentro del extremo carboxilo terminal, sin embargo, el cambio de aminoácidos podría no afectar a la proteína ya que tanto la asparagina como la treonina son aminoácidos polares. En las cepas Pa124 y Pa127 se localizó la mutación G1039-R, a pesar de que ambos aminoácidos son polares la arginina posee carga positiva pudiendo hacer un cambio en el plegamiento de la proteína. Finalmente, la cepa Pa127 presentó una delección de una citosina en la posición 1466, esta delección provocó un cambio en el marco de lectura del gen provocando un desplazamiento de las bases que derivó en una modificación de la secuencia de aminoácidos de la posición 489 a la 519, además, se identificó una inserción de 4 bases (TGAC) en la secuencia de nucleótidos de la base 1562 a la base 1565, esta inserción generó un codón de paro prematura en la posición 520 lo que dio lugar a una proteína de menor tamaño (520 aminoácidos) y a la pérdida de los dominios de formación del poro y de unión a la proteína de membrana externa, por lo que no se puede llevar a cabo el correcto ensamblaje y funcionamiento de la bomba de eflujo en esta cepa.

Tabla 21. Mutaciones en el gen *mexY* (nucleótidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
	G126-A				
				C261-T	
A357-G		A357-G	A357-G		
C381-T		C381-T	C381-T	C381-T	
					G408-A
T417-C		T417-C	T417-C		
T423-C		T423-C	T423-C		
G456-A		G456-A	G456-A	G456-A	
		C579-T	C579-T		
A741-G				A741-G	
C771-A					
A846-G	A846-G			A846-G	A846-G
A1104-G		A1104-G	A1104-G		
G1116-A					
G1128-C		G1128-C	G1128-C		
				G1282-A	
G1317-T					G1317-T

G1353-A						G1353-A
			C1466-∇			
G1494-A						
C1512-T	C1512-T	C1512-T	C1512-T	C1512-T	C1512-T	C1512-T
			1562-1565-ΔTGAC			
A1606-G						
		C1680-T				
						C1734-T
G1766-C						
C1770-T						
C1773-T						
C1773-A						
		G1989-A				
		T2010-C				
C2118-T					C2118-T	
T2199-C	T2199-C	T2199-C				T2199-C
						G2283-A
G2379-C		G2379-C				G2379-C
G2382-C		G2382-C				G2382-C
C2518-G	C2518-G				C2518-G	C2518-G
						G2556-A
		T2626-C				
A2709-G		A2709-G				
T2742-C						T2742-C
						C2887-T
G3084-A		G3084-A				G3084-A
		A3116-G				

En la tabla se observan los distintos polimorfismos identificados en el gen *mexY*, la primera letra representa el nucleótido en la cepa silvestre, el número indica la posición del nucleótido que presenta el cambio y la segunda letra indica al nucleótido presente en la cepa en estudio. La figura ∇ representa una delección. La figura Δ representa una inserción.

Tabla 22. Mutaciones en la proteína MexY (aminoácidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
				D428-N	
			P489-R		
			A490-P		
			L491-C		
			C492-A		
			A493-P		
			T494-P		
			L495-C		
			L496-C		
			R497-A		
			P498-R		
			I499-S		
			D500-T		
			A501-P		
			D502-T		
			H503-T		
			H504-M		
			E505-R		

				K506-S
				R507-A
				G508-A
				F509-S
				F510-S
				G511-A
				W512-G
				F513-S
				N514-T
				R515-A
				A516-P
				F517-S
				L518-C
				R519-A
				L520-*
I536-V				
G589-A				
Q840-E	Q840-E		Q840-E	Q840-E
N1036-T		N1036-T		
		Q1039-R		

En la tabla se observan los cambios de aminoácidos identificados en la proteína MexY, la primera letra representa el aminoácido en la cepa silvestre, el número indica la posición del aminoácido que presenta el cambio y la segunda letra indica el aminoácido presente en la cepa en estudio. El asterisco (*) representa un codón de paro.

El gen *mexZ* codifica para el represor transcripcional del operón de la bomba de eflujo MexXY-OprM, este gen tiene un tamaño de 633 pb. En nuestras cepas se identificaron de 3 a 10 mutaciones (tabla 23), todas las cepas compartieron la mutación A438-G. En las cepas Pa58, Pa124, Pa127 y Pa1242 se identificaron mutaciones no sinónimas, cada una de las cepas presentó mutaciones específicas (tabla 24). En la cepa Pa58 se encontraron 3 mutaciones no sinónimas (D89-S, E98-D y L99-M) dentro del dominio carboxilo terminal en el α -hélice 5, ninguna de estas mutaciones ha sido previamente caracterizada. Además de estas tres mutaciones en la cepa Pa58 se encontró una deleción del nucleótido 296 al nucleótido 316 eliminando 7 aminoácidos de la proteína, generando una proteína más corta, esta deleción se encuentra en una región importante para la formación del dímero. Las cepas Pa124 y Pa127 presentaron las mismas mutaciones en el gen *mexZ*, solo dos de ellas fueron mutaciones no sinónimas, generando los cambios D83-E y L138-R, ambas mutaciones se encuentran dentro del dominio carboxilo terminal de la proteína, la primera mutación en el α -hélice 5 y la segunda en el α -hélice 7, además estas dos cepas presentaron una deleción del nucleótido 566 al nucleótido 583 eliminando 6 aminoácidos de la proteína,

formando una proteína más corta y modificando el α -hélice 8 el cual es requerido en la interacción entre los dos monómeros que conforman la estructura cuaternaria de la proteína. Finalmente, en la cepa Pa1242 solamente se localizó una mutación no sinónima en la posición 174 de la cadena peptídica (L174-Q), esta mutación esta se encuentre al final del α -hélice 8, esto podría causar un mal plegamiento entre los dos monómeros ya que la glutamina es un aminoácido polar mientras que la leucina es un aminoácido no polar.

Tabla 23. Mutaciones en el gen *mexZ* (nucleótidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
C93-T	C93-T	C93-T	C93-T		
T249-C		T249-G	T249-G		
G265-A					
G294-T					
C295-A					
296-316-∇					
		C333-A	C333-A		
T367-C		T367-C	T367-C		
	C372-T				
		T413-G	T413-G		
		A414-C	A414-C		
A438-G	A438-G	A438-G	A438-G	A438-G	A438-G
					T521-A
		566-583-∇	566-583-∇		
				C576-T	
				C585-A	
		G615-C	G615-C		
					C630-A

En la tabla se observan los distintos polimorfismos identificados en el gen *mexZ*, la primera letra representa el nucleótido en la cepa silvestre, el número indica la posición del nucleótido que presenta el cambio y la segunda letra indica al nucleótido presente en la cepa en estudio. La figura ∇ representa una delección.

Tabla 24. Mutaciones en la proteína MexZ (aminoácidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
		D83-E	D83-E		
G89-S					
E98-D					
99-105-∇					
L99-M					
		L138-R	L138-R		
					L174-Q
		187-192-∇	187-192-∇		

En la tabla se observan los cambios de aminoácidos identificados en la proteína MexZ, la primera letra representa el aminoácido en la cepa silvestre, el número indica la posición del aminoácido que presenta el cambio y la segunda letra indica el aminoácido presente en la cepa en estudio. La figura ∇ representa una delección.

La bomba de eflujo MexXY-OprM presenta un sistema de regulación global además de la proteína MexZ que actúa como un represor transcripcional, se ha demostrado que el operón ArmZ-PA5470 tiene una importante contribución en la regulación de esta bomba de eflujo, el gen *armZ* que tiene un tamaño de 1140 pb y codifica para una proteína RNA ligasa de la familia RtcB, esta proteína interactúa con el transcrito del gen *mexZ* impidiendo la formación de la proteína MexZ y por lo tanto evitando la represión de la bomba de eflujo MexXY-OprM. En nuestras cepas se encontraron de 13 a 28 mutaciones a lo largo del gen (tabla 25), siendo las cepas Pa58, Pa124 y Pa127 las que presentaron un mayor número de mutaciones, además de tener casi los mismos polimorfismos entre ellas, solamente difiriendo en la mutación C111-T presente en la cepa Pa58 y la mutación T891-G presente en las cepas Pa124 y Pa127. Todas las cepas presentaron las mutaciones T263-C, T728-C y T813-C. La mayoría de las mutaciones generaron cambios sinónimos en la proteína, solo 8 mutaciones generaron mutaciones no sinónimas en la proteína (tabla 26).

Todas las cepas compartieron los cambios de aminoácidos en las posiciones L88-P y V243-A, estos cambios se localizan, el primero entre la β -plegada 5 y el α -hélice 2 y la segunda mutación en la β -plegada 9. Las cepas Pa58, Pa124 y Pa127 compartieron las mismas mutaciones no sinónimas (C40-R, L88-P, S112-N, D119-E, I237-V y V243-A), la mutación C40-R se localiza en la β -plegada 2 y podría causar un plegamiento diferente de la proteína ya que la sustitución de cisteína podría eliminar algún puente disulfuro formado en la estructura silvestre, la mutación S112-N se encuentra en el asa entre las α -hélice 2 y 3, sin embargo ambos aminoácidos pertenecen al mismo grupo por lo cual esta sustitución podría no causar una alteración en la estructura de la proteína, la mutación D119-E se encuentra en el α -hélice 3, este cambio no afectaría la estructura debido a que ambos aminoácidos confieren carga negativa a la proteína, la mutación I237-V está localizada adyacente a la β -plegada 8, esta mutación en la cepa silvestre se encuentra en la β -plegada 8 por lo que en las cepas Pa58, Pa124 y Pa127 el cambio de isoleucina por valina provoca que la β -plegada 8 se haga más corta. Por otro lado, las cepas Pa84, Pa1207 y Pa1242 compartieron 3 mutaciones no sinónimas. La mutación H182-Q se encuentra dentro del α -hélice 5 de la proteína y aparentemente no ocurre un cambio en la estructura secundaria a

pesar de que la histidina es un aminoácido aromático y con carga positiva. Finalmente, las cepas aisladas de niños (Pa1207 y Pa1242) presentaron una mutación no sinónima en la posición 161 (D161-G), esta mutación está en el asa entre el α -hélice 4 y la β -plegada 7, esta mutación muy probablemente afecte el plegamiento de la proteína debido a que el ácido aspártico confiere carga negativa, además de ser un aminoácido polar, mientras que la glicina es un aminoácido no polar. Ninguna de las mutaciones localizadas en nuestras cepas ha sido reportadas previamente, por lo que no se sabe cuál sería su repercusión sobre el fenotipo de las cepas.

Tabla 25. Mutaciones en el gen *armZ* (nucleótidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
C27-T					
A105-G	A105-G	A105-G	A150-G		A105-G
C111-T					
T118-C		T118-C	T118-C		
C153-T					
T192-C	T192-C	T192-C	T192-C		
T201-C					
					C240-A
T263-C	T263-C	T263-C	T263-C	T263-C	T263-C
G335-A					
C339-T					
T357-G	T357-G	T357-G	T357-G		
A360-G					
C408-T	C408-T	C408-T	C408-T		A360-G
G420-A					
G438-C		G438-C	G438-C	G438-C	G438-C
T453-C					
A482-G					
T483-C					
C507-T					
	G519-T			G519-T	G519-T
G543-A					
	T546-G			T546-G	T546-G
C558-T					
C612-G		C612-G	C612-G		
C625-T					
C672-A					
A709-G		A709-G	A709-G		
T728-C	T728-C	T728-C	T728-C	T728-C	T728-C
C795-T					
T813-C	T813-C	T813-C	T813-C	T813-C	T813-C
T846-C					
T891-G					
T915-C		T915-C	T915-C		
G921-A					

T924-C	T924-C	T924-C		
T952-C	T952-C	T952-C		
T960-C	T960-C	T960-C		
C972-T	C972-T	C972-T		
	C976-A		C976-A	C976-A
T987-C	T987-C	T987-C		
	G999-A		G999-A	G999-A

En la tabla se observan los distintos polimorfismos identificados en el gen *armZ*, la primera letra representa el nucleótido en la cepa silvestre, el número indica la posición del nucleótido que presenta el cambio y la segunda letra indica al nucleótido presente en la cepa en estudio.

Tabla 26. Mutaciones en la proteína ArmZ (aminoácidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
C40-R		C40-R	C40-R		
L88-P	L88-P	L88-P	L88-P	L88-P	L88-P
S112-N	S112-N	S112-N	S112-N		
D119-E	D119-E	D119-E	D119-E		
				D161-G	D161-G
	H182-Q			H182-Q	H182-Q
I237-V		I237-V	I237-V		
V243-A	V243-A	V243-A	V243-A	V243-A	V243-A

En la tabla se observan los cambios de aminoácidos identificados en la proteína ArmZ, la primera letra representa el aminoácido en la cepa silvestre, el número indica la posición del aminoácido que presenta el cambio y la segunda letra indica el aminoácido presente en la cepa en estudio.

El gen PA5470 forma parte del operón ArmZ-PA5470, este gen tiene un tamaño de 615 pb y codifica para un factor de liberación de la cadena peptídica H, esta proteína reconoce los codones de terminación e interfiere con la enzima que forma los enlaces peptídicos adicionando una molécula de agua al último aminoácido de la cadena, favoreciendo la liberación de la proteína, aún se desconoce cuál es la función de esta proteína en la resistencia conferida por la bomba de eflujo MexXY-OprM. En nuestras cepas se identificaron 1 a 13 mutaciones, la cepa Pa84 no presentó ninguna mutación (tabla 27). La cepa Pa58 fue la que presentó el mayor número de mutaciones (13), mientras que el resto de las cepas solo presentaron 1 o dos mutaciones. La mutación más frecuente fue G545-A identificada en 4 cepas (Pa58, Pa124, Pa127 y Pa1242). La cepa Pa58 fue la que presentó más cambios no sinónimos (5) (tabla 28). La primera mutación (I40-L) se encuentra en la segunda β -plegada de la proteína y no afecta la estructura ya que la leucina y la isoleucina son isómeros; la mutación T61-I está localizada en un asa entre la β -plegada 3 y la α -hélice 2, esta mutación podría causar un giro diferente debido a que la treonina es un aminoácido polar mientras que, la isoleucina es un aminoácido no polar; la mutación R69-

H se encuentra en el α -hélice 2, este cambio podría no afectar a la proteína ya que ambos aminoácidos son polares y tiene carga positiva; la mutación P79-T está ubicada en un asa entre las β -plegadas 4 y 5, esta sustitución podría genera un giro diferente en la proteína ya que la prolina es un aminoácido no polar mientras que, la treonina es un aminoácido polar; la mutación R182-Q que fue identificada en 4 cepas (Pa58, Pa124, Pa127 y Pa1242) se encuentra al final de la tercer α -hélice de la proteína pudiendo generar una giro diferente ya que a pesar de que ambos aminoácidos son polares la arginina tiene carga positiva. Sola la cepa Pa1207 presentó la mutación T127-S, esta mutación se encuentra en un asa entre las β -plegadas 7 y 8, sin embargo, el cambio podría no generar alteraciones en la estructura de la proteína ya que ambos aminoácidos pertenecen al mismo grupo. Al ser un gen que un no se ha estudiado demasiado las mutaciones que nosotros encontramos no han sido reportadas aún.

Tabla 27. Mutaciones en el gen PA5470 (nucleótidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
G33-C					
A117-G					
A118-C					
C135-T					
C182-T					
G206-A					
					G225-A
C235-A					
C240-T					
A252-G					
T312-C					
				C380-G	
C475-T					
G545-A		G545-A	G545-A		G545-A
T555-C		T555-C	T555-C		

En la tabla se observan los distintos polimorfismos identificados en el gen PA5470, la primera letra representa el nucleótido en la cepa silvestre, el número indica la posición del nucleótido que presenta el cambio y la segunda letra indica al nucleótido presente en la cepa en estudio.

Tabla 28. Mutaciones en la proteína PA5470 (aminoácidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
I40-L					
T61-I					
R69-H					
P79-T					
				T127-S	
R182-Q		R182-Q	R182-Q		R182-Q

En la tabla se observan los cambios de aminoácidos identificados en la proteína PA5470, la primera letra representa el aminoácido en la cepa silvestre, el número indica la posición del aminoácido que presenta el cambio y la segunda letra indica el aminoácido presente en la cepa en estudio.

Otro operón involucrado en la regulación de la bomba de eflujo MexXY-OprM es el operón ParR-ParS, este operón codifica para un sistema regulador de dos componentes de tipo histidina-quinasa, este operón regula la bomba de eflujo de manera positiva estimulando su sobreexpresión. Además de regular la expresión de la bomba de eflujo MexXY-OprM también se le ha relacionado con la expresión del lipopolisacárido y por lo tanto con la resistencia a polimixina B y colistina.

El gen *parR* tiene un tamaño de 708 pb y codifica para el regulador de respuesta del sistema de dos componentes. En nuestras cepas se identificaron de 4 a 11 mutaciones diferentes, se observaron tres patrones de mutación diferentes entre nuestras cepas. Pa58, Pa124 y Pa127 presentan un patrón de mutaciones similar, mientras que las dos cepas aisladas de niños (Pa1207 y Pa1242) comparten las mismas mutaciones, solo la cepa Pa84 presentó un patrón específico (tabla 29). Todas las cepas compartieron las mutaciones G387-C, T567-C y T660-C, la mayoría de las mutaciones identificadas generan cambios sinónimos en la proteína, solo las cepas Pa58, Pa124 y Pa127 presentaron las mismas 2 mutaciones no sinónimas (tabla 30), el resto de las cepas se mantuvieron como la cepa silvestre. La mutación L153-R se identificó dentro del dominio unión a DNA, en la β -plegadas 8 de la proteína, esta modificación podría cambiar la interacción de la proteína con el DNA ya que la arginina posee carga positiva y es un aminoácido polar, mientras que, la leucina es un aminoácido alifático y no polar. La mutación S170-N también se ubica dentro del dominio de unión a DNA, al final del α -hélice 6, esta mutación podría no causar cambios en la estructura ya que ambos aminoácidos pertenecen al mismo grupo. Estas dos mutaciones no han sido reportadas en ninguna otra cepa.

Tabla 29. Mutaciones en el gen *parR* (nucleótidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
C66-T					
T72-C		T72-C	T72-C		
	C114-A				
C135-T		C135-T	C135-T		
	G150-A				
C270-T					
	C282-T				
G387-C	G387-C	G387-C	G387-C	G387-C	G387-C
T458-G		T458-G	T458-G		
C465-A		C465-A	C465-A		
G509-A		G509-A	G509-A		
	T528-C				
T567-C	T567-C	T567-C	T567-C	T567-C	T567-C
				G642-A	G642-A
T660-C	T660-C	T660-C	T660-C	T660-C	T660-C
G702-A		G702-A	G702-A		

En la tabla se observan los distintos polimorfismos identificados en el gen *parR*, la primera letra representa el nucleótido en la cepa silvestre, el número indica la posición del nucleótido que presenta el cambio y la segunda letra indica al nucleótido presente en la cepa en estudio.

Tabla 30. Mutaciones en la proteína ParR (aminoácidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
L153-R		L153-R	L153-R		
S170-N		S170-N	S170-N		

En la tabla se observan los cambios de aminoácidos identificados en la proteína ParR, la primera letra representa el aminoácido en la cepa silvestre, el número indica la posición del aminoácido que presenta el cambio y la segunda letra indica el aminoácido presente en la cepa en estudio.

El gen *parS* tiene un tamaño de 1287 pb y codifica para el sensor de histidina-quinasa del sistema de dos componentes. En nuestras cepas se identificaron de 4 a 13 mutaciones a lo largo del gen. La cepa Pa58 fue la cepa que presentó más mutaciones (13). Todas las cepas compartieron la mutación A1193-G (tabla 31), las cepas Pa124 y Pa127 presentaron las mismas mutaciones. La mayoría de las mutaciones encontradas en el gen *parS* generaron cambios sinónimos en la proteína, solamente se localizaron 3 cambios no sinónimos en la proteína (tabla 32). La mutación D68-E solo se identificó en la cepa Pa1242, este cambio se encuentra en el dominio transmembrana, en la tercer α -hélice de la proteína, esta sustitución podría no cambiar la estructura ya que ambos aminoácidos pertenecen al mismo grupo y poseen carga negativa; la mutación T387-I se encontró solo en la cepa Pa1207 en el dominio histidina-quinasa, en un asa entre el α -hélice 10 y la β -plegada 9, este cambio

podría generar un giro diferente de la proteína ya que la isoleucina es un aminoácido no polar, mientras que, la treonina es polar. Todas las cepas poseen la mutación H398-R que se encuentra en el dominio histidina-quinasa dentro del sitio de unión al ATP, en el α -hélice 10, este cambio no afectaría a la estructura o al plegamiento de la proteína ya que ambos aminoácidos pertenecen al mismo grupo, además, esta alteración no modifica a ninguno de los aminoácidos de unión al ATP. Ninguna de estas sustituciones ha sido reportada en cepas de *P. aeruginosa*.

Tabla 31. Mutaciones en el gen *parS* (nucleótidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
	G33-A				
C51-T		C51-T	C51-T		
					C204-G
C318-T					
C348-T		C348-T	C348-T		
A354-G	A354-G	A354-G	A354-G		
		C355-T	C355-T		
A399-G		A399-G	A399-G		
C519-T		C519-T	C519-T		
C561-T	C561-T	C561-T	C561-T		
T630-C		T630-C	T630-C		
T759-C		T759-C	T759-C		
				C954-A	C954-A
A978-C		A978-C	A978-C		
C991-A					
T1005-C					
				C1160-T	
A1193-G	A1193-G	A1193-G	A1193-G	A1193-G	A1193-G
				G1245-A	G1245-A

En la tabla se observan los distintos polimorfismos identificados en el gen *parS*, la primera letra representa el nucleótido en la cepa silvestre, el número indica la posición del nucleótido que presenta el cambio y la segunda letra indica al nucleótido presente en la cepa en estudio.

Tabla 32. Mutaciones en la proteína ParS (aminoácidos)

Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
					D68-E
				T387-I	
H398-R	H398-R	H398-R	H398-R	H398-R	H398-R

En la tabla se observan los cambios de aminoácidos identificados en la proteína ParS, la primera letra representa el aminoácido en la cepa silvestre, el número indica la posición del aminoácido que presenta el cambio y la segunda letra indica el aminoácido presente en la cepa en estudio.

6.15. RELACIÓN GENÉTICA Y FENOTÍPICA DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA Y MUTACIONES EN BOMBAS DE EFLUJO

Además de los genes de resistencia adquiridos en elementos móviles, otro factor que contribuye en la resistencia a un gran número de agentes antimicrobianos, son las bombas de eflujo, en nuestras cepas se identificaron diferentes mutaciones, algunas de ellas afectan directamente la estructura y/o funcionalidad de alguno de los componentes que conforman la bomba de eflujo o proteínas relacionadas con la regulación de estas.

De las seis cepas secuenciadas, la cepa Pa58, Pa124 y Pa127 fueron las que registraron el mayor número de sustituciones, en estas tres cepas se registraron deleciones importantes en los genes *mexR* y *mexZ*, los cuales son componentes de regulación de ambas bombas de eflujo, evitando la represión de las bombas de eflujo e incrementando su expresión. De acuerdo con los perfiles de resistencia a antimicrobianos, estas tres cepas presentaron una extensiva multidrogo resistencia, a 19 de los 20 antimicrobianos probados, pudiendo favorecer el uso de bombas de eflujo por parte de la bacteria para incrementar esta resistencia.

En el caso de la cepa Pa1207 que no presentó genes asociados a la resistencia de aminoglucósidos se identificó una deleción del extremo 3' del gen *oprM* que codifica para la porina que comparten ambas bombas de eflujo, esta deleción podría impedir la correcta formación de la porina y por lo tanto el correcto funcionamiento de ambas bombas, evitando así el paso del antimicrobiano.

Tanto la cepa Pa84, como la cepa Pa1242, no presentaron modificaciones importantes ni en los componentes estructurales de las bombas de flujo ni en las proteínas de la cascada de regulación por lo que se explica su baja o nula resistencia a antimicrobianos.

7. DISCUSIÓN

A principios de los años 90 se comenzó con el estudio del genoma de la especie *P. aeruginosa* debido a su gran importancia en infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos, estos estudios mostraron primeramente que esta especie presentaba muy pocos grupos clonales circulando alrededor del mundo (Romling et al., 1994), y que estas clonas compartían fragmentos sinténicos de gran tamaño en el genoma. Sin embargo, había regiones que no eran compartidas por todo el grupo clonal o que eran específicas de cepa (Romling et al., 1994; Römling et al., 1997). A estas zonas dentro del genoma se les denominó zonas de plasticidad y correspondían a fragmentos de DNA adquirido mediante procesos de transferencia horizontal (Dunning Hotopp, 2011; Kung et al., 2010). Entre los elementos mayormente encontrados en esas zonas de plasticidad se destacan las islas genómicas. Los estudios realizados en Alemania suponían que en una cepa de *P. aeruginosa* podía existir un máximo de 3 islas genómicas coexistiendo en el mismo genoma (Romling et al., 1994; Römling et al., 1997). Sin embargo, en dos estudios realizados en México (de los cuales son derivadas las cepas en estudio de este trabajo) se demostró que existen hasta 7 islas genómicas en un mismo genoma (Morales-Espinosa et al., 2012, 2017), estableciendo así que pueden existir diferentes sitios dentro del genoma de *P. aeruginosa* donde se pueden insertar MGE.

En este trabajo se encontró, mediante técnicas de secuenciación del genoma completo de cepas de *P. aeruginosa*, que la variabilidad genómica de las cepas es mucho mayor a la reportada anteriormente (Battle et al., 2009; Kung et al., 2010; Mathee et al., 2008; Roy et al., 2010; Winstanley et al., 2009) ya que pueden coexistir en un mismo genoma una gran cantidad de elementos móviles de diferente origen, demostrando así la dinámica y modulación que puede presentar un genoma dependiendo de las exigencias que el medio ambiente (sobre todo el hospitalario) ejercen sobre la bacteria (Klockgether et al., 2011; Mathee et al., 2008). Nuestras cepas, a diferencia de los aislamientos ambientales o de las cepas no patógenas (Stover et al., 2000), presentaron un genoma de mayor tamaño, esto como en otros estudios se explica debido al incremento en el material genético exógeno que gana la bacteria (Andreani et al., 2017; Ozer et al., 2014; Subedi et al., 2018).

Este efecto genera que la población bacteriana pueda disponer de una poza genética más grande favoreciendo así una mejor adaptación al nicho ecológico (Andreani et al., 2017). A pesar del gran contenido genético identificado en los elementos móviles de las cepas en estudio, muchos de estos genes codifican para productos que no poseen una función caracterizada o un dominio proteico clave que nos oriente sobre cuál es su papel dentro de la adaptación de la bacteria al nicho de desarrollo (Da Costa et al., 2018). No por ello estos genes deben ser segregados de los análisis ni mucho menos subestimados, ya que muy probablemente confieren características importantes para la patogénesis o la adaptación del microorganismo. Con base en esto, los genes bien caracterizados serán aquellos que nos ayuden a identificar cuáles serán las características adaptativas que poseerá la bacteria y que le darán una ventaja sobre la población (Jiang et al., 2017; Rankin et al., 2011).

Nuestros resultados sustentan la hipótesis de que los elementos móviles son mosaicos genéticos en constante cambio (Rankin et al., 2011), ya que a pesar de que algunas islas encontradas presentaron un porcentaje de identidad alto (>70%) con elementos ya descritos, éstos también presentan cambios como inserciones o deleciones de genes, mediados principalmente por la adquisición de secuencias de inserción o transposones dentro de la isla genómica. Este tipo de eventos está descrito que ocurren de manera aleatoria en los genomas ya que las secuencias de inserción se comportan como elementos egoístas, sin embargo tienen un gran impacto en la evolución del genoma accesorio de la bacteria ya que pueden acarrear genes que codifican para factores de virulencia o de resistencia a agentes tóxicos para la bacteria como antimicrobianos o metales pesados (Di Cesare et al., 2016; Werren, 2011; Wu et al., 2015) atribuyéndole características adaptativas nuevas. Por otra parte, la modificación de islas previamente reportadas o la conservación de regiones de estos elementos móviles, nos habla de que esos genes son necesarios para la supervivencia de la bacteria bajo ciertas condiciones. Por ejemplo el hecho de que todas nuestras cepas presentaran un fragmento conservado de la isla genómica PAGI-1 (primeros 31 ORFs), los cuales codifican en su mayoría para enzimas con actividad de deshidrogenasas e involucradas en la evasión de la respuesta inmune, nos sugiere que *P. aeruginosa* utiliza estas enzimas para sobrevivir al ataque del sistema inmune en las etapas

primarias de la infección (Barth et al., 2013). De igual forma la integración de operones completos de resistencia a metales pesados como el cobre, cadmio, zinc y hasta mercurio, nos indica que estos elementos son necesarios para que el microorganismo pueda incrementar su resistencia a estos componentes que normalmente están presentes en muchos desinfectantes utilizados tanto en el sector agropecuario como en hospitales (Argudín et al., 2019; de Silva et al., 2012; Rojas Pirela et al., 2014). Las islas genómicas totalmente nuevas (sin vestigios de elementos previamente descritos) presentaron operones que codifican para sistemas de restricción-modificación (Lee et al., 1992; Vasu & Nagaraja, 2013), lo cual es utilizado por la bacteria como un sistema para eliminar la integración de DNA exógeno. Esto nos sugiere que la incorporación de DNA no es un proceso tan al azar como se pensaba ya que la utilización de estos sistemas permite discriminar cual fragmento debe ser degradado y cual tiene posibilidades de integración al cromosoma, pudiendo ser un sistema de control epigenético para que el cromosoma no comience a introducir material genético aleatoriamente (Mruk I. & Kobayashi I. 2016). Algo similar se identificó en la cepa Pa84, la cual fue la única que presentó un operón completo del sistema CRISPR-Cas, además fue la cepa que presentó el menor número de elementos móviles en su genoma y por lo tanto el genoma más pequeño de nuestras cepas. Este sistema se sabe que tiene una actividad catalítica sobre el DNA, sobre todo aquel de origen viral (bacteriófago), por lo que se explica por qué esta cepa posee menos fagos integrados que el resto de las cepas (Cady et al., 2012; Chen et al., 2018). Tanto los sistemas de modificación-restricción como el sistema CRISPR-Cas pueden favorecer la estabilidad del cromosoma evitando la integración desmedida de DNA exógeno (Cubbon et al., 2018; Darmon & Leach, 2014).

Además de los componentes que pueden conferir una mayor patogenicidad, otro aspecto importante y sobre todo en cepas de origen hospitalario es la resistencia a agentes antimicrobianos. En nuestras cepas se identificaron algunos elementos móviles como los integrones clase 1, los cuales son elementos móviles altamente distribuidos en diferentes géneros bacterianos por su facilidad de transmisión de bacteria a bacteria (Davies, 1996). Se sabe que los integrones son de fácil diseminación entre una población bacteriana que se

encuentra en un mismo nicho sin importar el género o la especie (Ghaly et al., 2017). Estos elementos pueden contener “cluster” de genes de resistencia a diferentes grupos de antimicrobianos (Deng et al., 2015) y bajo presión selectiva por el aumento en el uso de agentes antimicrobianos los integrones pueden ser fijados al cromosoma (Gillings et al., 2008). Los integrones localizados en nuestras cepas presentaron una variabilidad en su contenido genético, identificando la presencia de algunos modificadores de aminoglucósidos [AAC(6′)-33, ANT(3′)-1a], la presencia de ciertas β-lactamasas (GES-19 y 20, OXA-2), un transportador de compuestos de amonio (QacE delta), el gen *sul1* de resistencia a sulfonamidas, un sistema de transporte de tetraciclinas (*tetG* y *tetR*) y el gen *floR* de resistencia a cloranfenicol. Como se ha descrito en otros estudios (Sandner-Miranda et al., 2018) la presencia del gen no significa que la cepa vaya a expresar ese gen o generar una proteína funcional, en nuestro caso el genotipo identificado para cada cepa coincidió con el perfil de susceptibilidad encontrado, por lo que se puede decir que hay una concordancia entre el contenido genético y el fenotipo de resistencia a antimicrobianos.

Con relación al esquema de tipificación de MLST (por sus siglas en inglés), se corrobora la gran diversidad genética de nuestras cepas de *P. aeruginosa* no mostrándose un grupo clonal predominante, sugiriendo que en nuestra población circulan clones diferentes a las reportadas en Europa. Actualmente existen reportes de grupos clonales de alto riesgo diseminados en hospitales alrededor del mundo los cuales pertenecen a ST específicos, con características genéticas propias de cada grupo clonal y una alta resistencia a antimicrobianos (Oliver et al., 2015; Witney et al., 2014). Dentro de los ST más importantes se reportan el ST111, ST235 y el ST175, recientemente en México se identificó el ST309 como un potencial grupo clonal que puede estar asociado a cepas de alto riesgo (Morales-Espinosa et al., 2017). En nuestro trabajo se identificaron 2 cepas con el ST309, estas cepas al igual que en el estudio de Morales-Espinosa del 2017 fueron aisladas del mismo Centro Médico. Sin embargo, los pacientes se encontraban en diferentes servicios y de acuerdo con una caracterización previa, tanto las cepas del estudio de Morales-Espinosa en 2017 como nuestras cepas están clasificadas como cepas MDR y XDR, lo cual indica que son cepas resistentes a un amplio rango de antimicrobianos. Además, poseen factores de

virulencia importantes como la presencia de las exotoxinas U y S (Firouzi-Dalvand et al., 2017; Schulert et al., 2003). Al igual que el ST309, el ST277 está asociado a cepas posiblemente de alto riesgo. Este grupo clonal fue descrito primeramente en un brote epidémico en Sao Paulo Brasil (Nascimento et al., 2016), y se ha expandido, encontrando reportes de esta clona en pacientes de Reino Unido (Hopkins et al., 2016) e incluso en la microbiota de aves migratorias, lo cual podría ser la fuente de diseminación de las clonas (Martins et al., 2018). El ST277 tiene como característica la presencia de la metalo- β -lactamasa SPM-1 en la isla genómica PAGI-15, la cual confiere resistencia a carbapenémicos (Kos et al., 2015). Sin embargo, en nuestra cepa Pa1242 que tiene este ST277, no se encontró la presencia de la isla PAGI-15, ni de la β -lactamasa (Nascimento et al., 2016) y fenotípicamente la cepa solamente presentó resistencia intermedia a polimixina B y fue susceptible al resto de los antimicrobianos probados, por lo que se podríamos asumir que en el caso de cepas del grupo clonal ST277, la presencia de la isla genómica PAGI-15 es la responsable de la multiresistencia a antimicrobianos de *P. aeruginosa*. Tanto el ST308 como el ST155, se han reportado en diferentes estudios alrededor del mundo, sin embargo, no están relacionados a brotes epidémicos ni a cepas con alta resistencia a antimicrobianos (Jeraldo et al., 2015; Kidd et al., 2013, 2015; Subedi et al., 2018; Wang et al., 2014). En nuestro estudio, la cepa de tipo ST308 presenta características genéticas muy similares a las cepas pertenecientes al grupo clonal ST309, como son la alta resistencia a antimicrobianos y la presencia de factores de virulencia y contenido de elementos móviles en su cromosoma, lo que implicaría una estrecha vigilancia epidemiológica de este tipo ST308 en infecciones nosocomiales con potencial a diseminarse.

Algunos estudios alrededor del mundo han tratado de relacionar el serotipo de las cepas causante de infecciones nosocomiales o en pacientes inmunocomprometidos con aspectos como su virulencia o la resistencia a antimicrobianos (Q. et al., 2014; Thrane et al., 2015), sin embargo, en México no hay estudios epidemiológicos en donde se realice un seguimiento y asociación de las cepas causantes de infecciones nosocomiales y el serotipo que presentan. En nuestro estudio se identificaron 3 cepas con el serotipo O11 el cual es reportado como el serotipo más frecuente relacionado con infecciones intrahospitalarias

(Estahbanati et al., 2002; Lu et al., 2014), a este serotipo se le atribuye una alta virulencia, ya que, la mayoría de las cepas con este serotipo presentan el sistema de secreción tipo III y la toxina ExoU (Faure et al., 2003), presentes en la isla de patogenicidad PAPI-2 (He et al., 2004). Nuestros resultados muestran que las 3 cepas identificadas como O11 son las únicas que presentan la toxina ExoU. Otra cepa (Pa1207) presentó el serotipo O6, el cual también es uno de los serotipos más frecuentes en infecciones nosocomiales, sin embargo está reportado que este serotipo es negativo para el sistema de secreción tipo III y la toxina ExoU (Faure et al., 2003). El resto de las cepas presentaron serotipos poco frecuentes en cepas clínicas. A excepción del serotipo O11, nosotros encontramos que las cepas de diferente serotipo presentan un número variable de elementos móviles, diferente perfil de susceptibilidad a antimicrobianos y contenido de genes de virulencia. Es recomendable hacer un estudio epidemiológico para determinar si existe relación entre el serotipo de las cepas con su contenido genético y su patrón de susceptibilidad, como lo indican algunos autores.

Este tipo de estudios nos ayuda a visualizar cual es panorama con respecto a las cepas que se encuentran en nuestro país y las diferencias que presentan con las cepas de otras partes del mundo y/o aisladas de diferentes fuentes, ya que si bien pueden compartir características similares (genoma core), el genoma accesorio marca la pauta para establecer qué bacteria se puede adaptar mejor a un ambiente de desarrollo. Si bien, aún quedan una gran cantidad de aspectos por explorar en los elementos genéticos móviles, sobre todo el control, la diseminación y la expresión de los genes que poseen cada uno de ellos y como estos modulan el comportamiento de las poblaciones bacterianas, lo que sí está claro es que estos fragmentos de DNA son estructuras dinámicas en constante cambio que contribuyen a mejorar la adaptación de la bacteria a ciertas condiciones del nicho de desarrollo y propician la evolución de la población a una mejor adaptada.

8. CONCLUSIONES

Las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes mexicanos presentaron una gran variabilidad genética, a pesar de haber sido aisladas del mismo centro hospitalario (adultos de la UCI del Hospital de Especialidades CMNSXXI y niños del Hospital de Pediatría del CMNSXXI), lo que nos podría indicar que los pacientes se infectaron con sus propias cepas.

La variabilidad encontrada en las cepas de *P. aeruginosa* está dada por el gran número de elemento genéticos móviles en sus genomas, pudiendo contener de 13 MGEs a 23 MGEs diferentes por cepa. Estos MGEs poseen genes adquiridos horizontalmente, lo aumenta la capacidad de adaptación de las cepas al medio de desarrollo, confiriéndoles atributos nuevos de virulencia, resistencia a antimicrobianos y/o genes de adaptación. Apoyando a lo ya descrito los MGEs pueden modificar su contenido genético formado rearrreglos de su estructura original. En nuestras cepas se identificaron 19 islas genómicas nuevas con rearrreglos no descritos previamente y 5 islas ya descritas pero que presentaron inserciones y/o deleciones de algunos genes. A pesar de lo que se pensaba, los MGEs pueden utilizar diferentes loci para su integración pudiendo localizarse en diferentes partes del genoma ya sea de manera íntegra o fragmentada formando nuevos mosaicos genéticos, en este estudio se describieron 13 nuevos loci de inserción para diferentes MGEs.

Con respecto a la resistencia a antimicrobianos, nuestras cepas mostraron diferentes patrones de susceptibilidad. La multidrogo-resistencia encontrada en nuestras cepas fue relacionada con la presencia de diferentes enzimas codificadas en elementos móviles (PAGI-41, PAGI-46 e Integron Clase 1), mientras que la resistencia de las cepas que no presentaron estas enzimas se podría inferir por una sobreexpresión de mecanismos intrínsecos de *P. aeruginosa* como la utilización de bombas de eflujo y/o las betalactamasas cromosomales AmpC y OXA-50.

La identificación de nuevas mutaciones en componentes de la vía de regulación de las bombas de eflujo abre la puerta para determinar posibles interacciones proteína-DNA y/o proteína-proteína entre los diferentes elementos que conforman la vía de regulación y las repercusiones que estas mutaciones puedan tener sobre el fenotipo de resistencia a

diferentes grupos de antimicrobianos. También se podrían utilizar como posibles blancos terapéuticos para moléculas que interfieran en la interacción de los componentes de la vía regulatoria.

Para ampliar el proyecto se podría utilizar una muestra más grande para determinar las posibles variaciones y/o semejanzas entre las diferentes cepas, así como realizar asociaciones entre serotipos, ST (sequence types), MGEs y patrones de susceptibilidad, con la finalidad de conocer el panorama que se tiene en los hospitales mexicanos, ya que el comportamiento de las cepas es muy diferente a lo reportado en otras partes del mundo.

REFERENCIAS

- Akama, H., Matsuura, T., Kashiwagi, S., Yoneyama, H., Narita, S. I., Tsukihara, T., Nakagawa, A., & Nakae, T. (2004). Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 25939–25942. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400164200>
- Andreani, N. A., Hesse, E., & Vos, M. (2017). Prokaryote genome fluidity is dependent on effective population size. *ISME Journal*, 11(7), 1719–1721. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.36>
- Argudín, M. A., Hoefler, A., & Butaye, P. (2019). Heavy metal resistance in bacteria from animals. *Research in Veterinary Science*, 122(December 2017), 132–147. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.11.007>
- Bartell, J. A., Blazier, A. S., Yen, P., Thøgersen, J. C., Jelsbak, L., Goldberg, J. B., & Papin, J. A. (2017). Reconstruction of the metabolic network of *Pseudomonas aeruginosa* to interrogate virulence factor synthesis. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms14631>
- Barth, K., Remick, D. G., & Genco, C. A. (2013). Disruption of immune regulation by microbial pathogens and resulting chronic inflammation. *Journal of Cellular Physiology*, 228(7), 1413–1422. <https://doi.org/10.1002/jcp.24299>
- Battle, S. E., Meyer, F., Rello, J., Kung, V. L., & Hauser, A. R. (2008). Hybrid pathogenicity island PAGI-5 contributes to the highly virulent phenotype of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in mammals. *Journal of Bacteriology*, 190(21), 7130–7140. <https://doi.org/10.1128/JB.00785-08>
- Battle, S. E., Rello, J., & Hauser, A. R. (2009). Genomic islands of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 290(1), 70–78. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01406.x>
- Bhagirath, A. Y., Li, Y., Somayajula, D., Dadashi, M., Badr, S., & Duan, K. (2016). Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulmonary Medicine*, 16(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s12890-016-0339-5>
- Bignell, C., & Thomas, C. M. (2001). The bacterial ParA-ParB partitioning proteins. *Journal of Biotechnology*, 91(1), 1–34. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00293-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00293-0)
- Breidenstein, E. B. M., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. W. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, 19(8), 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>
- Brown, S. P., Cornforth, D. M., & Mideo, N. (2012). Evolution of virulence in opportunistic pathogens: Generalism, plasticity, and control. *Trends in Microbiology*, 20(7), 336–342. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.005>

- Cady, K. C., Bondy-Denomy, J., Heussler, G. E., Davidson, A. R., & O'Toole, G. A. (2012). The CRISPR/Cas adaptive immune system of *Pseudomonas aeruginosa* mediates resistance to naturally occurring and engineered phages. *Journal of Bacteriology*, *194*(21), 5728–5738. <https://doi.org/10.1128/JB.01184-12>
- Chen, W., Zhang, Y., Zhang, Y., Pi, Y., Gu, T., Song, L., Wang, Y., & Ji, Q. (2018). CRISPR/Cas9-based Genome Editing in *Pseudomonas aeruginosa* and Cytidine Deaminase-Mediated Base Editing in *Pseudomonas* Species. *iScience*, *6*, 222–231. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.07.024>
- Chin, C.-S., Alexander, D. H., Marks, P., Klammer, A. A., Drake, J., Heiner, C., Clum, A., Copeland, A., Huddleston, J., Eichler, E. E., Turner, S. W., & Korlach, J. (2013). Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nature Methods*, *10*(6), 563–569. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2474>
- Clements, J., McGrath, C., & McAllister, C. (2018). *Bordetella bronchiseptica* pneumonia: Beware of the dog! *BMJ Case Reports*, *2018*, 1–3. <https://doi.org/10.1136/bcr-2018-224588>
- Cramer, N., Klockgether, J., Wrasman, K., Schmidt, M., Davenport, C. F., & Tümmler, B. (2011). Microevolution of the major common *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14 in cystic fibrosis lungs. *Environmental Microbiology*, *13*(7), 1690–1704. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02483.x>
- Cubbon, A., Ivancic-Bace, I., & Bolt, E. L. (2018). CRISPR-Cas immunity, DNA repair and genome stability Interplay of DNA repair and CRISPR-Cas immunity: the fundamentals. *Bioscience Reports*, *38*, 20180457. <https://doi.org/10.1042/BSR20180457>
- Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T., & Dowson, C. G. (2004). Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(12), 5644–5649. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004>
- D'Argenio, D. A., Ichikawa, J. K., Banger, M. G., Selgrade, S., Burns, J. L., Hiatt, P., McCoy, K., Brittnacher, M., Kas, A., Ramsey, B. W., Lory, S., & Miller, S. I. (2003). Genome mosaicism is conserved but not unique in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the airways of young children with cystic fibrosis. *Environmental Microbiology*, *5*(12), 1341–1349. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00518.x>
- Da Costa, W. L. O., De Aragão Araújo, C. L., Dias, L. M., De Sousa Pereira, L. C., Alves, J. T. C., Araújo, F. A., Folador, E. L., Henriques, I., Silva, A., & Folador, A. R. C. (2018). Functional annotation of hypothetical proteins from the *Exiguobacterium antarcticum* strain B7 reveals proteins involved in adaptation to extreme environments, including high arsenic resistance. *PLoS ONE*, *13*(6), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198965>
- Darling, A. E., Mau, B., & Perna, N. T. (2010). Progressivemauve: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS ONE*, *5*(6).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011147>

- Darmon, E., & Leach, D. R. F. (2014). Bacterial Genome Instability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(1), 1–39. <https://doi.org/10.1128/membr.00035-13>
- Davies, J. (1996). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiologia (Madrid, Spain)*, 12(1), 9–16. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- de Silva, V. A., Senanayake, S. M., Dias, P., & Hanwell, R. (2012). De los pesticidas a los fármacos: Análisis de series temporales de los métodos de autolesión en Sri Lanka. *Bulletin of the World Health Organization*, 90(1), 40–46. <https://doi.org/10.2471/BLT.11.091785>
- Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Bian, H., Li, Y., & Yu, G. (2015). Resistance integrons: Class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0100-6>
- Deshmukh, M., Turkarslan, S., Astor, D., Valkova-Valchanova, M., & Daldal, F. (2003). The dithiol:disulfide oxidoreductases DsbA and DsbB of *Rhodobacter capsulatus* are not directly involved in cytochrome c biogenesis, but their inactivation restores the cytochrome c biogenesis defect of CcdA-null mutants. *Journal of Bacteriology*, 185(11), 3361–3372. <https://doi.org/10.1128/JB.185.11.3361-3372.2003>
- Deurenberg, R. H., Bathoorn, E., Chlebowicz, M. A., Couto, N., Ferdous, M., García-Cobos, S., Kooistra-Smid, A. M. D., Raangs, E. C., Rosema, S., Veloo, A. C. M., Zhou, K., Friedrich, A. W., & Rossen, J. W. A. (2017). Reprint of “Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention.” *Journal of Biotechnology*, 250, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.03.035>
- Dhillon, B. K., Laird, M. R., Shay, J. A., Winsor, G. L., Lo, R., Nizam, F., Pereira, S. K., Waglechner, N., McArthur, A. G., Langille, M. G. I., & Brinkman, F. S. L. (2015). IslandViewer 3: More flexible, interactive genomic island discovery, visualization and analysis. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W104–W108. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv401>
- Di Cesare, A., Eckert, E. M., & Corno, G. (2016). Co-selection of antibiotic and heavy metal resistance in freshwater bacteria. *Journal of Limnology*, 75(2S), 59–66. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2016.1198>
- Du, L., Sánchez, C., Chen, M., Edwards, D. J., & Shen, B. (2000). The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Chemistry and Biology*, 7(8), 623–642. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00011-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00011-9)
- Dunning Hotopp, J. C. (2011). Horizontal gene transfer between bacteria and animals. *Trends in Genetics*, 27(4), 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.01.005>
- Espinosa-Camacho, L. F., Delgado, G., Miranda-Navales, G., Soberón-Chávez, G., Alcaraz, L.

- D., & Morales-Espinosa, R. (2017). Complete Genome Sequences of Two *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Children with Bacteremia . *Genome Announcements*, 5(35), 8–9. <https://doi.org/10.1128/genomea.00927-17>
- Espinosa-Camacho, L. F., Delgado, G., Soberón-Chávez, G., Alcaraz, L. D., Castañón, J., & Morales-Espinosa, R. (2017). Complete Genome Sequences of Four Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains, Isolated from Adults with Ventilator-Associated Pneumonia at a Tertiary Referral Hospital in Mexico City . *Genome Announcements*, 5(36), 1–3. <https://doi.org/10.1128/genomea.00925-17>
- Estahbanati, H. K., Kashani, P. P., & Ghanaatpisheh, F. (2002). Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. *Burns*, 28(4), 340–348. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(02\)00024-4](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(02)00024-4)
- Faure, K., Shimabukuro, D., Ajayi, T., Allmond, L. R., Sawa, T., & Wiener-Kronish, J. P. (2003). O-antigen serotypes and type III secretory toxins in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(5), 2158–2160. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.5.2158-2160.2003>
- Favrot, L., Blanchard, J. S., & Vergnolle, O. (2016). Bacterial GCN5-Related N-Acetyltransferases: From Resistance to Regulation. *Biochemistry*, 55(7), 989–1002. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01269>
- Fernández, L., & Hancock, R. E. W. (2012). Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), 661–681. <https://doi.org/10.1128/CMR.00043-12>
- Firouzi-Dalvand, L., Pooladi, M., Nowroozi, J., Akhvan-Sepahi, A., & Hooshiyar, M. (2017). Presence of *exoU* and *exoS* Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Urinary Tract Infections. *Infection, Epidemiology and Medicine*, 2(2), 8–11. <https://doi.org/10.18869/modares.iem.2.2.8>
- Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 67(3), 159–173. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>
- Ghaly, T. M., Chow, L., Asher, A. J., Waldron, L. S., & Gillings, M. R. (2017). Evolution of class 1 integrons: Mobilization and dispersal via food-borne bacteria. *PLoS ONE*, 12(6), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179169>
- Gil, R., Silva, F. J., Pereto, J., & moya, andres. (2004). Histone antibody validation table. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 68(3), 518–537. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.518>
- Gillings, M., Boucher, Y., Labbate, M., Holmes, A., Krishnan, S., Holley, M., & Stokes, H. W. (2008). The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 190(14), 5095–5100. <https://doi.org/10.1128/JB.00152-08>
- Gurjeet Singh Kohli,. (2018). 3, 1–27.

- Guzik, M. W., Narancic, T., Ilic-Tomic, T., Vojnovic, S., Kenny, S. T., Casey, W. T., Duane, G. F., Casey, E., Woods, T., Babu, R. P., Nikodinovic-Runic, J., & O'Connor, K. E. (2014). Identification and characterization of an acyl-CoA dehydrogenase from *Pseudomonas putida* KT2440 that shows preference towards medium to long chain length fatty acids. *Microbiology (United Kingdom)*, 160(PART 8), 1760–1771. <https://doi.org/10.1099/mic.0.078758-0>
- Hacker, J., & Carniel, E. (2001). *Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity A Darwinian view of the evolution of microbes*. 2(5), 376–381.
- Hauser, A. R., & Ozer, E. a. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* Poster. *Nature Reviews Microbiology*, 2011. <https://doi.org/10.1164/rccm.200805-789ED>
- He, J., Baldini, R. L., Deziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N. T., Lee, D., Urbach, J., Goodman, H. M., & Rahme, L. G. (2004). The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(8), 2530–2535. <https://doi.org/10.1073/pnas.0304622101>
- Heuer, H., & Smalla, K. (2007). Horizontal gene transfer between bacteria. *Environmental Biosafety Research*, 6(1–2), 3–13. <https://doi.org/10.1051/ebr:2007034>
- Hopkins, K. L., Meunier, D., Findlay, J., Mustafa, N., Parsons, H., Pike, R., Wright, L., & Woodford, N. (2016). SPM-1 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 in the UK. *Journal of Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000269>
- Jackson, R. W., Vinatzer, B., Arnold, D. L., Dorus, S., & Murillo, J. (2012). The influence of the accessory genome on bacterial pathogen evolution. *Mobile Genetic Elements*, 1(1), 55–65. <https://doi.org/10.4161/mge.1.1.16432>
- Jamet, A., & Nassif, X. (2015). New Players in the Toxin Field: Polymorphic Toxin Systems in Bacteria. *MBio*, 6(3), 1–8. <https://doi.org/10.1128/mbio.00285-15>
- Jeraldo, P., Cunningham, S. A., Quest, D., Sikink, R. A., O'Brien, D., Eckloff, B. W., Patel, R., & Chia, N. (2015). Draft Genome Sequences of Nine *Pseudomonas aeruginosa* Strains, Including Eight Clinical Isolates. *Genome Announcements*, 3(5), 3–4. <https://doi.org/10.1128/genomea.01154-15>
- Jia, B., Raphenya, A. R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K. K., Lago, B. A., Dave, B. M., Pereira, S., Sharma, A. N., Doshi, S., Courtot, M., Lo, R., Williams, L. E., Frye, J. G., Elsayegh, T., Sardar, D., Westman, E. L., Pawlowski, A. C., ... McArthur, A. G. (2017). CARD 2017: Expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D566–D573. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1004>
- Jiang, X., Ellabaan, M. M. H., Charusanti, P., Munck, C., Blin, K., Tong, Y., Weber, T., Sommer, M. O. A., & Lee, S. Y. (2017). Dissemination of antibiotic resistance genes from

- antibiotic producers to pathogens. *Nature Communications*, 8, 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms15784>
- Johnson, C. M., & Grossman, A. D. (2015). Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. *Annual Review of Genetics*, 49(1), 577–601. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-055018>
- Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research*, 3(0), 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
- Kedzierska, B., & Hayes, F. (2016). Emerging roles of toxin-antitoxin modules in bacterial pathogenesis. *Molecules*, 21(6). <https://doi.org/10.3390/molecules21060790>
- Khabbaz, R., Cars, O., Kumar, S., Perovic, O., Song, J.-H., Thamlikitkul, V., Domenech, J., Matthiessen, L., Otaíza O'ryan, F., Salameh, P., Hasan, R., Lambert, H., Mardani, M., Mpundu, M., Okeke, I., & Wu, Y. (2017). Implementation of the global action plan on antimicrobial resistance. *WHO GAP AMR Newsletter N°32*, 32, 1–4.
- Kidd, T. J., Ramsay, K. A., Hu, H., Marks, G. B., Wainwright, C. E., Bye, P. T., Elkins, M. R., Robinson, P. J., Rose, B. R., Wilson, J. W., Grimwood, K., Bell, S. C., Armstrong, D. S., Cooper, P. J., Dakin, C. J., Feather H Greville, I. H., Harbour, C., Jaffé, A., Martin, A. J., ... Whitehead, B. F. (2013). Shared *Pseudomonas aeruginosa* genotypes are common in Australian cystic fibrosis centres. *European Respiratory Journal*, 41(5), 1091–1100. <https://doi.org/10.1183/09031936.00060512>
- Kidd, T. J., Ramsay, K. A., Vidmar, S., Carlin, J. B., Bell, S. C., Wainwright, C. E., Grimwood, K., Francis, P. W., Dakin, C., Cheney, J., George, N., Robertson, C. F., Moodie, M., Carzino, R., Carter, R., Armstrong, D. S., Cooper, P. J., McKay, K., Martin, A. J., ... Mott, L. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* genotypes acquired by children with cystic fibrosis by age 5-years. *Journal of Cystic Fibrosis*, 14(3), 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.12.007>
- Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C. F., & Tümmler, B. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Frontiers in Microbiology*, 2(JULY), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00150>
- Klockgether, J., Reva, O., Larbig, K., & Tümmler, B. (2004). Sequence Analysis of the Mobile Genome Island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa* C. *Journal of Bacteriology*, 186(2), 518–534. <https://doi.org/10.1128/JB.186.2.518-534.2004>
- Konz, D., Klens, A., Schörgendorfer, K., & Marahiel, M. A. (1997). The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: Molecular characterization of three multi-modular peptide synthetase. *Chemistry and Biology*, 4(12), 927–937. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(97\)90301-X](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(97)90301-X)
- Kos, V. N., Déraspe, M., McLaughlin, R. E., Whiteaker, J. D., Roy, P. H., Alm, R. A., Corbeil, J.,

- & Gardner, H. (2015). The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(1), 427–436. <https://doi.org/10.1128/AAC.03954-14>
- Koskiniemi, S., Lamoureux, J. G., Nikolakakis, K. C., t’Kint de Roodenbeke, C., Kaplan, M. D., Low, D. A., & Hayes, C. S. (2013). Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(17), 7032–7037. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300627110>
- Kulasekara, B. R., Kulasekara, H. D., Wolfgang, M. C., Stevens, L., Frank, D. W., & Lory, S. (2006). Acquisition and evolution of the *exoU* locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *188*(11), 4037–4050. <https://doi.org/10.1128/JB.02000-05>
- Kung, V. L., Khare, S., Stehlik, C., Bacon, E. M., Hughes, A. J., & Hauser, A. R. (2012). An rhs gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a virulence protein that activates the inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(4), 1275–1280. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109285109>
- Kung, V. L., Ozer, E. A., & Hauser, A. R. (2010). The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(4), 621–641. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00027-10>
- Larbig, K. D., Larbig, K. D., Christmann, A., Christmann, A., Klockgether, J., Klockgether, J., Hartsch, T., Hartsch, T., Wiehlmann, L., Wiehlmann, L., Fritz, H., Fritz, H., Tu, B., & Tu, B. (2002). Gene Islands Integrated into tRNA. *Society*, *184*(23), 6665–6680. <https://doi.org/10.1128/JB.184.23.6665>
- LaRoche-Johnston, F., Monat, C., Coulombe, S., & Cousineau, B. (2018). Bacterial group II introns generate genetic diversity by circularization and trans-splicing from a population of intron-invaded mRNAs. *PLoS Genetics*, *14*(11), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007792>
- Larsen, M. V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, L., Jelsbak, L., Sicheritz-pontén, T., Ussery, D. W., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2012). *Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria*. 1355–1361. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>
- Lee, D. G., Urbach, J. M., Wu, G., Liberati, N. T., Feinbaum, R. L., Miyata, S., Diggins, L. T., He, J., Saucier, M., Déziel, E., Friedman, L., Li, L., Grills, G., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Rahme, L. G., & Ausubel, F. M. (2006). Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biology*, *7*(10). <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r90>
- Lee, S. F., Forsberg, C. W., & Gibbins, A. M. (1992). Type II DNA restriction-modification system and an endonuclease from the ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85. *Journal of Bacteriology*, *174*(16), 5275–5283. <https://doi.org/10.1128/jb.174.16.5275-5283.1992>

- Leong, L. E. X., Lagana, D., Carter, G. P., Wang, Q., Smith, K., Stinear, T. P., Shaw, D., Sintchenko, V., Wesselingh, S. L., Bastian, I., & Rogers, G. B. (2018). *Burkholderia lata*. *24*(11), 2109–2111.
- Li, P. L., Hwang, I., Miyagi, H., True, H., & Farrand, S. K. (1999). Essential components of the Ti plasmid trb system, a type IV macromolecular transporter. *Journal of Bacteriology*, *181*(16), 5033–5041.
- Liang, X., Pham, X. Q. T., Olson, M. V., & Lory, S. (2001). Identification of a genomic island present in the majority of pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *183*(3), 843–853. <https://doi.org/10.1128/JB.183.3.843-853.2001>
- Lin, M. F., Lin, Y. Y., Tu, C. C., & Lan, C. Y. (2017). Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, *50*(2), 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2015.04.004>
- Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., Chen, L., & Yang, J. (2019). VFDB 2019: A comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D687–D692. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1080>
- Liu, Y., Gao, Z., Liu, G., Geng, Z., & Dong, Y. (2020). *Structural Insights Into the Transcriptional Regulation of HigBA Toxin – Antitoxin System by Antitoxin HigA in Pseudomonas aeruginosa*. *10*(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03158>
- Long, F., Su, C., Zimmermann, M. T., Boyken, S. E., Rajashankar, K. R., Jernigan, R. L., & Yu, E. W. (2011). *Mediated Metal Transport*. *467*(7314), 484–488. <https://doi.org/10.1038/nature09395.Crystal>
- Lu, Q., Eggimann, P., Luyt, C-E., Wolff, M., Tamm, M., François, B., Marcier, E., Garbino, J., Laterre, P-F., Koch, H., Gafner, V., Rudolf, M. P., Mus, E., Perez, A., Lazar, H., Chastre, J., & Rouby, J-J. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: Prevalence and clinical outcomes. *Critical Care*, *18*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/cc13697>
- Ma, J., Sun, M., Dong, W., Pan, Z., Lu, C., & Yao, H. (2017). PAAR-Rhs proteins harbor various C-terminal toxins to diversify the antibacterial pathways of type VI secretion systems. *Environmental Microbiology*, *19*(1), 345–360. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13621>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

- Martínez-Carranza, E., Barajas, H., Alcaraz, L. D., Servín-González, L., Ponce-Soto, G. Y., & Soberón-Chávez, G. (2018). Variability of bacterial essential genes among closely related bacteria: The case of *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, *9*(MAY), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01059>
- Martins, W. M. B. S., Narciso, A. C., Cayô, R., Santos, S. V., Fehlberg, L. C. C., Ramos, P. L., da Cruz, J. B., & Gales, A. C. (2018). SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 clone recovered from microbiota of migratory birds. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *90*(3), 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.11.003>
- Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J. M., Koehrsen, M., Rokas, A., Yandava, C. N., Engels, R., Zeng, E., Olavarietta, R., Doud, M., Smith, R. S., Montgomery, P., White, J. R., Godfrey, P. A., Kodira, C., Birren, B., Galagan, J. E., & Lory, S. (2008). Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(8), 3100–3105. [https://doi.org/Doi 10.1073/Pnas.0711982105](https://doi.org/Doi%2010.1073/Pnas.0711982105)
- Moore, N. M., Flaws, M. L., Flaws, M. L., Si, S. M. A., & Univer-, R. (2011). *Epidemiology and Pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa Infections FOCUS : P S E U D O M O N A S A E R U G I N O S A*. *24*(1), 43–46.
- Morales-Espinosa, R., Delgado, G., Espinosa, L. F., Isselo, D., Méndez, J. L., Rodríguez, C., Miranda, G., & Cravioto, A. (2017). Fingerprint analysis and identification of strains ST309 as a potential high risk clone in a *Pseudomonas aeruginosa* population isolated from children with bacteremia in Mexico City. *Frontiers in Microbiology*, *8*(MAR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00313>
- Morales-Espinosa, R., Soberón-Chávez, G., Delgado-Sapién, G., Sandner-Miranda, L., Méndez, J. L., González-Valencia, G., & Cravioto, A. (2012). Genetic and phenotypic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* population with high frequency of genomic islands. *PLoS ONE*, *7*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037459>
- Morita, Y., Cao, L., Gould, V. C., Avison, M. B., & Poole, K. (2006). *nalD* encodes a second repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *188*(24), 8649–8654. <https://doi.org/10.1128/JB.01342-06>
- Morita, Y., Kimura, N., Mima, T., Mizushima, T., & Tsuchiya, T. (2001). Roles of MexXY- and MexAB-multidrug efflux pumps in intrinsic multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *47*(1), 27–32. <https://doi.org/10.2323/jgam.47.27>
- Moura, A., Soares, M., Pereira, C., Leitão, N., Henriques, I., & Correia, A. (2009). INTEGRALL: A database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics*, *25*(8), 1096–1098. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp105>
- Nakayama, K., Kanaya, S., Ohnishi, M., Terawaki, Y., & Hayashi, T. (1999). The complete nucleotide sequence of Φ CTX, a cytotoxin-converting phage of *Pseudomonas*

- aeruginosa*: Implications for phage evolution and horizontal gene transfer via bacteriophages. *Molecular Microbiology*, 31(2), 399–419. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01158.x>
- Nascimento, A. P. B., Ortiz, M. F., Martins, W. M. B. S., Morais, G. L., Fehlberg, L. C. C., Almeida, L. G. P., Ciapina, L. P., Gales, A. C., & Vasconcelos, A. T. R. (2016). Intraclonal genome stability of the metallo- β -lactamase SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277, an endemic clone disseminated in Brazilian hospitals. *Frontiers in Microbiology*, 7(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01946>
- Nowak-Thompson, B., Chaney, N., Wing, J. S., Gould, S. J., & Loper, J. E. (1999). Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Journal of Bacteriology*, 181(7), 2166–2174.
- Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C., & Juan, C. (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resistance Updates*, 21–22, 41–59. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.08.002>
- Ozer, E. A., Allen, J. P., & Hauser, A. R. (2014). Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools Spine and AGEnt. *BMC Genomics*, 15(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-737>
- Pál, C., Papp, B., & Lercher, M. J. (2005a). Adaptive evolution of bacterial metabolic networks by horizontal gene transfer. *Nature Genetics*, 37(12), 1372–1375. <https://doi.org/10.1038/ng1686>
- Pál, C., Papp, B., & Lercher, M. J. (2005b). Horizontal gene transfer depends on gene content of the host. *Bioinformatics*, 21(SUPPL. 2), 222–223. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti1136>
- Parcell, B. J., Oravcova, K., Pinheiro, M., Holden, M. T. G., Phillips, G., Turton, J. F., & Gillespie, S. H. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* intensive care unit outbreak: winnowing of transmissions with molecular and genomic typing. *Journal of Hospital Infection*, 98(3), 282–288. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.12.005>
- Pendleton, J. N., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2013). *Patogenos Eskape Er.* 11(3), 297–308. <https://doi.org/10.1586/eri.13.12>
- Pirnay, J. P., Bilocq, F., Pot, B., Cornelis, P., Zizi, M., Van Eldere, J., Deschaght, P., Vanechoutte, M., Jennes, S., Pitt, T., & De Vos, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS ONE*, 4(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007740>
- Pullinger, G. D., & Lax, A. J. (1992). A *Salmonella dublin* virulence plasmid locus that affects bacterial growth under nutrient-limited conditions. *Molecular Microbiology*, 6(12), 1631–1643. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb00888.x>
- Rankin, D. J., Rocha, E. P. C., & Brown, S. P. (2011). What traits are carried on mobile genetic elements, and why. *Heredity*, 106(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.24>

- Rojas Pirela, M. L., Ball, M. M., & Botello Suárez, W. A. (2014). Antibiotic- and heavy-metal resistance in bacteria isolated from deep subsurface in El Callao region, Venezuela. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *16*(2), 141–149. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.41004>
- Römling, U., D, K., Schmidt, Burkhard, Tu, Klinische, & Forschergruppe. (1997). Large Genome Rearrangements Discovered by the Detailed Analysis of 21 *Pseudomonas aeruginosa* Clone C Isolates Found in Environment and Disease Habitats Ute Ro. *J. Mol. Biol.*, 386–404.
- Römling, U., Schmidt, K. D., & Tümmler, B. (1997). Large chromosomal inversions occur in clone C strains isolated from cystic fibrosis patients. *FEMS Microbiology Letters*, *150*(1), 149–156. [https://doi.org/10.1016/s0378-1097\(97\)00112-2](https://doi.org/10.1016/s0378-1097(97)00112-2)
- Römling, U., Wingender, J., Müller, H., & Tümmler, B. (1994). A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*(6), 1734–1738. <https://doi.org/10.1128/aem.60.6.1734-1738.1994>
- Roy, P. H., Tetu, S. G., Larouche, A., Elbourne, L., Tremblay, S., Ren, Q., Dodson, R., Harkins, D., Shay, R., Watkins, K., Mahamoud, Y., & Paulsen, I. T. (2010). Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS ONE*, *5*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008842>
- Rumbaugh, K. P. (2014). Genomic complexity and plasticity ensure *Pseudomonas* success. *FEMS Microbiology Letters*, *356*(2), 141–143. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12517>
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M. A., & Barrell, B. (2000). Artemis: Sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*, *16*(10), 944–945. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.10.944>
- Sandner-Miranda, L., Vinuesa, P., Cravioto, A., & Morales-Espinosa, R. (2018). The genomic basis of intrinsic and acquired antibiotic resistance in the genus *Serratia*. *Frontiers in Microbiology*, *9*(MAY), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00828>
- Schubert, R. A., Dodd, I. B., Egan, J. B., & Shearwin, K. E. (2007). Cro's role in the CI-Cro bistable switch is critical for λ 's transition from lysogeny to lytic development. *Genes and Development*, *21*(19), 2461–2472. <https://doi.org/10.1101/gad.1584907>
- Schulert, G. S., Feltman, H., Rabin, S. D. P., Martin, C. G., Battle, S. E., Rello, J., & Hauser, A. R. (2003). Secretion of the Toxin ExoU Is a Marker for Highly Virulent *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Obtained from Patients with Hospital-Acquired Pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases*, *188*(11), 1695–1706. <https://doi.org/10.1086/379372>
- Segerman, B. (2012). The genetic integrity of bacterial species: the core genome and the accessory genome, two different stories. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *2*(September), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00116>
- Siguier, P. (2006). ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic*

Acids Research, 34(90001), D32–D36. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj014>

- Siguier, Patricia, Gournayre, E., & Chandler, M. (2014). Bacterial insertion sequences: Their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 865–891. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12067>
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). *Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4), 652–680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>
- Silveira, M. C., Albano, R. M., Asensi, M. D., & Carvalho-Assef, A. P. D. A. (2016). Description of genomic islands associated to the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone ST277. *Infection, Genetics and Evolution*, 42, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.024>
- Sobel, M. L., Hocquet, D., Cao, L., Plesiat, P., & Poole, K. (2005). Mutations in PA3574 (*nalD*) lead to increased MexAB-OprM expression and multidrug resistance in laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 1782–1786. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1782-1786.2005>
- Steele, M. I., Lorenz, D., Hatter, K., Park, A., & Sokatch, J. R. (1992). Characterization of the *mmsAB* operon of *Pseudomonas aeruginosa* PAO encoding methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase and 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 267(19), 13585–13592.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., ... Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959–964. <https://doi.org/10.1038/35023079>
- Subedi, D., Vijay, A. K., Kohli, G. S., Rice, S. A., & Willcox, M. (2018). *Comparative genomics of clinical strains of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from different geographic sites*. *October*, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34020-7>
- Thrane, S. W., Taylor, V. L., Freschi, L., Kukavica-ibrulj, I., Boyle, B., Laroche, J., Pirnay, J., Lévesque, R. C., & Lam, J. S. (2015). *The Widespread Multidrug-Resistant Serotype O12*. 6(5), 1–10. <https://doi.org/10.1128/mBio.01396-15.Editor>
- Valot, B., Guyeux, C., Rolland, J. Y., Mazouzi, K., Bertrand, X., & Hocquet, D. (2015). What it takes to be a *Pseudomonas aeruginosa*? The core genome of the opportunistic pathogen updated. *PLoS ONE*, 10(5), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126468>
- Vasu, K., & Nagaraja, V. (2013). Diverse Functions of Restriction-Modification Systems in Addition to Cellular Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 53–72. <https://doi.org/10.1128/mubr.00044-12>

- Vogt, M. S., Schühle, K., Kölzer, S., Peschke, P., Chowdhury, N. P., Kleinsorge, D., Buckel, W., Essen, L.-O., & Helder, J. (2019). Structural and Functional Characterization of an Electron Transfer Flavoprotein Involved in Toluene Degradation in Strictly Anaerobic Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 201(October), 1–17.
- Waldor, M. K., & Davis, B. M. (2014). Mobile Genetic Elements and Bacterial Pathogenesis. *Mobile DNA II, May*, 1040–1059. <https://doi.org/10.1128/9781555817954.ch45>
- Wang, Y., Wang, X., Schwarz, S., Zhang, R., Lei, L., Liu, X., Lin, D., & Shen, J. (2014). IMP-45-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* of canine origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(9), 2579–2581. <https://doi.org/10.1093/jac/dku133>
- Werren, J. H. (2011). Selfish genetic elements, genetic conflict, and evolutionary innovation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement_2), 10863–10870. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102343108>
- Wiedenbeck, J., & Cohan, F. M. (2011). Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 957–976. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00292.x>
- Winstanley, C., Langille, M. G. I., Fothergill, J. L., Kukavica-Ibrulj, I., Paradis-Bleau, C., Sanschagrín, F., Thomson, N. R., Winsor, G. L., Quail, M. A., Lennard, N., Bignell, A., Clarke, L., Seeger, K., Saunders, D., Harris, D., Parkhill, J., Hancock, R. E. W., Brinkman, F. S. L., & Levesque, R. C. (2009). Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the liverpool epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Research*, 19(1), 12–23. <https://doi.org/10.1101/gr.086082.108>
- Witney, A. A., Gould, K. A., Pope, C. F., Bolt, F., Stoker, N. G., Cubbon, M. D., Bradley, C. R., Fraise, A., Breathnach, A. S., Butcher, P. D., Planche, T. D., & Hinds, J. (2014). Genome sequencing and characterization of an extensively drug-resistant sequence type 111 serotype O12 hospital outbreak strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(10), O609–O618. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12528>
- Wittman, V., Lin, H. C., & Wong, H. C. (1993). Functional domains of the penicillinase repressor of *Bacillus licheniformis*. *Journal of Bacteriology*, 175(22), 7383–7390. <https://doi.org/10.1128/jb.175.22.7383-7390.1993>
- Wolfgang, M. C., Kulasekara, B. R., Liang, X., Boyd, D., Wu, K., Yang, Q., Miyada, C. G., & Lory, S. (2003). Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), 8484–8489. <https://doi.org/10.1073/pnas.0832438100>
- Wozniak, R. A. F., & Waldor, M. K. (2010). Integrative and conjugative elements: Mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), 552–563. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2382>

- Wu, Y., Aandahl, R. Z., & Tanaka, M. M. (2015). Dynamics of bacterial insertion sequences: Can transposition bursts help the elements persist? Theories and models. *BMC Evolutionary Biology*, *15*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0560-5>
- Yamazoe, M., Onogi, T., Sunako, Y., Niki, H., Yamanaka, K., Ichimura, T., & Hiraga, S. (1999). Complex formation of MukB, MukE and MukF proteins involved in chromosome partitioning in *Escherichia coli*. *EMBO Journal*, *18*(21), 5873–5884. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.21.5873>
- Ye, Y. N., Hua, Z. G., Huang, J., Rao, N., & Guo, F. B. (2013). CEG: A database of essential gene clusters. *BMC Genomics*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-769>
- Zakharova, I. B., & Viktorov, D. V. (2015). Integrative conjugative elements (ICEs) of microorganisms. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, *30*(3), 114–123. <https://doi.org/10.3103/s0891416815030076>
- Zatyka, M. (2002). Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements. *FEMS Microbiology Reviews*, *21*(4), 291–319. [https://doi.org/10.1016/s0168-6445\(97\)00061-2](https://doi.org/10.1016/s0168-6445(97)00061-2)
- Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K. H., Dennis, J. J., & Wishart, D. S. (2011). PHAST: A Fast Phage Search Tool. *Nucleic Acids Research*, *39*(SUPPL. 2), 347–352. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr485>

ARTÍCULOS

1. **Espinosa-Camacho L.F.**, Delgado G., Cravioto A. Morales-Espinosa R. (2022). Diversity in the composition of the accessory genome of Mexican *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Genes & genomics*, 44(1), 53-77. <https://doi.org/10.1007/s13258-021-01155-3>. F.I. 1.839. Primer Autor.
2. **Espinosa-Camacho L.F.**, Delgado G., Soberón-Chávez G., Alcaraz L.D., Castañón J., Morales-Espinosa R. (2017). Complete Genome Sequences of Four Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains, Isolated from Adults with Ventilator Associated Pneumonia from a Tertiary Referral Hospital in Mexico City. *Genome Announc* 5:e00925-17. doi.org/10.1128/genomeA.00925-17. F.I. 1.18. Primer Autor.
3. **Espinosa-Camacho L.F.**, Delgado G., Miranda-Novales G., Soberón-Chávez G., Alcaraz L.D., Morales-Espinosa R. (2017). Complete Genome Sequences of Two *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Children with Bacteremia. *Genome Announc* 5:e00927-17. doi.org/10.1128/genomeA.00927-17. F.I. 1.18. Primer Autor.
4. Morales-Espinosa R, Delgado G., **Espinosa L.F.**, Isselo D., Méndez J.L., Rodríguez C., Miranda G., Cravioto A. (2017). Fingerprint Analysis and Identification of Strains ST309 as a Potential High-Risk Clone in a *Pseudomonas aeruginosa* Population Isolated from Children with Bacteremia in Mexico City. *Front Microbiol*; 8:313. [Doi:10.3389/fmicb.2017.00313](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00313). F.I. 4.01. Coautor.



Diversity in the composition of the accessory genome of Mexican *Pseudomonas aeruginosa* strains

Luis F. Espinosa-Camacho¹ · Gabriela Delgado¹ · Alejandro Cravioto¹ · Rosario Morales-Espinosa¹

Received: 5 March 2021 / Accepted: 13 August 2021
© The Genetics Society of Korea 2021

Abstract

Background *Pseudomonas aeruginosa* is an important opportunistic pathogen especially in nosocomial infections due to its easy adaptation to different environments; this characteristic is due to the great genetic diversity that presents its genome. In addition, it is considered a pathogen of critical priority due to the high antimicrobial resistance.

Objectives The aim of this study was to characterize the mobile genetic elements present in the chromosome of six Mexican *P. aeruginosa* strains isolated from adults with pneumonia and children with bacteremia.

Methods The genomic DNA of six *P. aeruginosa* strains were isolated and sequenced using PacBio RS-II platform. They were annotated using Prokaryotic Genome Annotation Pipeline and manually curated and analyzed for the presence of mobile genetic elements, antibiotic resistances genes, efflux pumps and virulence factors using several bioinformatics programs and databases.

Results The global analysis of the strains chromosomes showed a novel chromosomal rearrangement in two strains, possibly mediated by subsequent recombination and inversion events. They have a high content of mobile genetic elements: 21 genomic islands, four new islets, four different integrative conjugative elements, 28 different prophages, one CRISPR-Cas arrangements, and one class 1 integron. The acquisition of antimicrobials resistance genes into these elements are in concordance with their phenotype of multi-drug resistance.

Conclusion The accessory genome increased the ability of the strains to adapt or survive to the hospital environment, promote genomic plasticity and chromosomal rearrangements, which may affect the expression or functionality of the gene and might influence the clinical outcome, having an impact on the treatment.

Keywords *Pseudomonas aeruginosa* · Mobile genetic elements · Genomic islands · Genome diversity · Genome rearrangements

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous Gram-negative bacterium, which has an enormous ability to survive in different niches, such as humans, plants, animals, soil and aquatic environments (Pirnay et al. 2009; Silby et al. 2011; Gellatly and Hancock 2013). A distinctive characteristic is its metabolic versatility, which allows it to colonize a wide range of hosts; these properties are favored by a wide genetic content present in mobile genetic elements (MGEs) within its chromosome. Given these properties, it is not surprising that *P. aeruginosa* ranks between a commensal microorganism and a pathogen for different species including humans, being able to cause severe nosocomial infections and being associated with high mortality (Moore et al. 2011; Rumbaugh 2014; Bhagirath et al. 2016).

✉ Rosario Morales-Espinosa
marosari@servidor.unam.mx

Luis F. Espinosa-Camacho
fernando.esca@unam.mx

Gabriela Delgado
delgados@unam.mx

Alejandro Cravioto
dracravioto@hotmail.com

¹ Laboratorio de Genómica Bacteriana, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Colonia Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510 Mexico City, Mexico

The genome of *P. aeruginosa* has a variable size between 5.2 Mpb and 7.5 Mpb, with an average percentage of guanine-cytosine (G + C) of 67% (Stover et al. 2000). Unlike other bacteria, the size of the genome of *P. aeruginosa* is the result of the acquisition of new genetic material by horizontal gene transfer (HGT), which forms the bacterium accessory genome. Different studies have demonstrated that the chromosome of *P. aeruginosa* is prone to undergo recombination events that cause changes in the architecture of its chromosome. Furthermore, these chromosomal changes favor the incorporation of genetic material through the incorporation of MGEs in multiple plasticity zones located throughout its chromosome. Three specific hypervariable regions have been documented in the *P. aeruginosa* chromosome for the insertion of large genetic blocks called genomic islands (GIs). These regions are adjacent to the *lipH*, *pilA* and *oprL-phnAB* genes, where the genetic islands PAPI-2 and PAPI-3 are inserted into the *lipH* region (corresponding to clone C strains), PAPI-1 and pKCL102 are inserted into the *pilA* region and PAPI-2 and PAPI-4 are inserted into the *oprL-phnAB* region; the majority of them are inserted at the tRNA 3' end (Römling et al. 1997; Liang et al. 2001; Larbig et al. 2002; Klockgether et al. 2004; Battle et al. 2008, 2009; Nascimento et al. 2016; Silveira et al. 2016).

The genes carried in the MGEs provide the bacterium with adaptive characteristics to survive in a specific niche (Kung et al. 2010; Waldor and Davis 2014). The accessory genome of *P. aeruginosa* is highly variable, studies carried out to date have identified and characterized up to 40 GIs in different strains isolated from various sources and from different geographical regions (Liang et al. 2001; Larbig et al. 2002; Klockgether et al. 2004; Battle et al. 2008, 2009; Nascimento et al. 2016; Silveira et al. 2016). All this genetic variability between strains refers to the chromosomal dynamism that different strains carry out to survive, colonize, propagate, secrete their virulence factors and be resistant to different antimicrobials. GIs are blocks of genes formed by different multiple MGEs (integrative and conjugative elements [ICEs], genomic islands [GIs], prophages, transposons, insertion sequences and integrons), which have a lower G + C content than that of the *P. aeruginosa* core genome. These accessory DNAs insert into specific sites within the *P. aeruginosa* chromosome act as hot spot for the exchange of accessory genes (Kung et al. 2010; Vasquez-Rifo et al. 2019).

In this study, we sequenced six Mexican strains of *P. aeruginosa* isolated from four adults with pneumonia and two children with bacteremia, in which mobile genetic elements were characterized. Our results showed the presence of new MGEs not yet reported; additionally, we observed that the adult strains presented a synteny composition and a shared chromosomal architecture between them, while the children

strains were different from those of the adults, but remarkably similar between them.

Materials and methods

Bacterial strains and sequencing

Six strains of *Pseudomonas aeruginosa* were selected from two previous studies (Morales-Espinosa et al. 2012, 2017). From the four adult strains: two strains (Pa58 and Pa84) were isolated from bronchial secretion and two strains (Pa124 and Pa127) were isolated from blood (Morales-Espinosa et al. 2012). Two other strains from children (Pa1207 and Pa1242) were isolated from blood (Morales-Espinosa et al. 2017).

Genomic DNA was obtained from each bacterial culture using the QIAGEN® DNeasy blood extraction kit and the Tissue Kit®. All DNAs were adjusted to a final concentration of 100 ng/μl at 260/280 nm using the Tecan Genios® equipment. Sequencing was performed at the Yale University Center for Genomic Analysis (YCGA) using PacBio RS II single-molecule real-time (SMRT) technology. A library of 20-Kb fragments was prepared and sequenced in four SMRT cells with the P4 binding system and C2 chemistry.

Assembly and annotation

The long readings obtained from the sequencing were used as seeds for the assembly of the shorter readings, generating from 1 to 17 contigs depending on the strain; finally, the complete genome was assembled using the HGAP/Quiver protocol in the portal SMRT v.3 (Chin et al. 2013). The final assembly had coverage from 83 to 181× depending on the strain. The annotation of the six genomes was performed for the first time automatically using the annotation software of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/) version 4.2. Subsequently, the annotation was cured using the Basic Local Alignment Search Tool (BLASTx) platform and manually reviewed using reference strains PA14 and PAO1 as templates to identify genes of interest (e.g. virulence and antimicrobial gene resistance). The sequence of all genomes was deposited in the NCBI GenBank database under the following access numbers: Pa58 (CP021775), Pa84 (CP021999), Pa124 (CP021774), Pa127 (CP022000), Pa1207 (CP022001) and Pa1242 (CP022002) (Espinosa-Camacho et al. 2017a, b).

Serotyping in silico

The phenotypic characterization of the *P. aeruginosa* O antigen was performed in silico using the PAST 1.0

program, which determines in silico the serotyping of *P. aeruginosa* based on a BLAST analysis of the group of genes involved in the biosynthesis of the O antigen (covering the 20 known serotypes) (Thrane et al. 2015). This program is available on the platform of the Genomic Epidemiology Center (GCE, <https://cge.cbs.dtu.dk/services/PAst/>).

Multilocus sequence typification (MLST) in silico

Multilocus sequence typing was performed in silico for each strain using the MLST 1.8 server (Larsen et al. 2012), which uses the typification scheme for *P. aeruginosa* (<https://pubmlst.org/organisms/pseudomonas-aeruginosa>), based on the analysis of seven basic metabolism genes (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nouD*, *ppsA* and *trpE*) of *P. aeruginosa* (Curran et al. 2004). This program is available on the platform of the Genomic Epidemiology Center (GCE, <https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>).

Identification of mobile genetic elements

In each *P. aeruginosa* strain, MGEs were identified (GIs, ICEs, prophages, integrons, transposons and insertion sequences), as well as genes associated with virulence and antimicrobial resistance. GIs and ICEs were identified using the IslandViewer3 program, which uses three GI prediction programs (IslandPath-DIMOB, SIGI-HMM, and IslandPick) (Dhillon et al. 2015). Additionally, the nucleotide sequences of PAGI 1–11, PAPI 1–2 and the pKLC102 element were used as a template to locate homologous regions within our *P. aeruginosa* genomes, for which the Mauve v20150226 (Darling et al. 2010) and Artemis v16.0.0 programs were used (Carver et al. 2012). Prophages were identified using the PHAST program (Zhou et al. 2011), whereas the integrons were identified using the INTEGRALL database (Moura et al. 2009) and the Isfinder program (Siguier 2006); the latter program was used to find transposons and insertion sequences. All mobile genetic elements were cured manually using local versions of BLASTn, BLASTp and BLASTx and following the exclusion criteria to eliminate false positives, such as: (1) those that have a different G + C content than the chromosome; (2) those to be inserted adjacent to a tRNA gene and have an integrase or direct repeated or inverted sequences; and (3) those that possess virulence, antimicrobial resistance or adaptive genes. Virulence genes were identified using the Virulence Factor DataBase (VFDB) (Liu et al. 2019) and for antimicrobial resistance genes, the full antibiotic resistance database was used (CARD) (Jia et al. 2017).

Antimicrobial susceptibility

To assess the isolates antimicrobial susceptibility, the agar dilution method was used according to the criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute, using the recommended media (CLSI, 2016). ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 25922 *Escherichia coli*, ATCC 35218 *E. coli*, ATCC 29213 *Staphylococcus aureus*, and ATCC 29212 *Enterococcus faecalis* were used as quality control. Susceptibility was tested for the following antimicrobial: carbenicillin (Invitrogen Inc. CA, USA); ticarcillin (GlaxoSmithKline, Mexico); piperacillin (Sigma-Aldrich Inc. MO, USA); ticarcillin/clavulanic acid (GlaxoSmithKline, Mexico); piperacillin/tazobactam (Sigma-Aldrich Inc. MO, USA); ceftazidime (Laboratorios Salus S.A. de C.V. Mexico); ceftriaxone (Laboratorios Salus S.A. de C.V. Mexico); cefotaxime (Laboratorios Salus S.A. de C.V. Mexico); cefepime (Laboratorios Salus S.A. de C.V. Mexico); imipenem (Ivax Pharmaceuticals Mexico, S.A. de C.V. Mexico); meropenem (AstraZeneca, Mexico); aztreonam (Sigma-Aldrich Inc. MO, USA); amikacin (Laboratorios Pisa S.A. de C.V. Mexico); gentamicin (Sigma-Aldrich Inc. MO, USA); tobramycin (Alcon Laboratorios S.A. de C.V. Mexico); polymyxin B (GlaxoSmithKline, Mexico); ciprofloxacin (Laboratorio Lemery, S.A. de C.V. Mexico); lomefloxacin (Sigma-Aldrich Inc. MO, USA); norfloxacin (Productos Medix S.A de C.V. Mexico); and levofloxacin (Laboratorio Lemery, S.A. de C.V. Mexico).

Results

The sequencing analysis of six Mexican strains of *P. aeruginosa* showed a genome size between 6.5 Mpb and 7.4 Mpb, with an average G + C content of 65.86% (Table 1). The sequences of the genomes of *P. aeruginosa* strains were deposited in the GenBank database (NCBI) with the following accession numbers: Pa58 (CP021775), Pa84 (CP021999), Pa124 (CP021774), Pa127 (CP022000), Pa1207 (CP022001) and Pa1242 (CP022002) (Espinosa-Camacho et al. 2017a, b).

Serotyping in silico

In our *P. aeruginosa* strains, the in silico analysis of the O-specific Antigen (OSA) cluster encoding the generation of the specific O antigen that is flanked by the *ihfB/himD* and *wbpM* genes (Thrane et al. 2015), showed four different serotypes: the O11 serotype was the most common in three of the four adult strains (Pa58, Pa124 and Pa127), the O4 serotype was only present in the Pa84 strain, the O6 serotype in the Pa1207 infant strain and the O2 serotype in the Pa1242 strain.

Table 1 Genome features of six Mexican strains of *Pseudomonas aeruginosa*

Strain	Genome size	Total genes	CDS	rRNA's	tRNA's	ncRNA's	Pseudo genes	CRISPR arrays	% GC
Pa58	7,241,575 bp	7006	6683	4	63	4	244	1	65.80
Pa84	6,566,724 bp	6282	6063	4	63	5	139	2	66.23
Pa124	7,008,516 bp	6696	6486	4	63	4	131	0	65.84
Pa127	7,148,302 bp	6856	6572	4	63	4	205	0	65.74
Pa1207	7,411,863 bp	7153	6825	4	65	4	247	0	65.73
Pa1242	7,050,510 bp	6735	6308	4	65	4	346	0	65.83

Multilocus sequence typing (MLST) genotype in silico

Multilocus sequence typing (MLST) showed that two adult strains (Pa124 and Pa127) corresponded to ST309 sequence type. Other ST found were: ST308 (Pa58 strain), ST155 (Pa1207 strain) and ST277 (Pa1242 strain). Whereas, the Pa84 strain has a new combination of alleles (*acsA* 11, *aroE* 5, *guaA* 37, *mutL* 3, *nuoD* 1, *ppsA* 60 and *trpE* 182), to which the MLST database has not yet assigned an ST for *P. aeruginosa* (Jolley et al. 2018).

Chromosomal inversion by homologous recombination between ribosomal operons

The chromosomal architecture of our *P. aeruginosa* strains was determined using PAO1 and PA14 strains as reference (Fig. 1A,B). We observed that the strains from adult patients showed the same chromosomal rearrangement and a similar synteny as the PA14 strain (Fig. 1B) having a chromosomal inversion by homologous recombination between the *rrnA* and *rrnB* operons at the 3' end. On the other hand, the strains isolated from children (Pa1207 and Pa1242) showed two consecutive recombination and inversion events. The

first event occurred between the *rrnA* and *rrnD* operons, forming two hybrid operons: *rrnA/D* 5'3' and *rrnD/A* 5'3' and consequently a large inversion of the DNA segment located between the *rrnA* and *rrnD* operons. The second recombinational event occurred between the operon *rrnB* and the hybrid operon *rrnD/A* 5'3', forming two new hybrid operons: *rrnB/A* and *rrnD/B* (Fig. 1C). The latter event carried out a new DNA inversion, recovering the chromosomal synteny and rearrangement of a large DNA segment located between the *birA* and *dnaE* loci, in relation to PAO1 chromosome. The repetition of this behavior in our strains indicated that they do not occur randomly and probably confer adaptive advantages to establish in the host environment.

Mobile genetic elements

The nucleotide sequence analysis of the six complete chromosomes showed the presence of new genetic material, increasing the variability of accessory genomes in the chromosomes of each of our *P. aeruginosa* strains. Overall, the analysis of the six genomes showed a total of: 21 GIs (of which 15 were new GIs); four novel islets; four different ICEs (three of which were new ICEs); 28 different prophages (of which 19 are novel prophages); two

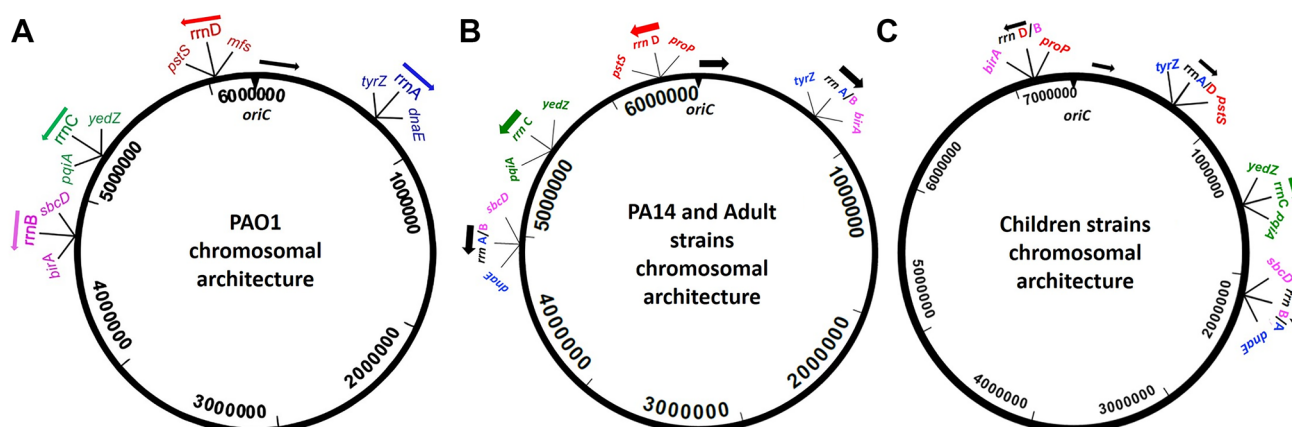


Fig. 1 Chromosomal architecture given by the ribosomal operons of the reference strains: **A** PAO1, **B** PA14, and **C** the new arrangement identified in strains of *P. aeruginosa* isolated from children. The arrows represent the transcription direction of operons

transposons (of which one was new transposon element); seven new insertion sequence elements; two CRISPR arrays and one CRISPR-Cas; and a class-1 integron (Table 2).

Novel regions of genome plasticity (RGPs)

Previously, a total of 89 regions of genome plasticity (RGPs) have been described throughout the *P. aeruginosa* chromosome (Klockgether et al. 2011). Furthermore, we identified a total of 13 new RGPs in different loci of the chromosome of our strains (Table 2). For example, strains Pa58 and Pa1207 presented up to six and five new RGPs, respectively.

Identification of novel genomic islands in Mexican strains of *Pseudomonas aeruginosa*

GI characterization was carried out according to (Langille et al. 2010; Che et al. 2014): (a) When an atypical G+C composition was presented in relation to the chromosomal strain; (b) when the GI was inserted adjacent to the 3' end of a tRNA gene; (c) when the GIs were flanked by insertion sequence elements or direct repeats; (d) when the GIs had mobility genes, such as integrase and transposase genes; and (e) when they also have virulence, resistance to antibiotics, metabolic or adaptative genes. On the other hand, when a new MGE was identified as a genomic island in our genome of *P. aeruginosa*, we named it using the PAGI nomenclature together with a progressive number, following the order assigned by different authors (Liang et al. 2001; Larbig et al. 2002; Klockgether et al. 2004; Battle et al. 2008, 2009; Nascimento et al. 2016; Silveira et al. 2016).

Genomic islands PAGI-41, -42, -43, -44 and -45

We found some MGEs inserted adjacent to the PA2217 locus in the RGP23. At this locus, the insertion of the PAGI-1 island in the strain X24509 has been reported previously, which has 51 ORFs; this island is not inserted adjacent to a tRNA (Liang et al. 2001). The Pa84 strain was the only one that presented a complete PAGI-1 island, which was inserted into the previously reported locus. However, in the other five strains, only the first 30 PAGI-1 ORFs were presented in all strains; the rest of the MGE in each strain had different size and genetic composition (Supplementary Table 1). These first 30 PAGI-1 ORFs confer adaptive properties to the strains, such as detoxification of reactive oxygen species, which also encode some acyl-coA dehydrogenases and alcohol dehydrogenase enzymes involved in different metabolic pathways. In the Pa58 strain, the new GI was assigned as PAGI-41 and it has a total of 214 ORFs. Furthermore, 42% of the PAGI-41 genes encode proteins with unknown function (from ORF31 to ORF214); this island has genes acquired from different MGEs, such as:

(1) the plasmids pGES5 present in *Aeromonas hydrophila* and pSDENCHOLpb from *Sterolibacterium denitrifican* (ORF49-ORF73); (2) a class 1 integron (ORF74-ORF90) that confers resistance to aminoglycosides, since it has an *aac(6')*-II gene, which encodes an N-acetyltransferase, in addition, it has the *bla_{GES-1}* gene that encodes a class A extended spectrum β -lactamase (GES-1) which in turn confers resistance to β -lactam antibiotics; (3) genes necessary for replication in the TnPa38 transposon such as *repA*, *oriT*, *parA* and *parC*, as well as genes necessary for the transfer of PAGI-41 (*mobC*); (4) genes for a type II restriction and modification system, such as a methyltransferase and an endonuclease (*paeR71*), where the latter is involved in the defense against viral infections; and (5) Tn3 family transposase genes (*tnAs3*, *ISPa38*). At the 3' end of PAGI-41 we found the operon *tniR/QBA*, which is characteristic of Enterobacteria and probably contributes to the transpositions of this MGE. In the middle region of PAGI-41, there are three repeated copies of four ORFs encoding a protein from the zonular occluded toxin family, a protein containing the DUF2523 domain, a putative bacteriophage Pf1 coat protein A and a protein without significant similarity; these three repeated copies suggest subsequent infection events by the same phage. Additionally, other transposons of the Tn3 family present in Enterobacteria and *Pseudomonas* spp. were also identified, giving it resistance to mercury and copper. Furthermore, it harbored genes encoding the RND efflux pump remarkably similar to those belonging to the Czc family, related to the expulsion of heavy metals such as: cobalt, zinc and cadmium. This group of genes in PAGI-41 contributes to antibiotic and heavy metal resistance (Fig. 2; Supplementary Table 1).

In the strain Pa124, PAGI-42 was identified; this island had a total of 200 ORFs and the middle region (approximately 64 ORFs) encodes hypothetical proteins. PAGI-42 island has genes that give the bacterium properties of resistance to heavy metals, such as mercury (transposon Tn4652 [*merE*, *merP*, *merT* and *merR*]) and copper; it also has ORFs that encode for a transport system of metals such as iron and for the absorption of a siderophore. There are other ORFs that encode efflux systems of the RND family; furthermore, it encodes an ABC-like system possibly involved in the transport of metals. PAGI-42 has different transposases of the IS3 family (*ISPa32*, *ISPa38*) and the IS5 family (*ISPa95*), products related to phage proteins (MD8 phage in *Pseudomonas*), an oligopeptide transport system and a component of the type II secretion system (*exeA*), which has the ATPase activity necessary for its binding to peptidoglycan and the correct folding and functioning of the transport channels. The transposon Tn4652 is inserted into PAGI-42; it has an *ISA_zs36* transposase of the *IS481* family described in the plasmid pAB510f of *Azospirillum* spp. strain B510. Finally, the TnPa42 transposon is located at the 3' end of

Table 2 Mobile genetic elements identified in Mexican strains of *P. aeruginosa*

Locus	RGP	Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
PA0263.1	2	PAGI-50		PAGI-51	PAGI-51		
PA0613	3	LES-Prophage1 ^a	LES-Prophage1 ^a	LES-Prophage1 ^a	LES-Prophage1 ^a	LES-Prophage1 ^a	LES-Prophage1 ^a
PA0729.1	5	PAGI-15 like ^a	PAGI-15 like ^a			Prophage-Mx9	Prophage-Mx10
PA0818	6	Prophage-Mx7	Prophage-Mx8	Phage CF79 like ^a	Phage CF79 like ^a	Islet-Mx2	Phage CF79 like ^a
PA0976.1	7	ExoU-C like		ExoU-D	ExoU-D		
PA1191	10			LES-Prophage6 ^a	LES-Prophage6 ^a		
PA1243	12		CRISPR-Cas array				
PA1796.3	17	Phage F116 like ^a				Prophage-Mx6	Prophage-Mx6
PA1964	19		Phage YMC ^a	Prophage-Mx16			
PA2035	20					IS-Mx7	
PA2216	23	PAGI-41	PAGI-1 ^a	PAGI-42	PAGI-43	PAGI-44	PAGI-45
PA2571	26	ICEPa-Mx3		ICEPa-Mx3	ICEPa-Mx3		
PA2583.1	27	PAGI-46				PAGI-47	
PA2736.1	28	IS-Mx1	Islet-Mx1	Transposon-Mx1	Transposon-Mx1		
PA3536	35	Prophage-Mx1	Prophage-Mx1				
PA3768	36		Prophage-Mx13	Prophage-Mx14	Prophage-Mx15	Islet-Mx3	
PA4541.1	41	pKLC102 like ^a	pKLC102 like ^a			pKLC102 like ^a	pKLC102 like ^a
PA4673.1	42	Prophage-Mx11				Prophage-Mx12	
PA1934	52					IS-Mx6	Islet-Mx4
PA2793	56	Prophage-Mx2		Prophage-Mx3	Prophage-Mx3	Prophage-Mx4	Prophage-Mx5
PA5149.1	62	PAGI-48					PAGI-49
PA0068	63			Prophage-Mx17	Prophage-Mx17		
PA2581.1	72	Phage BR153 like ^a					
PA1579	75			p34998-293.973 kb like ^a	p34998-293.973 kb like ^a		
PA5290	79			Prophage-Mx18	Prophage-Mx18	Prophage-Mx19	
PA2593	85					LESGI-2 ^a	
PA5160.1	87			PAGI-6 like ^a	PAGI-6 like ^a		
PA3960	88	PAGI-7 like ^a				PAGI-7 like ^a	PAGI-7 like ^a
PA0609	90 ^b	ICEPa-Mx1					
PA5530	91 ^b					ICEPa-Mx2	
PA3057	92 ^b	p34998-293.973 kb like ^a					
PA3655	93 ^b					p34998-293.973 kb like ^a	
PA2749	94 ^b	Tn6162 like ^a				Tn6162 like ^a	
PA0804	95 ^b					ICEPa-Mx3	
PA2250	96 ^b	IS-Mx2					
PA1155	97 ^b	PAGI-52					
PA4584	98 ^b	Phage JBD67 like ^a					
PA0004	99 ^b		IS-Mx3			IS-Mx4	IS-Mx5
PA3452	100 ^b		Phage JBD30 like ^a				
PA2283	101 ^b			Phage CF5 like ^a	Phage CF5 like ^a		
PA5548	102 ^b			Class 1 integron ^a	Class 1 integron ^a		PAGI-53

The first column shows the insertion locus of each of the mobile genetic elements (MGE) identified in our strains with respect to PAO1 strains loci; the second column shows the region of genomic plasticity in the chromosome (RGP-2 to -102), using a progressive number according to the nomenclature assigned (Klockgether et al. 2011)

^aPartial or complete MGE previously described in other strains

^bNew regions of genomic plasticity found in our *P. aeruginosa* strains. The acronym Mx refers to new mobile genetic elements identified in our *P. aeruginosa* strains

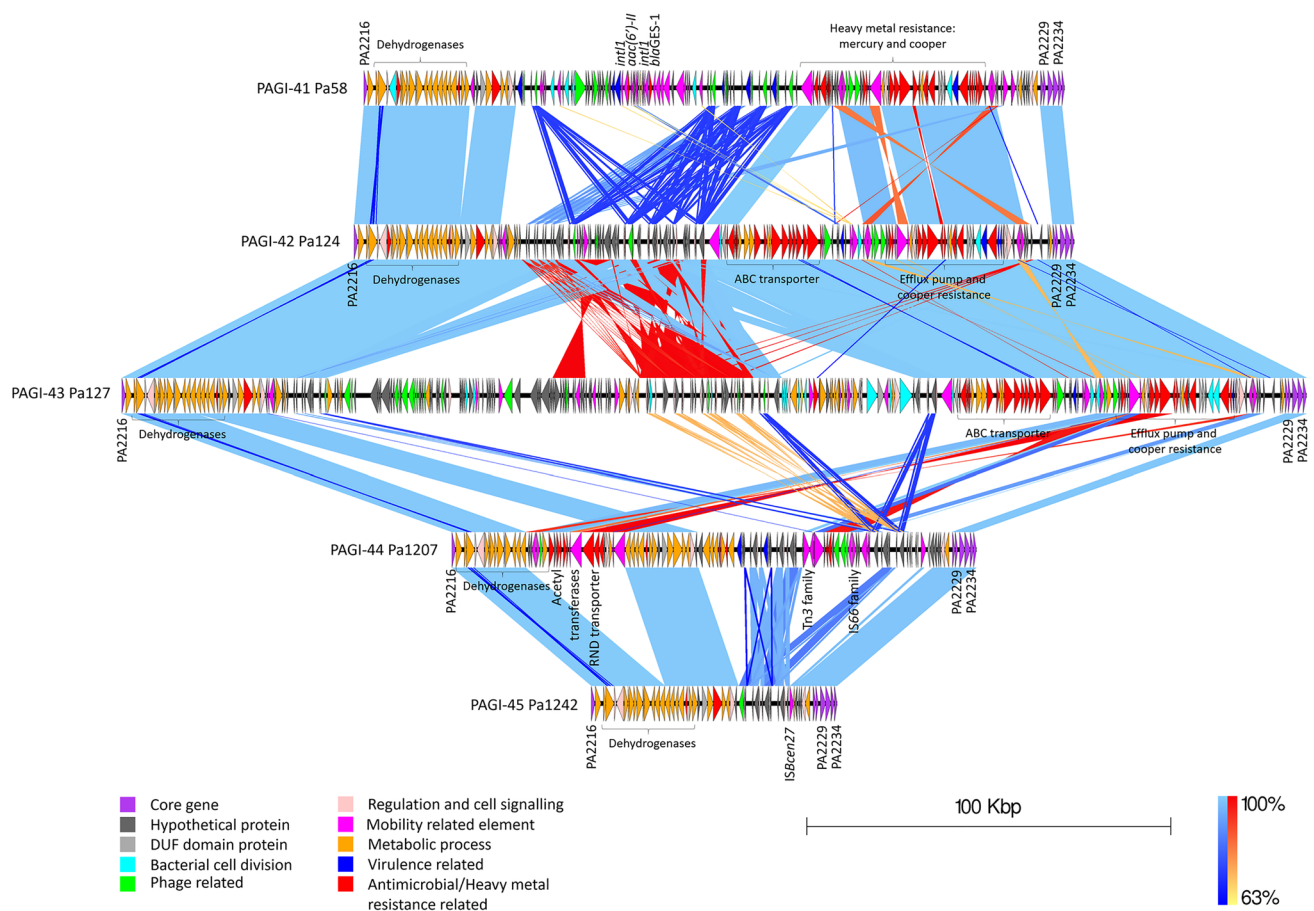


Fig. 2 Structure of the islands located in the RGP23, adjacent to the PA2216 locus in the six Mexican strains of *P. aeruginosa*

PAGI-42, it has 28 ORFs (ORF129-ORF157), which confer resistance to copper and is 100% identical to the transposon identified on PAGI-41 (Fig. 2; Supplementary Table 1).

In the Pa127 strain, we identified the largest MGE present in our strains and within the *P. aeruginosa* chromosome reported so far. We named this genetic element PAGI-43, which is composed of 356 ORFs, where 43% of them encode hypothetical proteins. PAGI-43 shares with PAGI-42 a total of 151 ORFs. However, PAGI-43 has an inversion of a DNA segment (ORF132 to ORF147) in relation to PAGI-42, which participates in the form structural components of some phages, such as the tail and capsid proteins. On the other hand, PAGI-43 has 202 specific ORFs distributed in two regions of the island (ORF40 to ORF131 and ORF148 to ORF259): the first group of ORFs encodes mainly hypothetical proteins and phage structural components; while the second group of ORFs corresponds to the MD8 prophage and the Tyrion prophage NC_031077 (reported in *Enterobacter*). Most of the ORFs in this hybrid fragment encode proteins of hypothetical function, structural components of phages such as tail and capsid proteins, and enzymes involved in phage replication such as DNA polymerase and

terminals. Adjacent to this prophage, other genes encoding helicases were identified, such as the RuvABC system responsible for resolving the Holliday structure during homologous recombination. In addition, there are genes for multiple tRNA synthetases for aspartate, proline and glycine (Fig. 2; Supplementary Table 1).

With respect to the strains isolated from children, the strain Pa1207 presented a GI called PAGI-44, which has 140 ORFs. The 44% of the ORFs in PAGI-44 encode proteins of hypothetical function. This island also has the first 30 ORFs corresponding to PAGI-1; however, the syntenic of this fragment is interrupted between ORF16 and ORF17, for the insertion of the transposon TnPa42 (15 ORFs). The TnPa42 transposon provides *P. aeruginosa* strain Pa1207, resistance to aminoglycosides. Furthermore, a short stretch of DNA paired with the last eight ORFs of PAGI41, PAGI42 and PAGI-43, located towards the 3' end of the TnPa42 transposon, encodes an efflux pump of the RND family. From ORF55 to ORF140, there are gene clusters repeated for triplicate, probably generated by at least three independent recombination events by phages containing transposases of the Tn3, IS3 and IS66 families; in addition, there are ORFs

that encode proteins associated with cointegration (TnpS and TnpT). It is evident that phages and transposons increase genetic variability in this region, incorporating or eliminating genetic material (Fig. 2; Supplementary Table 1).

Finally, PAGI-45 has 63 ORFs and was identified in the strain Pa1242. Like other of our *P. aeruginosa* strains, this island retained the first 30 ORFs of PAGI-1; also, *ISBcen27* of the *ISNY* family was identified. The rest of the ORFs encode proteins with hypothetical function (Fig. 2; Supplementary Table 1).

Genomic islands PAGI-46 and PAGI-47

In the strains Pa58 and Pa1207, two hybrid GIs were identified, which were named PAGI-46 and PAGI-47. These hybrids are formed by the ORF combinations of the islands PAGI-2, PAGI-3 and LESGI-3, previously described in the C, SG17M and Liverpool Epidemic (LESB58) strains, respectively (Larbig et al. 2002; Winstanley et al. 2009). PAGI-46 and PAGI-47 were inserted at the PA2583.1 locus, in the RGP27 in both strains (Pa58 and Pa1207). PAGI-46 is adjacent to the *tRNA^{Gly}* gene and is made up of 103 ORFs, of which the last 60 ORFs are shared with the islands PAGI-2 (from ORF41 to ORF101), PAGI-3 (from ORF44 to ORF120) and LESGI-3 (from ORF46 to ORF107). These 60 ORFs encode a conjugation and integration system for methyltransferases and for an ABC-like transporter system. The first 40 ORFs of PAGI-46 share 75% identity with a chromosomal region of *Burkholderia lata* strain A05 and 71% identity with a chromosomal segment of *Bordetella bronchiseptica* strain F709, both species are associated with opportunistic infections in immunosuppressed patients confined in intensive care units (Clements et al. 2018; Leong et al. 2018; Parcell et al. 2018). Most of the ORFs that integrate PAGI-46 are present in Proteobacteria; there are four

copies of a gene that encodes the transcriptional regulator of the LysR family, genes that encode a peroxidase, transposases of the IS5 (*ISPa26*) and Tn3 (*TnAs3*) families, a *ltrA* gene that encodes the group II intron reverse transcriptase (targetrons) that can perform programmed DNA insertions with high frequency and specificity and is involved in favoring the insertion of new genetic material (LaRoche-Johnston et al. 2018). It is highly likely that the *ltrA* gene had been transferred by the *ISPa26* transposase of the IS5 family, since *ltrA* is flanked by two *ISPa26* transposases. Furthermore, a class 1 integron reported in different strains of the Enterobacteriaceae family and in the genus *Pseudomonas* was identified (Deng et al. 2015). This class 1 integron has four genes associated with antimicrobial resistance: two genes confer resistance to aminoglycosides (*aacA4* and *aadA1*), a gene encoding β -lactamase OXA-2 that confers an extended spectrum of resistance to β -lactamase for all members of the group of cephalosporins and low activity against carbapenems (imipenem) and the *qacG2* gene that confers resistance to quaternary ammonium compounds found in many antiseptic and disinfectant agents for hospital use. At the 3' end of the class 1 integron, the *tniQBA* module was identified, associated with many transposons. This module is responsible for the transposition of the class 1 integron (Deng et al. 2015) (Fig. 3; Supplementary Table 1).

In the strain Pa1207, PAGI-47 was identified; it is inserted at the PA2583.1 locus, adjacent to a *tRNA^{Gly}* gene. PAGI-47 has 278 ORFs and is also a hybrid genetic element, composed of two regions: the first region of 164 ORFs is a combination of genes of different origin (insertion sequence, composite transposon, plasmid, and phages); the second region of 113 ORFs corresponds to the complete PAGI-2 island (from ORF165 to ORF278). In the first region of PAGI-47, several transposases of the IS3 (*ISPsy37* and *IS222*) and *IS110* families were identified. There are

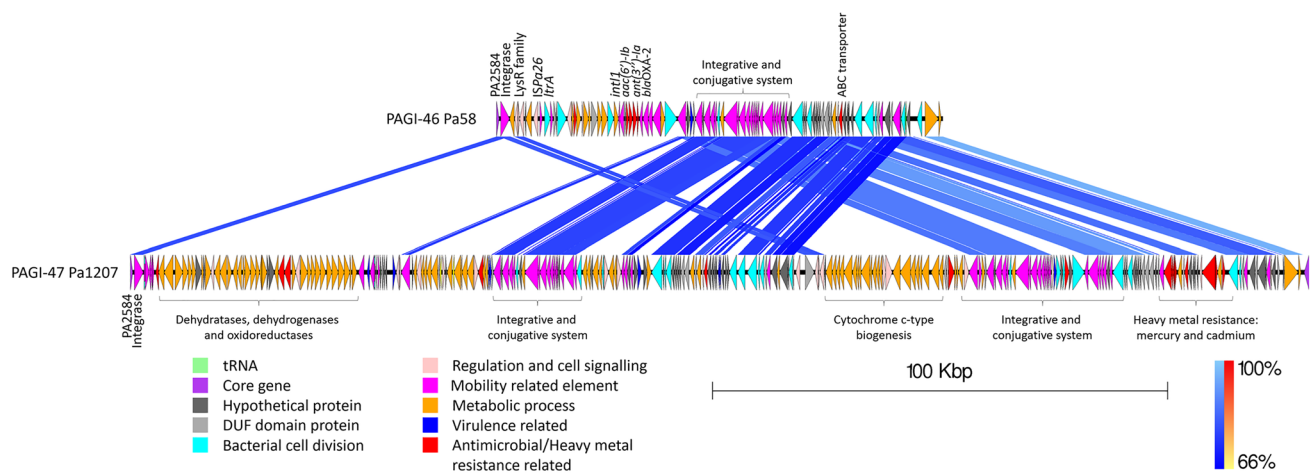


Fig. 3 Structure of the islands located in the RGP27, adjacent to the PA2583.1 locus in the Pa58 and Pa1207 strains

duplications of ORFs that encode acyl-CoA dehydrogenase and acetyl-CoA hydrolase; both products are involved in several metabolic processes, mainly in the degradation of long chain fatty acids (Guzik et al. 2014). The *mmsAB* operon, which is involved in the valine/isoleucine metabolism, was identified (Steele et al. 1992). Other transposases were detected such as *ISAli6* and *ISPsy37* of the *IS256* and *IS3* families, respectively. The *tmpT* gene encoding a coin-tegration component and a relaxase, as well as the *bacA* gene were also identified. The latter encodes the bacitracin biosynthesis and acts as an antibiotic agent, mainly against Gram-positive microorganisms (Konz et al. 1997). In addition, the *vapBC* operon was identified, which encodes a type II toxin-antitoxin system described in the *Salmonella* dublin strain G19 (Pullinger and Lax 1992); there are also protein-encoding genes (TraG and TraD) associated with a conjugation and integration system (Zatyka 2002). The remaining ORFs encode proteins of hypothetical function (Fig. 3; Supplementary Table 1).

Genomic islands PAGI-48 and PAGI-49

In the Pa58 strain, we identified a small mobile genetic element of eight ORFs called PAGI-48, which was inserted into the PA5149.1 locus, adjacent to a tRNA^{Phe} in the RGP62. This island was 13,902 bp in size with a G + C content of 54.21% and had eight ORFs, where three of them are shared with PAGI-8: ORF1 and ORF2 encode a phage-associated integrase and a hypothetical protein, respectively, while ORF4 encodes a TraY/DotA family conjugal transfer protein. PAGI-48 has a 48% identity with the PAGI-8 island. However, this new element has five new ORFs: two of them

encode hypothetical proteins (ORF5 and ORF6), ORF3 encodes a recombination protein, ORF7 encodes for a metal peptidase of the Lmma/IrrE family and ORF8 for a tRNA of an unspecified amino acid (Fig. 4; Supplementary Table 1).

On the other hand, we identified the island PAGI-49 in the strain Pa1242, inserted in the same PA5149.1 locus. It is integrated by 19 ORFs, where 13 of them encode proteins with hypothetical function. ORF2 encodes an integrase associated with the phage, which could be involved in the integration of the island; ORF3 and ORF4 encode a protein of the RHS family, which belongs to the polymorphic toxins of bacterial exotoxins (Jamet and Nassif 2015). These types of toxins have activity against phagocytic cells (Kung et al. 2012) and their role in interbacterial competition against *E. coli* strains has been documented (Koskiniemi et al. 2013; Ma et al. 2017). ORF8 encodes an N-acetyltransferase of the GNAT family associated with resistance to aminoglycosides (Favrot et al. 2016). ORF13 encodes for a VapE virulence-associated protein E. The action mechanism of this protein is not yet defined; however, its presence has been reported in a plasmid of virulent strains. ORF19 encodes a transcriptional regulator of the Alpha family (Fig. 4; Supplementary Table 1).

Genomic islands PAGI-50 and PAGI-51

In three strains, we identified a new inserted island adjacent to a tRNA^{Arg} gene (PA0263.1 locus) in the RGP2. At this locus, the insertion of uncharacterized DNA fragments into reference strains PAO1, PA14, LESB58, and PA7 has been previously described (Mathee et al. 2008); however, the islands identified in our strains did not show homology

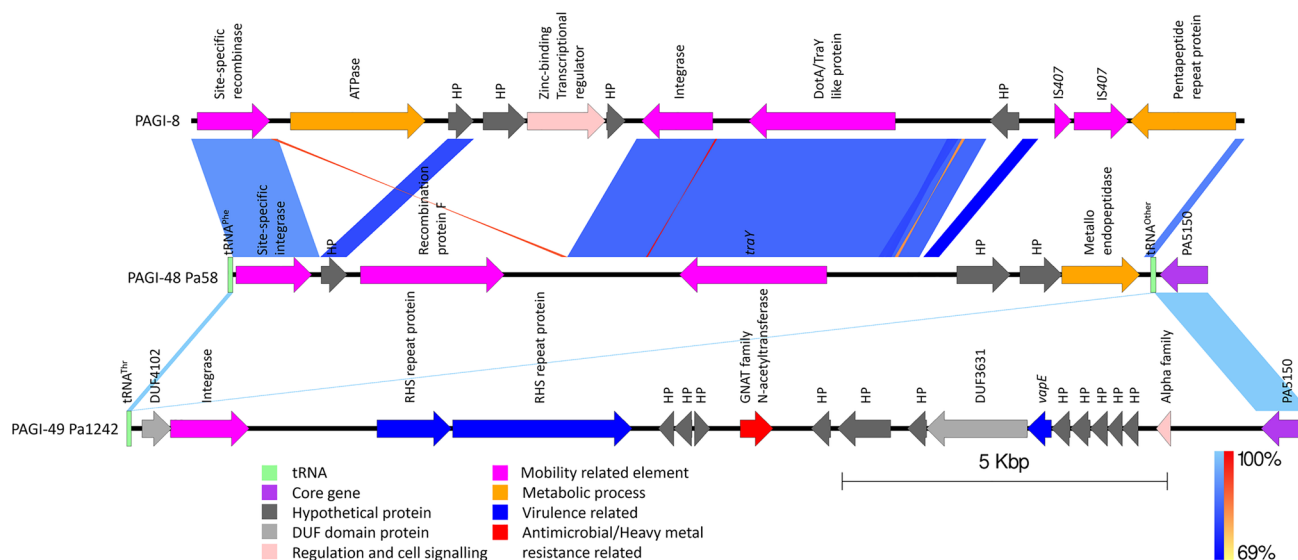


Fig. 4 Structure of the islands located in the RGP62, adjacent to the PA5149.1 locus in the Pa58 and Pa1242 strains

with these DNA fragments. In the Pa58 strain, we identified PAgI-50 inserted adjacent to a tRNA^{Arg} gene (PA0263.1 locus) with 56 ORFs; 52% of these ORFs encode proteins with hypothetical function and several transposases proteins from different families (ISPa57, ISPa37, IS222, ISPa47, ISSal1, ISPa8, and IS1474) were found. Also, we identified an operon that encodes an ABC-like transport system, which has been described in strains of *Salmonella typhimurim* and is involved in the transport of some amino acids (Ohnishi and Kiritani 1992); a transcriptional regulator of the XRE family related to bacteriophage λ (this family of regulators possess a DNA-binding domain and act as repressors in the bacteriophage to stop the lytic state) (Schubert et al. 2007); a modification restriction system composed of an endonuclease and a methyltransferase; an endonuclease formed for the R and S subunits, which recognizes a 4–8 bp palindromic sequence and performs DNA cutting; and an Eco571 methyltransferase (Pingoud and Jeltsch 2001). This system has been reported in many bacteria and, interestingly, prevents infection by bacteriophages that destroy foreign DNA (Vasu and Nagaraja 2013). Finally, the *terY* gene was identified at the 3' end of the island, which encodes a tellurite resistance protein (Fig. 5; Supplementary Table 1).

In strains Pa124 and Pa127, PAgI-51 was identified, this island has 64% identity with PAgI-50 (strain Pa58), sharing between them: the first two ORFs at both 5' ends and the last 27 ORFs at both 3' ends. In PAgI-51, an ABC-type transport system (ORF10 to ORF23) different from PAgI-50 was identified; this system gives bacteria the ability to detoxify sulfur compounds. The MukBEF complex of condensins

reported in *E. coli* (ORF25 to ORF27), which has an especially important role in chromosome organization and segregation, was also identified (Yamazoe et al. 1999). In addition, PAgI-51 shares with the PAgI-50 island a modification restriction system (Eco571) and the tellurite resistance gene (Fig. 5; Supplementary Table 1).

Genomic island PAgI-52

In the strain Pa58 we identified a new inserted island flanking by PA1156 and PA1155 loci in a new RGP (RGP97). This element has 61 ORFs and some of them were determinants of antimicrobial and heavy metal resistance and genes associated with mobility. At 5' end of the island (ORF1 and ORF2) we found a site-specific integrase; a modification restriction system composed of an endonuclease and a methyltransferase, an endonuclease formed for the R and S subunits (ORF8 and ORF9) as reported in PAgI-50; from ORF13 to ORF20 it has a mercury resistance operon (*merE*, *merD*, *merA*, *merC*, *merP*, *merT* and *merR*) related to TnA3 transposon (ORF22 to ORF25); also, it has a double class I integron integrase (ORF27 and ORF50), the first integron only contains the *bla*_{GES-1} gene that confers resistance to beta-lactams antibiotics, while, the second integron presents three genes for resistance to aminoglycosides [*ant*(2''), *aac*(6')-II, and a streptomycin adenylyltransferase]; a type-II toxin-antitoxin system; a class D oxacillin beta-lactamase (OXA-2); *qacE* delta1 gene that confers resistance to quaternary ammonium compounds and *sulI* gene that confers resistance to sulfonamides. Furthermore, this island has

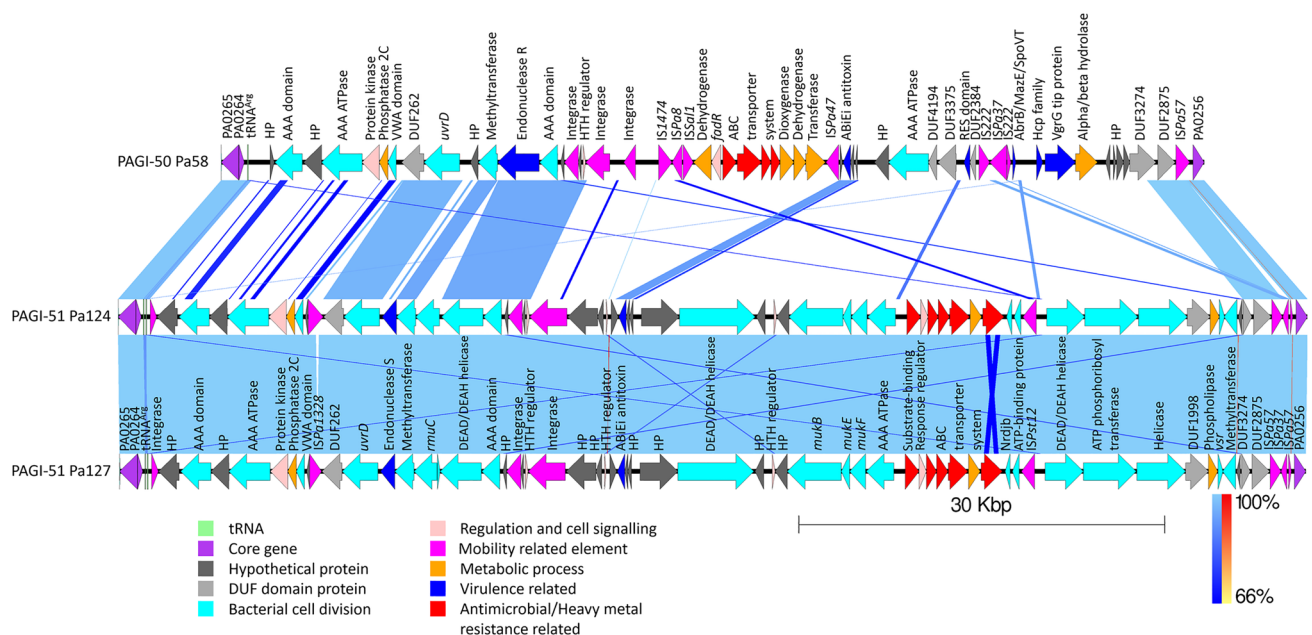


Fig. 5 Structure of the islands located in the RGP2, adjacent to the PA0263.1 locus in the Pa58, Pa124 and Pa127 strains

the insertion sequences: IS1326 (ORF35 and ORF36) and ISPa1635 (ORF56), which increase plasticity and genetic exchange in this element (Fig. 6; Supplementary Table 1).

Genomic island PAGI-53

In the strain Pa1242 a new island was identified between PA5548 and PA5549 loci in a new RGP (RGP102). This element has 52 ORFs and possibly represents a metabolic island, since it has certain enzymes involved in dehydrogenation and oxidation–reduction reaction for compounds such as: FAD or sarcosine; in addition, this island presents an ABC-type transport system for polyamine (ORF4-ORF7); an electron transfer flavoprotein complex (ORF11-ORF13) which has been reported in anaerobic bacteria capable of degrading toluene (Vogt et al. 2019); this island also presents two type-II toxin-antitoxin modules, one of them from the HigBA family (ORF1 and ORF2) (Kedzierska and Hayes 2016; Liu et al. 2020); finally, in the 3' end of the island was found a site-specific integrase (ORF51) (Fig. 6; Supplementary Table 1).

Restructuring the PAPI-2 pathogenic island

The PAPI-2 pathogenicity island has been described in *P. aeruginosa* PA14 strain (He et al. 2004), adjacent to the tRNA^{Lys} gene at PA0976.1 locus. This pathogenicity island has three variants: ExoU island A (*P. aeruginosa* 6077 strain), ExoU island B (*P. aeruginosa* 19660 strain) and ExoU island C (*P. aeruginosa* X13273 strain) (Kulasekara et al. 2006). We identified three other different variants in five of our strains (except strain Pa1207) inserted at the same locus (PA0976.1). In the Pa58 strain, we found an island with four ORFs, which were 99% homologous to the last four PAPI-2 ORFs at its 3' end. Furthermore, it presented

all the ORFs of ExoU island C, so we named this hybrid element, ExoU island C-like. This element conserved the *exoU* gene, which encodes a cytotoxin with phospholipase activity, and the *spcU* gene, which encodes a chaperone for cytotoxin transport; these two genes are essential to confer the characteristic of pathogenicity to the genomic island (Harrison et al. 2010). It also presents two truncated ISPa32 transposases of the IS3 family at the 5' end of the island, which are probably involved in its mobilization (Fig. 7; Supplementary Table 1).

In the strains Pa124 and Pa127, a genomic island of 24 ORFs was identified, inserted in the PA0976.1 locus and was named PAPI-2 ExoU island D. This element was closely related to the PAPI-2 island and the ExoU islands. PAPI-2 ExoU island D has 83% homology with PAPI-2, but has deletion of ORFs 5, 4 and 12, which correspond to transposases. However, the ExoU island D conserved the *exoU* and *spcU* genes, which gave it the property of being a pathogenic element. The ExoU island D shares nine ORFs (ORF 6 to ORF 14) with the ExoU island A, which correspond to a toxin-antitoxin system of the RelE/ParE family and part of a Tra-type conjugation system. In addition, it shares with the ExoU island B, a disulfide bond formation protein (ORF 16) and an N-acetyltransferase (ORF17). The ExoU island D has a set of hypothetical proteins (ORF3-ORF5) and a transposase of the IS66 family (ORF18) (Fig. 7; Supplementary Table 1).

PAGI-6 like island

We identified an MGE inserted at the PA5160.1 locus in two of our strains (Pa124 and Pa127) of 46 ORFs; this island has 80% identity with the PAGI-6 island previously described in the PSE09 strain of *P. aeruginosa* (Battle et al. 2009). The island identified in our strains (Pa124

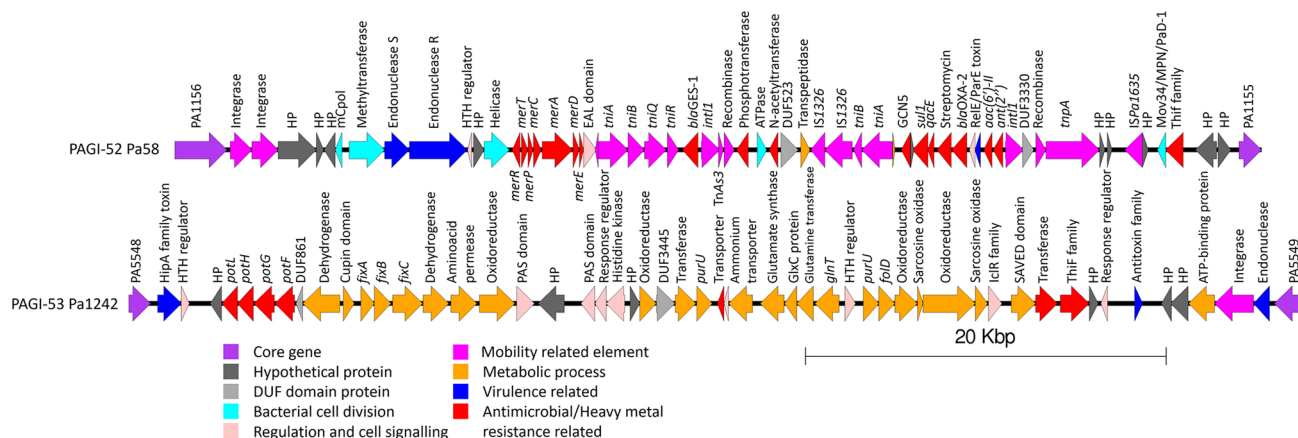


Fig. 6 Structure of the island located in the RGP97, adjacent to the PA1155 locus in the Pa58 strain and structure of the island located in the RGP102, adjacent to the PA5548 locus in the Pa1242 strain

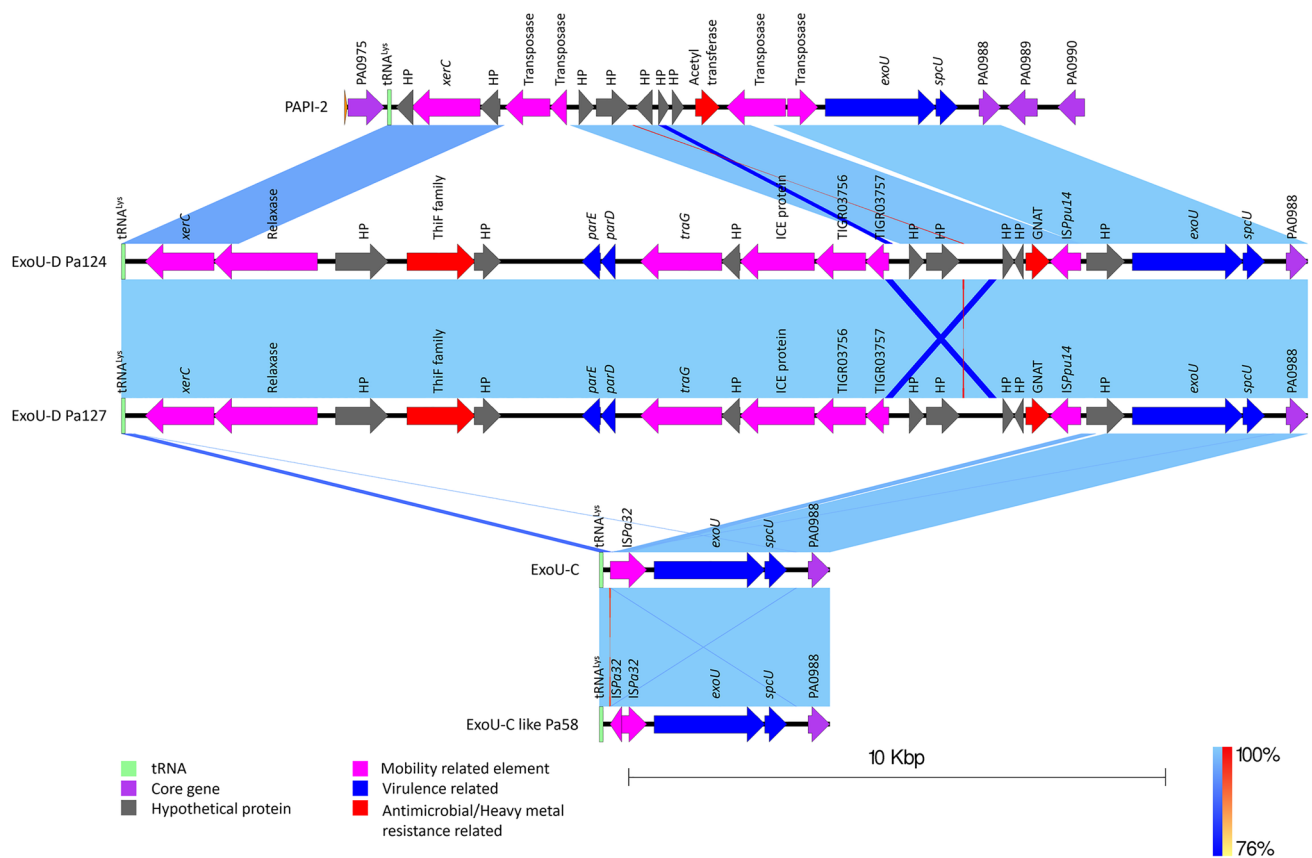


Fig. 7 Restructuring of the pathogenic island PAPI-2 in Mexican strains of *P. aeruginosa*. This figure shows the variation between PAGIs inserted in the RGP7, adjacent to the PA0976.1 locus in Pa58, Pa124 and Pa127 strains

and Pa127) had a deletion of eight ORFs (ORF11, ORF15, ORF20 and the last five ORFs at the 3' end of PAGI-6), which correspond to the CTX phage components as two integrases and a maintenance phage protein. Additionally, it has eight ORFs (ORF1, ORF15, ORF20, ORF29, ORF33 and ORF41-ORF43), inserted throughout the island, of which one gene corresponds to the *cysH* gene (ORF43) that encodes a phosphoadesine phosphosulfate reductase involved in the metabolism of sulfides (Fig. 8; Supplementary Table 1).

PAGI-7 like island

PAGI-7 corresponds to an island previously described in the PSE09 strain, inserted adjacent to the PA3961 locus and it has 20 ORFs (Battle et al. 2009). This island was identified in three of our strains (Pa58, Pa1242 and Pa1207), inserted in the PA3961 locus of RGP88. In our strains, the PAGI-7 island conserved 16 or 20 ORFs of the original PAGI-7 island, presenting at its 3' end the insertion of new ORFs (strains Pa58 and Pa1242) or deletion of ORFs (strain Pa1207) (Fig. 9; Supplementary Table 1).

LESIGI-2 genomic island

The LESIGI-2 island was only present in the strain Pa1207; this element includes the complete operon for the biosynthesis of Pyoluteorin (Gross and Loper 2009), which acts as an antifungal agent playing an important role in the interaction of the genus *Pseudomonas* with plants (Nowak-Thompson et al. 1999).

Novel integrative and conjugative elements (ICEs): ICEPaMx-1, ICEPaMx-2 and ICEPaMx-3

Different novel ICEs were identified in our strains; such elements were inserted into different chromosomal regions, which have not been described as RGPs. These novel plasticity regions present in our strains were assigned according to the Klockgether nomenclature (RGP) (Klockgether et al. 2011). In the Pa58 strain, an ICE inserted between the PA0609 (*trpE*) and PA0610 (*prtN*) loci was identified in RGP90. This new element was assigned as ICEPaMx-1; it has a size of 45,214 bp, a G + C content of 64.15% and 50 ORFs, a 61% homology with the ICEAd1 element of *Achromobacter denitrificans*, a 56% identity with the *Ralstonia*

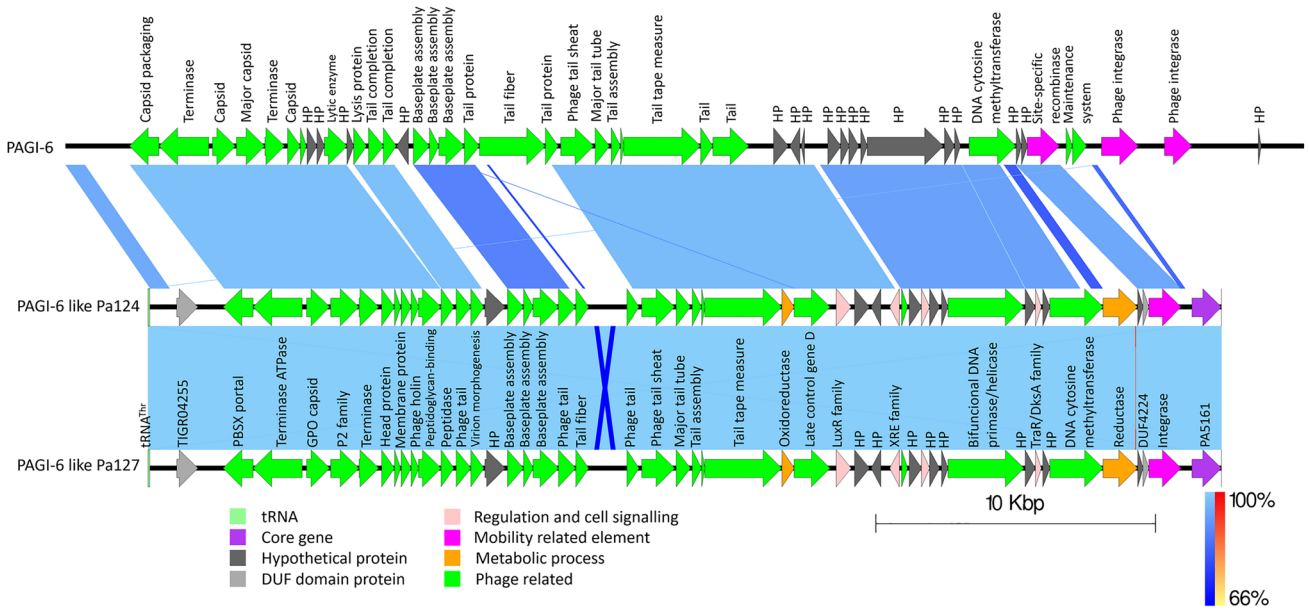


Fig. 8 Structure of the islands located in the RGP87, adjacent to the PA5160.1 locus in the Pa124 and Pa127 strains

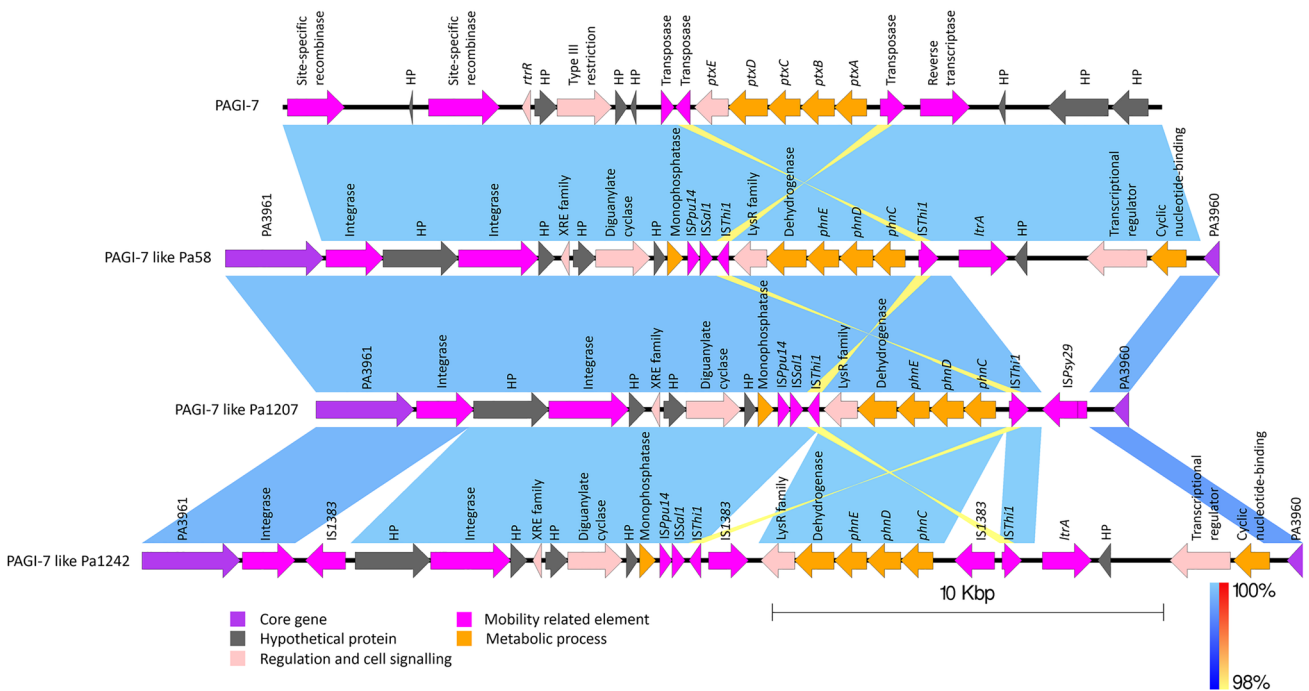


Fig. 9 Structure of islands located in the RGP88, adjacent to the PA3961 locus in strains Pa58, Pa1207 and Pa1242

oxalatica transposon Tn4371 and a 33% with the *E. coli* plasmid pV139-a. ICEPaMx-1 encodes an integrase (ORF1) with domain 4102, associated with the phage. At its 5' end (ORF4 and ORF8), it has the arsenic resistance operon *ars-ABCD*. It also possesses the *ble_{MBL}* gene (ORF10), which encodes a protein that catalyzes nucleophilic substitution

reactions and confers resistance to bleomycin, which is an antitumor antibiotic produced by *Streptomyces verticillus*. This antibiotic is used to slow the growth of cancer cells and as a treatment to fight Kaposi's sarcoma, related to the AIDS virus (Du et al. 2000). In addition, it has the *repA* gene (ORF22) that participates in DNA replication, the

parA gene (ORF24) that encodes an ATPase, and the *parB* gene (ORF25) that encodes a DNA-binding protein, which is necessary for the partition and segregation of DNA at the time of replication, especially in plasmids (Bignell and Thomas 2001). Furthermore, it has an operon (ORF29 to ORF35) that encodes an efflux pump of the MFS family (superfamily of major facilitators), which contains the *emrA* and *emrB* genes that encode the structural components of the pump and confer resistance against nalidixic acid (Lin et al. 2017). Finally, we identified the *trbBCDEJKLFGHI* operon (ORF36 to ORF50) at the 3' end of ICEPaMx-1, which encodes the formation of an apparatus required for the physical translocation of DNA (Li et al. 1999). These types of structures are frequently found in plasmids and are characteristic of ICEs that facilitate the excision of the mobile element from the host chromosome, transferring it to a recipient cell for further integration (Zakharova and Viktorov 2015) (Fig. 10; Supplementary Table 1).

In the strain Pa1207, ICEPaMx-2 was identified inserted between the PA5530 and PA5531 (*tonB1*) loci in the region of genomic plasticity 91 (RGP91). This element has 61% homology with ICEPaMx-1 and 68% identity with ICE-PaeSP of *P. aeruginosa* strain PS106. ICEPaMx-2 has a size of 43,471 bp, a G + C percentage of 65.43% and 55 ORFs. ICEPaMx-2 is a hybrid element that shares the 5' end (from ORF1 to ORF23) and the 3' end (from ORF41 to ORF55) with ICEPaMx-1, except for the arsenic resistance operon (from ORF4 to ORF8 with respect to ICEPaMx-1). It also has a region (ORF24 to ORF40) not reported in any

other mobile element; however, it has 100% identity with a chromosomal region of the *P. aeruginosa* F30658 strain and 91% identity with the *P. aeruginosa* strain AR_0111. The ORFs found in this region correspond to a mercury resistance operon, a cytochrome C oxidase, and a cytochrome biogenesis protein with thiol reductase activity, which have been reported to be associated with plasmid division and proliferation (Deshmukh et al. 2003) (Fig. 10; Supplementary Table 1).

ICEPaMx-3 was identified in the Pa58, Pa124 and Pa127 strains. This element is inserted at the PA2570 locus in RGP26, described in strains PA14 and PA7 (Mathee et al. 2008). ICEPaMx-3 has a size of 42,888 bp, a G + C content of 65.58% and 49 ORFs. Additionally, it has 64% identity with the ICE-kks element of *Acidovorax* sp. KKS102 and 62% with ICEPaCAM-1 from the *P. aeruginosa* strain N17-01173. The 39% of the ORFs identified in ICEPaMx-3 encode proteins of hypothetical function. ICEPaMx-3, like ICEPaMx-2, is a hybrid element that shares the 5' end and the 3' end with ICEPaMx-1 and ICEPaMx-2, except for the arsenic resistance operon. The middle region (ORF27 to ORF34) has 100% homology with a chromosomal region of strain PA14; in this fragment, a penicillinase repressor (Bl*I*; ORF27) was identified. This protein acts as a negative regulator blocking the expression of some β -lactamases (Wittman et al. 1993) and from ORF29 to ORF31, it encodes three components of the CusA efflux pump of the RND family, which is associated with the expulsion of heavy metals

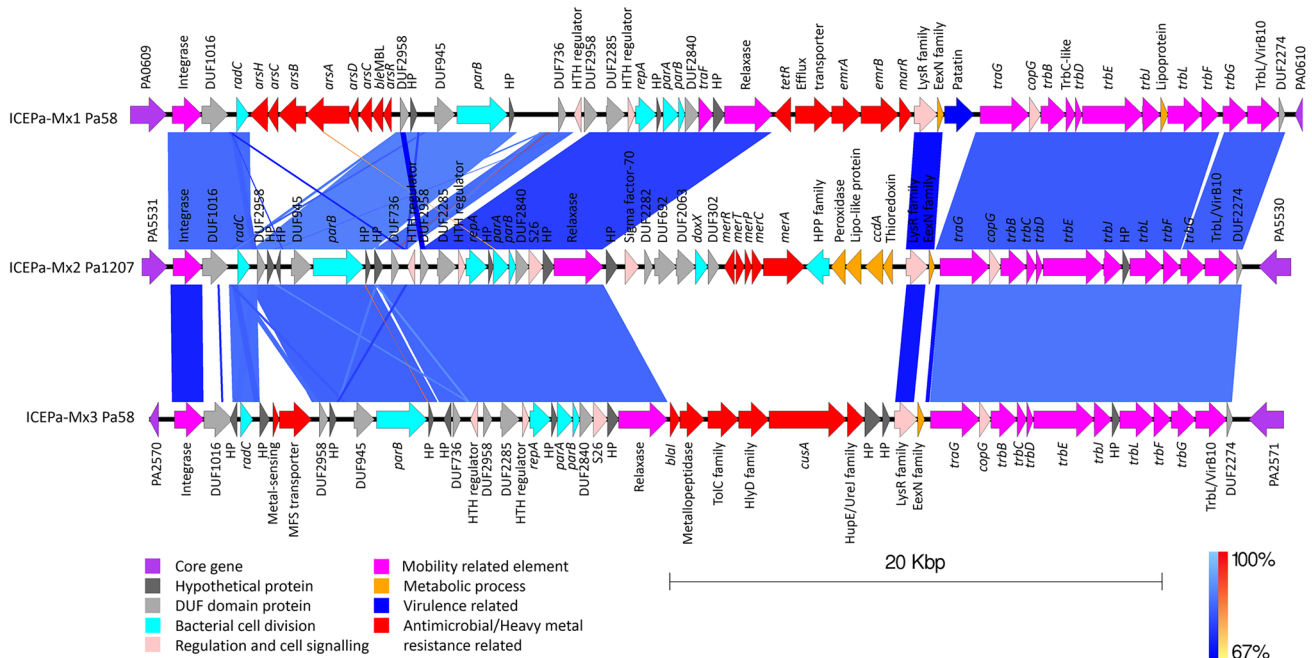


Fig. 10 Structure of ICEs located in the in strains Pa58 and Pa1207

(Long et al. 2011). On the other hand, there is an ICE in the strain Pa1207 that has 84% identity with the ICE-PaMx-3 element, sharing 47 ORFs among them; so, for this reason, we named it ICEPaMx-3-like. This element is inserted between PA0804 (oxidoreductase) and PA0805 (hypothetical protein) loci, in RGP94. ICEPaMx-3-like has a size of 42,356 bp, a G + C content of 64.99% and 48 ORFs; however, it lost ORF3 and ORF5 from the ICE-PaMx-3 element and has an inserted ORF (ORF11) that encodes an N-acetyltransferase (Fig. 10; Supplementary Table 1).

In strains Pa58, Pa124, Pa127 and Pa1207 the same ICE was identified. This element shares 100% identity with the 5' end (from ORF35 to ORF82) of the plasmid p34998-293.973 kb of *Enterobacter hormaechei* subsp. *steigerwaltii*, with the plasmid p35734-141.404 kb of *Enterobacter cloacae*, and with the plasmid 2964TF of *Klebsiella pneumoniae*. However, this ICE inserts at different loci in each strain, for example: in strain Pa58, it is inserted between loci PA3057 (hypothetical protein) and PA3058 (*pelG*), in a RGP92 not previously reported; whereas in strains Pa124 and Pa127, it inserts at the PA1579 locus in RGP75, which was previously described in strain PA7 (Roy et al. 2010). Finally, in the strain Pa1207, this element is inserted between the loci PA3655 (*tsf*) and PA3656 (*rpsB*), in an RGP93 not previously reported. This ICE has a size of 46,513 bp, a G + C content of 63.14% and 51 ORFs. Additionally, the conjugative operon *trbBCDEJKLFGHI* (from ORF39 to ORF51) was identified at its 3' end. This DNA fragment (ICE) identified in our strains mainly encodes an ABC transporter (from ORF25 to ORF28) and an efflux pump of the RND family (from ORF29 to ORF38) (Supplementary Table 1).

Integrans

In the strains Pa124 and Pa127 a class 1 integron was identified, which had been previously reported in several strains of the Enterobacteriaceae family (Deng et al. 2015; Lacotte et al. 2017). In our strains, this integron was inserted into a new plasticity region (RGP102) not described in *P. aeruginosa*, adjacent to the PA5548 locus. This integron has a 99% identity between the two Mexican strains, differing only by the presence of an additional ORF in the Pa127 strain. The class 1 integron encodes antimicrobial resistance determinants, such as: *aac(6')-33*, which encodes an acetyltransferase; the *ant(3'')-1a* gene, which encodes a nucleotidyltransferase (only in strain Pa127); and two proteins of the N-acetyltransferase family. These products give it the characteristic of being resistant to aminoglycosides. In addition, the class 1 integron has two alleles of the *bla_{GES}* gene (19 and 20) that encode a class A β -lactamase, which are enzymes with extended activity that act on all the antimicrobial agents of the β -lactam group; an ammonium compound transporter (QacE delta), the *sulI* gene for resistance to sulfonamides, a tetracycline transport system (*tetG* and *tetR*) and the *floR* gene for chloramphenicol resistance (Fig. 11; Supplementary Table 1).

Islets

New genomic islets were identified in strains Pa84, Pa1207 and Pa1242, which correspond to DNA regions whose size is less than 10 kb (Hacker and Carniel 2001). We assigned Islet-Mx1 (strain Pa84) to an inserted DNA region adjacent to tRNA^{Pro} (locus PA2736.1); this genetic element is in RGP-28. Previously, the insertion of the LESGI-1 island in the strain LESB58 was described in RGP-28; this genetic

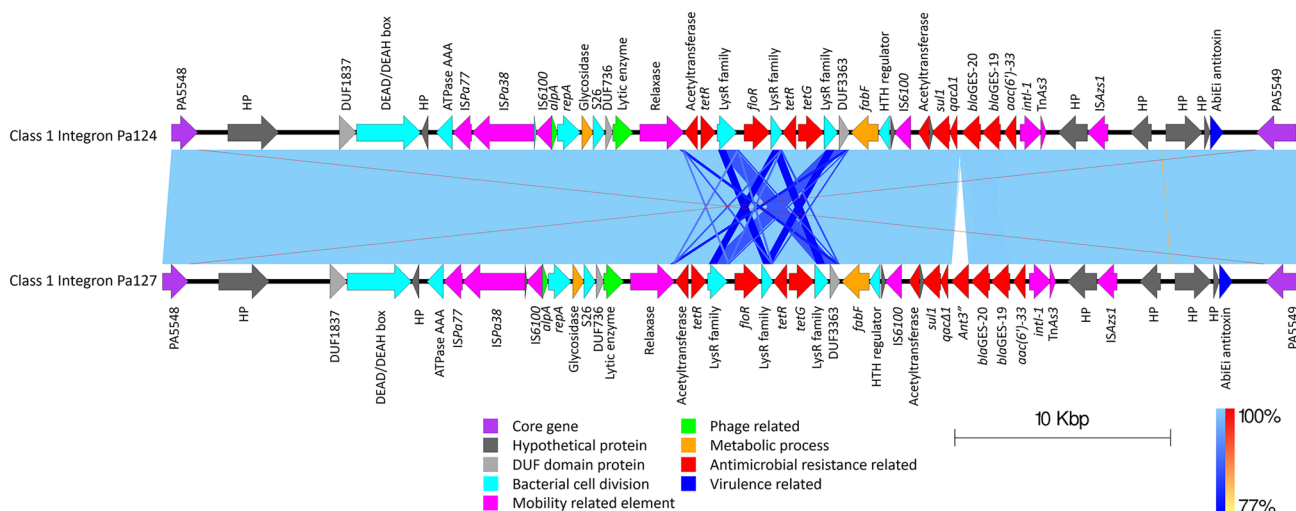


Fig. 11 Structure of the class 1 integron located in the RPG102, inserted to the PA5548 locus in strains Pa124 and Pa127

element has a size of 7,906 bp, a 55.86% of G + C composition and 10 ORFs. Islet-Mx1 is characterized by the presence of the restriction endonuclease *Eco29ki* from plasmid pSACII 1 of *E. coli* strain 29, three other homing endonucleases from different structural families, a DNA cytosine methyltransferase M, a nucleotide pyrophosphodrolase and a toxin from the SymE family, which are part of the toxin-antitoxin type I system; however, the antitoxin gene was not identified forming an operon. The rest of the element corresponded to hypothetical proteins (Fig. 12; Supplementary Table 1).

In the strain Pa1207, two islets were identified (Islet-Mx2 and Islet-Mx3), where the first one was inserted next to the PA0819 locus in RGP-6. It has a size of 4783 bp, a 55.86% of G + C content and five ORFs, three of which are hypothetical proteins; also, it has a site-specific integrase at the 3' end of the element and a tmRNA (*ssrA*). Islet-Mx3 was inserted adjacent to the PA3768 locus in RGP-36. It has a size of 6,549 bp, a 60% of G + C content and five ORFs, which encode an NADP-dependent oxidoreductase, a transcriptional regulator of the AraC family, an MFS transporter and a hypothetical protein (Fig. 12; Supplementary Table 1).

In the strain Pa1242, the Islet-Mx4 was identified inserted adjacent to the PA1934 locus. At this locus, the PAGI-11 island was described in the *P. aeruginosa* strain PSE09;

however, Islet-Mx4 has no homology to PAGI-11. Islet-Mx4 has a size of 5,203 bp, a G + C content of 56.67% and is formed by two ORFs. The first ORF encodes an ATP-dependent helicase, while the second ORF has a premature stop codon that makes it a truncated protein (Fig. 12; Supplementary Table 1).

Insertion sequence elements

We identified seven new elements composed of genes associated with mobilization-like insertion sequences and transposases. The MGE was named consecutively according to the following nomenclatures: IS-Mx followed by the corresponding number.

IS-Mx1 was identified in the Pa58 strain inserted adjacent to the PA2736.1 locus in RGP28. Previously at this locus, insertion of the island LESGI-1 in epidemic strains of LES was reported; however, this new element has no homology to the LESGI-1 island. IS-Mx1 has a size of 6,190 bp, a 60.04% of G + C and seven ORFs; this element has a duplication of the transposase IS222 and a copy of the transposase *ISPa37*. In addition, it has a toxin-antitoxin type I system of the SymE family and a pyrophosphohydrolyase nucleotide; the rest of the ORFs are hypothetical proteins (Fig. 13; Supplementary Table 1).

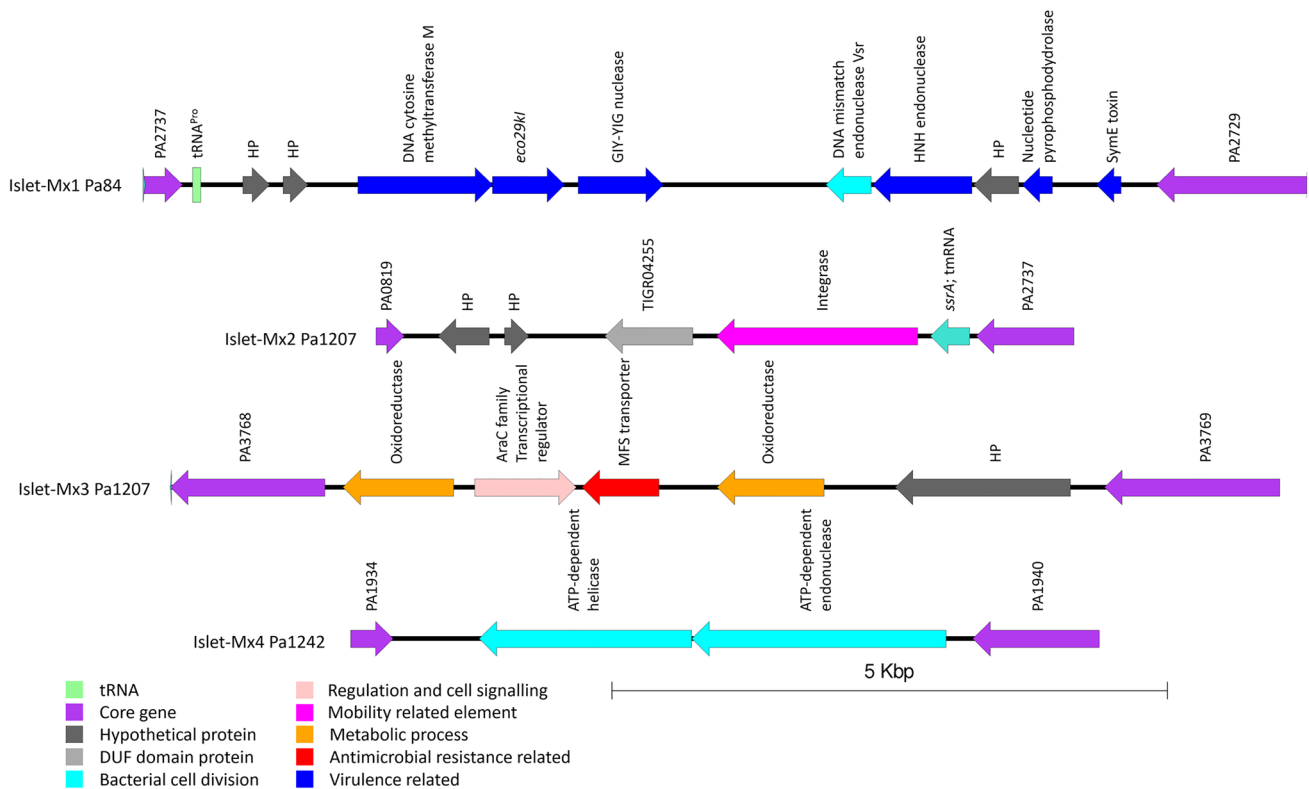


Fig. 12 Structure of the islets located in strains Pa84, Pa1207 and Pa1242

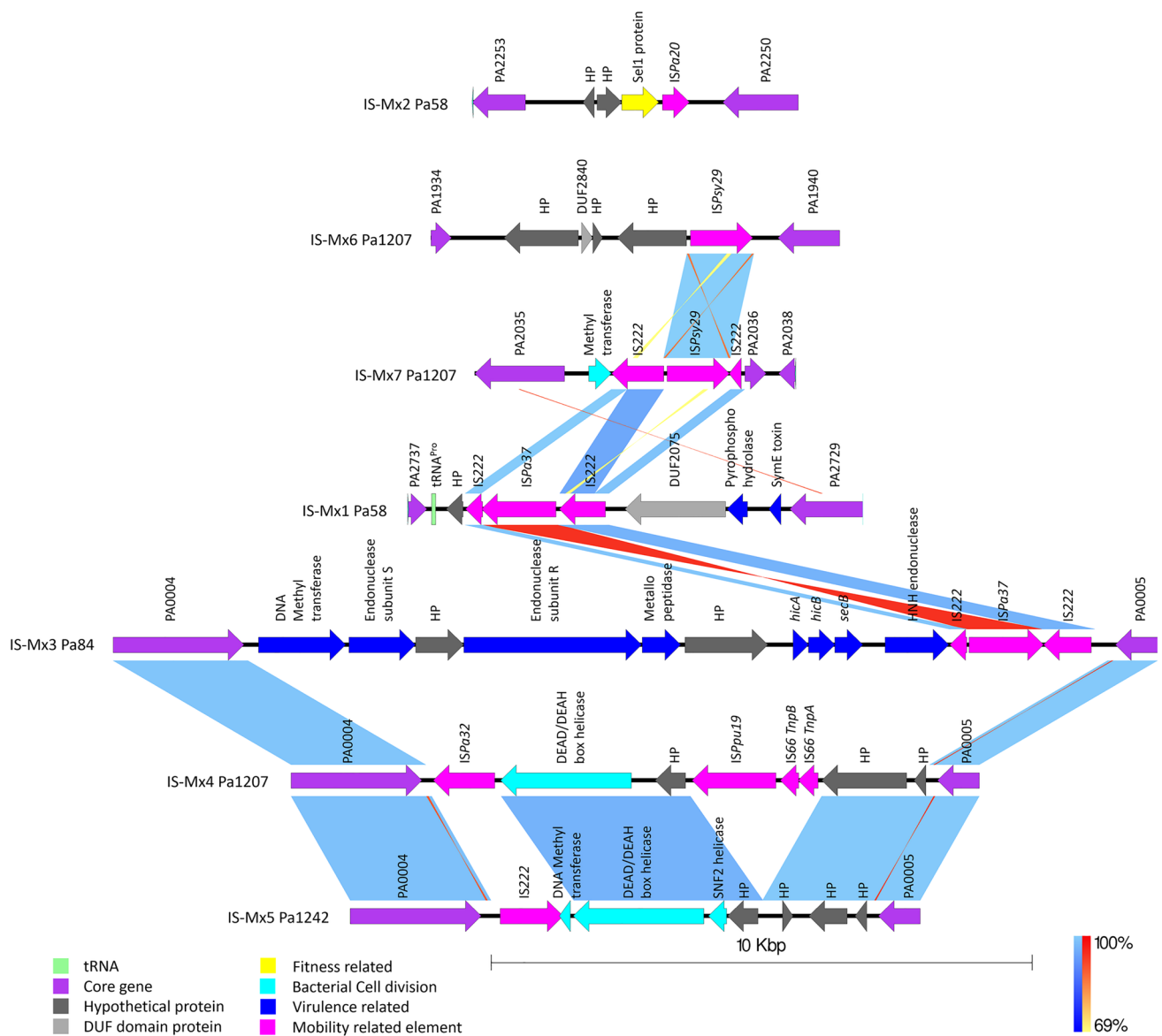


Fig. 13 Structure of the IS-elements located in strains Pa58, Pa84, Pa1207 and Pa1242

IS-Mx2 was identified in the strain Pa58, inserted adjacent to the PA2250 locus in a new RGP-96. This element is 1,965 bp in size, has a 60.04% G + C content and possesses four ORFs. Additionally, we identified an *ISPa20* transposase, the Sel1 repeat family protein, and the rest were hypothetical proteins (Fig. 13; Supplementary Table 1).

IS-Mx3 was identified in the Pa84 strain, inserted adjacent to the PA0004 locus in a new RGP-99. This element is 15,401 bp in size, possesses a 55.88% G + C content and has 13 ORFs. It has two different transposases (IS222 and *ISPa37*), which are involved in its mobilization; it also had a type I restriction-modification system and a toxin-antitoxin type II system of the HicAB family, a M48

metallopeptidase and a SecB translocase subunit (Fig. 13; Supplementary Table 1).

Likewise, in the same RGP (RGP-99), next to the PA0004 locus of strain Pa1207, a different element named IS-Mx4 was identified. It has a size of 9,108 bp, a 55.88% of G + C and eight ORFs. This element presented the transposases *ISPa32* and *ISPpu19* together with their insertion sequences TnpA and TnpB; the rest of the ORFs were hypothetical proteins. Furthermore, in the same RGP (RGP-99) but in the strain Pa1242, a different IS-Mx5 element was identified with 6,779 bp, 55.65% of G + C content and eight ORFs. Also, we identified an IS222 transposase, a site-specific DNA-methyltransferase, a DEAD/DEAH box helicase and

a domain protein from the helicase/SNF2 family; the rest of the ORFs were hypothetical proteins (Fig. 13; Supplementary Table 1).

On the other hand, we identified two new MGEs in the strain Pa1207 from children. The first MGE was named the IS-Mx6 insertion sequence, which was inserted at the PA1934 locus within RGP52. Initially, the PAGI-11 island reported in the PSE09 strain of *P. aeruginosa* has been described at this locus; however, IS-Mx6 has no homology with PAGI-11. IS-Mx6 has a size of 4770 bp, a G + C content of 54.04% and six ORFs, where the last ORF encodes the IS P_{sy29} transposase of the IS3 family; the rest of the ORFs encode hypothetical proteins. The second element was called IS-Mx7 and was inserted adjacent to the PA2035 locus in RGP-20; this element has a size of 2,536 bp, 57.76% of G + C and four ORFs. A duplication of the IS222 transposase, an IS P_{sy29} transposase and a protein containing the methyltransferase domain with high homology to the PA2036 locus were identified (Fig. 13; Supplementary Table 1).

CRISPR arrays and CRISPR-Cas

Two strains (Pa58 and Pa84) presented CRISPR arrays sequences in their genomes, in the strain Pa58 the CRISPR array has a size of 627 bp, with the consensus direct repeat sequences: GTTCACTGCCGTATAGGCAGCTAAGAAA and 10 spacer sequences (Fig. S1A). Meanwhile, in the strain Pa84, two CRISPR arrays sequences were identified, the first is 1067 bp in size, has 17 spacer sequences and a 29 bp consensus direct repeat sequence: CGGTTCATCCCCACG CATGTGGGGAACAC (Fig. S1B). The second CRISPR array sequence is 578 bp in size, with 9 spacer sequences and a consensus direct repeat sequence of 29 bp: CGGTTC ATCCCCACCCCGTGGGGAACAC (Fig. S1C), these sequences are flanking an operon that encodes for CRISPR-associated proteins (CAS) of type I-E described for the first time as an immunity system towards plasmid components in *E. coli* (Brouns et al. 2008), this operon was identified in the RGP12 at the PA1243 locus of Pa84 strain and it is formed by 9 ORFs (Fig. S1D; Supplementary Table 1).

Antimicrobial susceptibility

According with the antimicrobial susceptibility assay, we found a specific susceptibility profile for each strain. Strain Pa127 was the strain with the highest resistance profile, being only susceptible to polymyxin B; strains Pa58 and Pa124 were resistant to 18 of the 20 antimicrobials tested, both strains were susceptible to polymyxin B, while strain Pa58 was susceptible to aztreonam and strain Pa124 presented intermediate resistance to imipenem; strain Pa1207 showed resistance to all β -lactams and aminoglycosides,

with the exception of aztreonam and gentamicin respectively, this strain was sensitive to polymyxin B and all the fluoroquinolones tested; strain Pa84 was only resistant to imipenem, ciprofloxacin and levofloxacin, in addition, this strain presented intermediate resistance to carbenicillin, ceftazidime and norfloxacin, and was susceptible to the rest of the antimicrobials; finally, strain Pa1242 was susceptible to 19 of the 20 antimicrobials and surprisingly it was the only strain that presented resistance to polymyxin B (Table 3).

We were able to classify our strains based on the phenotypic stratification scheme for antimicrobial resistance or susceptibility profiles (Magiorakos et al., 2012). We found that three of the strains (Pa58, Pa124 and Pa127) were classified as extensive drug-resistant (XDR) since they were resistant to at least one antimicrobial from each group tested; two strains (Pa84 and Pa1207) were classified as multidrug-resistant (MDR), being resistant to at least one antimicrobial in 3 or more groups; and one strain (Pa1242) was classified as susceptible, since it was only resistant to one antimicrobial agent (polymyxin B) of all 20 tested.

MGEs and phenotyping relationship

According to the phenotype and the presence of resistance genes in MGEs, the strains Pa58, Pa124 and Pa127 presented a resistance profile of extensive-drug resistant, this phenotype could be explained by the presence of genes acquired through horizontal transfer. As it is the class 1 integron, which is present and inserted in the chromosome of strains Pa124 and Pa127, a double copy of the *bla*_{GES-1} gene is present in this integron (alleles 19 and 20, respectively). While in the strain Pa58, it is present on two islands (PAGI-41 and PAGI-46). On the island PAGI-41 the integron has the gene for beta-lactamase GES-1 and on PAGI-46 the gene for beta-lactamase OXA-2 is present. These extended-spectrum beta-lactamases could be responsible for the resistance to all members of the beta-lactam group in these three strains. It is worth mentioning that all *P. aeruginosa* strains intrinsically possess the genes that encode for AmpC beta-lactamases and OXA-50, these two beta-lactamases are working basal to the stimulus of the antimicrobial, when this stimulus increases the beta-lactamases present an overexpression it which causes a direct effect on resistance in the strain. In addition, in class 1 integron of the three strains, an acetyl transferase (AAC[6']-33) and a nucleotidyltransferase (ANT[3']-1a) were found, these enzymes are responsible for producing modifications in aminoglycosides, which can be this is the cause of resistance to this group of antimicrobials. It should be noted that in the integron class 1, the presence of the *sull* and *floR* genes that confer resistance to sulfonamides and chloramphenicol, respectively, were also found, however, these antimicrobials were not tested since it is known that *P. aeruginosa* is inherently resistant to both. In addition, the three strains (Pa58, Pa124 and Pa127) presented a

Table 3 Antimicrobial susceptibility profiles of Mexican *P. aeruginosa* strains

Antimicrobial agent/strain	Pa58	Pa84	Pa124	Pa127	Pa1207	Pa1242
Carbenicillin	R	I	R	R	R	S
Ticarcillin	R	S	R	R	R	S
Piperacillin	R	S	R	R	R	S
Ticarcillin/clavulanic acid	R	S	R	R	R	S
Piperacillin/tazobactam	R	S	R	R	R	S
Ceftazidime	R	I	R	R	R	S
Ceftriaxone	R	S	R	R	R	S
Cefotaxime	R	S	R	R	R	S
Cefepime	R	S	R	R	R	S
Imipenem	R	R	I	R	R	S
Meropenem	R	S	R	R	R	S
Aztreonam	S	S	R	R	S	S
Amikacin	R	S	R	R	R	S
Gentamicin	R	S	R	R	S	S
Tobramycin	R	S	R	R	R	S
Polymyxin B	S	S	S	S	S	R
Ciprofloxacin	R	R	R	R	S	S
Lomefloxacin	R	S	R	R	S	S
Norfloxacin	R	I	R	R	S	S
Levofloxacin	R	R	R	R	S	S
	XDR	MDR	XDR	XDR	MDR	SUS

R resistant, I intermediate resistance, S susceptible, XDR extensively drug-resistant, MDR multidrug-resistant, SUS susceptible

mutation in the *gyrA* gene that caused the change from a serine to a leucine at amino acid 83, which confers resistance to all the antimicrobials of the fluoroquinolone group. Finally, only in strain Pa58, several antimicrobial modifying enzyme genes were identified: an *N*-acetyltransferase (*aacA*), an adenylyltransferase (*aadA1*) present within the PAGI-46 island.

The other three strains (Pa84, Pa1207 and Pa1242) did not show antimicrobial resistance genes in mobile elements. However, Pa84 is resistant to three of the antimicrobials of fluoroquinolones and beta-lactams, resistance may be due to intrinsic mechanisms such as efflux pumps, overexpression of chromosomal beta-lactamases AmpC and/or OXA-50. The strain Pa1242 only shows resistance to polymyxin B, explained by the presence of a mutation in the *parR* gene of the two-component system ParR-ParS. The strain Pa1207 presents a multi-drug resistance phenotype, where it is only resistant to beta-lactams and aminoglycosides. In this strain a mutation was identified for the *oprM* gene, which codes for the porin OprM component of the MexAB pumps (for beta efflux-lactams) and MexXY (for aminoglycoside efflux).

Discussion

P. aeruginosa is a bacterium with great genomic variability due to its accessory genome, which is acquired through HGT processes (Kung et al. 2010; Dunning Hotopp 2011). This outstanding feature gives it the ability to adapt to multiple niches, coupled with its metabolic versatility. In the present study, we analyzed the complete genomes of six Mexican clinical strains of *P. aeruginosa*, where the MGEs were characterized. The results showed that genomic variability is greater than previously reported (Mathee et al. 2008; Battle et al. 2009; Winstanley et al. 2009; Kung et al. 2010; Roy et al. 2010), since a large number of mobile elements of different origin could be identified, which have not been documented in the chromosome of *P. aeruginosa*. These results corroborate the chromosomal dynamics and reorganization that genomes carry out with the integration of new extrachromosomal DNA necessary for the adaptation or survival of the

bacterium in a specific niche, especially in the hospital environment (Mathee et al. 2008; Klockgether et al. 2011). Our strains had a large genome between 6.5 and 7.4 Mbp, like other clinical strains due to the incorporation of extrachromosomal genetic material in the bacterium's chromosome (Ozer et al. 2014; Andreani et al. 2017; Subedi et al. 2018). We identified a total of 19 new GIs, four novel islets, two new ICEs, 19 new prophages, eight novel transposons and 13 novel RGP distributed throughout the chromosomes of our strains. Although almost all genetic elements have genes that encode antimicrobial and heavy metal resistance, they also have a large content of genes that encode products that have no specific function or are hypothetical proteins.

Our results support that mobile elements are constantly changing their genetic mosaics (Rankin et al. 2011), since, although some islands found had a high percentage of identity (> 70%) with elements already described, they also presented changes, such as insertions or deletions of several genes, mainly mediated by the acquisition of insertion sequences or transposons in the GIs. Such events are reported to occur randomly in the genome and that the insertion sequences behave like selfish elements; however, they have a great impact on the evolution of the accessory genome of bacteria, since they can carry genes that encode factors for virulence or resistance to agents toxic to bacteria, such as antimicrobials or heavy metals (Werren 2011; Wu et al. 2015; Di Cesare et al. 2016), attributing new adaptive characteristics. Furthermore, the retention of genes in changing MGEs tells us that these genes are necessary for the survival or adaptation of bacteria under specific conditions; for example, all of our strains retained the first 30 ORFs of the PAGI-1 genomic islands, which mostly encode enzymes with dehydrogenase activity, involved in the evasion of the immune response suggesting that *P. aeruginosa* uses these enzymes to survive against the attack of the immune system in the primary stage of infection (Barth et al. 2013). Similarly, the integration of operons with complete resistance to heavy metals such as copper, cadmium, zinc and even mercury, indicates that these elements are necessary for the microorganism to increase its resistance to these components that are normally present in many disinfectants used both in the agricultural and hospital fields (de Silva et al. 2012; Rojas Pirela et al. 2014; Argudín et al. 2019). Paradoxically, the novel GIs presented operons that encode restriction-modification systems (Lee et al. 1992; Vasu and Nagaraja 2013), which are used by bacteria as a system to eliminate the random integration of extrachromosomal DNA, allowing only the integration of genes necessary for a better adaptation to the environment. In this way, restriction-modification systems could be acting as an epigenetic control system for the integration of foreign DNA, so that the chromosome does not begin to introduce genetic material randomly (Vasu

and Nagaraja 2013; Nye et al. 2019; Phillips et al. 2019). Something similar was identified in the strain Pa84, which was the only one that presented a complete operon of the CRISPR-Cas system. Furthermore, it was also the strain that presented the least number of MGEs in its genome and therefore, the smallest genome among our strains. This system is known to have catalytic activity on DNA, especially that of viral origin (bacteriophages), which could explain why this strain has fewer integrated phages than the rest of the strains (Cady et al. 2012; Chen et al. 2018). Both, the modification-restriction system and the CRISPR-Cas system can promote chromosomal stability by avoiding excessive integration of extrachromosomal DNA (Darmon and Leach 2014; Cubbon et al. 2018).

Another important aspect, especially in strains of hospital origin, is their resistance to several antimicrobial agents. In our strains, MGEs that carry antimicrobial resistance genes were identified; for example, the presence of class 1 integrons, which are transferred by mobile elements from one bacterium to other bacteria of different genera and species (Gillings et al. 2008; Deng et al. 2015; Ghaly et al. 2017). Integrons are known to spread easily between different populations of bacteria in the same niche (Ghaly et al. 2017); these elements may contain "clusters" of resistance genes to different groups of antimicrobials (Deng et al. 2015) and under selective pressure, such as the use of high doses of antimicrobial agents, integrons can bind to the chromosome (Gillings et al. 2008). The integrons identified in our strains showed variability in their genetic content, having genes that encode aminoglycoside modifiers [*aac(6')*-33, *ant(3'')*-1a], β -lactamases (GES-19 and 20, OXA-2), a transporter of ammonium compounds (QacE delta), a *sulI* sulfonamide resistance gene, a tetracycline transport system (*tetG* and *tetR*) and the chloramphenicol resistance *floR* gene. The resistance genotype of our strains was in concordance with the antimicrobial resistance phenotype, which was performed in a previous study (Morales-Espinosa et al. 2012).

Currently, there are reports of high-risk clonal groups of *P. aeruginosa* strains disseminated in hospitals around the world, which belong to specific STs (ST111, ST235 and ST175), with specific genetic characteristics and multi-resistance to antimicrobials (Witney et al. 2014; Oliver et al. 2015; Pea et al. 2015). In Mexico, ST309 was identified as a potential high-risk clone (Morales-Espinosa et al. 2017). In this study, two strains were identified with the same ST (ST309); both strains are MDR or XDR and have important virulence factors such as U and S exotoxins (Schulert et al. 2003; Firouzi-Dalvand et al. 2016). Like ST309, ST277 is associated with high-risk strains. This clonal group was first described in an epidemic outbreak in Sao Paulo, Brazil (Nascimento et al. 2016); however, it has spread, with reports of this clone being found in patients from the United Kingdom

(Hopkins et al. 2016) and even in the microbiota of migratory birds, which could be the source of dissemination of this clone throughout the world (Martins et al. 2018). ST277 strains are characterized by the presence of the metallo β -lactamase SPM-1 on the genomic island PAGI-15, which confers resistance to carbapenems (Kos et al. 2015). However, in our strain Pa1242 with ST277, the presence of the PAGI-15 island or the β -lactamase SPM-1 was not found and phenotypically the strain only presented intermediate resistance to polymyxin B and was susceptible to the rest of the tested antimicrobials (Morales-Espinosa et al. 2017). It is likely that in the case of *P. aeruginosa* ST277 strains, the presence of the PAGI-15 genomic island is responsible for multidrug resistance. Both ST308 (strain Pa58) and ST155 (strain Pa1207) have been reported in different studies around the world; however, they are not related to epidemic outbreaks or strains with high antimicrobial resistance (Kidd et al. 2013, 2015; Wang et al. 2014; Jeraldo et al. 2015; Subedi et al. 2018). The strain type ST308 has remarkably similar genetic characteristics to the strains belonging to the clonal group ST309, such as, high resistance to antimicrobials, presence of virulence factors and content of several MGEs in its chromosome. These particularities of the clonal group ST308 could imply the production of serious nosocomial infections with a high dissemination potential. Therefore, this should keep us on alert to maintain a close epidemiological surveillance in the different hospitals.

In Mexico there are no epidemiological studies in which the serotype of the *P. aeruginosa* strains is associated with the severity of the nosocomial infection. In the present study, three strains were identified with serotype O11, which is reported as the most frequent serotype related to intrahospital infections (Estahbanati et al. 2002; Kour et al. 2002; Q. et al. 2014). This serotype is attributed a high virulence, since most of the strains have a type III secretion system and the toxin ExoU (Faure et al. 2003), which is present on the pathogenicity island PAPI-2 (He et al. 2004). Our results showed that the three strains identified as serotype O11 are the only ones that contain the ExoU toxin. Another strain (Pa1207) presented serotype O6, which is also one of the most frequent serotypes reported in nosocomial infections; however, this serotype is negative for the type III secretion system and the ExoU toxin (Faure et al. 2003). The rest of our strains presented rare serotypes to be clinical strains. However, these serotypes have variable numbers of MGEs, different antimicrobial susceptibility profiles, and virulence gene content. Therefore, it is advisable to carry out an epidemiological study to determine if there is a relationship between the serotype of the strains with their genetic content and their susceptibility pattern, as pointed out by some authors.

Conclusions

The genetic variability found in our *Pseudomonas aeruginosa* strains is given by the large number of mobile genetic elements integrated into their accessory genome, such as genomic islands, transposons, integrons, plasmids or phages, which can be up to 23 different MGEs per chromosome. These MGEs have been acquired by horizontal gene transfer, which increases the ability of the strains to adapt or survive environment stress. The acquisition of extrachromosomal genes favors genomic plasticity, chromosomal rearrangements and is one of the driving forces of bacterial evolution. The bacterial genome is known to be prone to change during infection in humans, where selective pressures are exerted on the pathogen, resulting in large chromosomal changes, which can also affect the expression or functionality of the genes and can influence the clinical outcome and have an impact in treatment.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s13258-021-01155-3>.

Acknowledgements We are grateful to Dr. Jorge Castañon and Dra. Guadalupe Miranda for providing the collection of *Pseudomonas aeruginosa* strains used in this study. We thank José Mendez Sanchez and Francisca Trujillo Jimenez for their technical support, Dra. Luisa Beatriz Sandner for her helpful discussions; Guillin Wang from the Yale Center for Genome Analysis, Yale University, for the skillful PacBio sequencing. This paper is part of the doctoral research carried out by L.F.E-C., a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and has received CONACyT fellowship 619928.

Author contributions Methodology, GD, and LFE-C; formal analysis, GD, LFE-C and RM-E; data curation, LFE-C; writing original draft preparation, LFE-C, and RM-E; supervision, GD, AC and RM-E; Conceptualization, resources, project administration and funding acquisition, RM-E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding This research was funded by DGAPA-PAPIIT grant number IN213816 from Universidad Nacional Autónoma de México. The funder has no role in the study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

- Andreani NA, Hesse E, Vos M (2017) Prokaryote genome fluidity is dependent on effective population size. *ISME J* 11:1719–1721. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.36>

- Argudín MA, Hoefler A, Butaye P (2019) Heavy metal resistance in bacteria from animals. *Res Vet Sci* 122:132–147. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.11.007>
- Barth K, Remick DG, Genco CA (2013) Disruption of immune regulation by microbial pathogens and resulting chronic inflammation. *J Cell Physiol* 228:1413–1422. <https://doi.org/10.1002/jcp.24299>
- Battle SE, Meyer F, Rello J et al (2008) Hybrid pathogenicity island PAGI-5 contributes to the highly virulent phenotype of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in mammals. *J Bacteriol* 190:7130–7140. <https://doi.org/10.1128/JB.00785-08>
- Battle SE, Rello J, Hauser AR (2009) Genomic islands of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 290:70–78. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01406.x>
- Bhagirath AY, Li Y, Somayajula D et al (2016) Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulm Med* 16:1–22. <https://doi.org/10.1186/s12890-016-0339-5>
- Bignell C, Thomas CM (2001) The bacterial ParA-ParB partitioning proteins. *J Biotechnol* 91:1–34. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00293-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00293-0)
- Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M et al (2008) Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* (80) 321:960–964
- Cady KC, Bondy-Denomy J, Heussler GE et al (2012) The CRISPR/Cas adaptive immune system of *Pseudomonas aeruginosa* mediates resistance to naturally occurring and engineered phages. *J Bacteriol* 194:5728–5738. <https://doi.org/10.1128/JB.01184-12>
- Carver T, Harris SR, Berriman M et al (2012) Artemis: An integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics* 28:464–469. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703>
- Che D, Wang H, Fazekas J, Chen B (2014) An accurate genomic island prediction method for sequenced bacterial and archaeal genomes. *Proteom Bioinform* 7:214–221. <https://doi.org/10.4172/0974-276X>
- Chen W, Zhang Y, Zhang Y et al (2018) CRISPR/Cas9-based genome editing in *Pseudomonas aeruginosa* and cytidine deaminase-mediated base editing in *Pseudomonas* species. *iScience* 6:222–231. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.07.024>
- Chin C-S, Alexander DH, Marks P et al (2013) Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat Methods* 10:563–569. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2474>
- Clements J, McGrath C, McAllister C (2018) *Bordetella bronchiseptica* pneumonia: Beware of the dog! *BMJ Case Rep* 2018:1–3. <https://doi.org/10.1136/bcr-2018-224588>
- Cubbon A, Ivancic-Bace I, Bolt EL (2018) CRISPR-Cas immunity, DNA repair and genome stability interplay of DNA repair and CRISPR-Cas immunity: the fundamentals. *Biosci Rep* 38:20180457. <https://doi.org/10.1042/BSR20180457>
- Curran B, Jonas D, Grundmann H et al (2004) Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 42:5644–5649. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004>
- Darling AE, Mau B, Perna NT (2010) Progressivemaue: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011147>
- Darmon E, Leach DRF (2014) Bacterial genome instability. *Microbiol Mol Biol Rev* 78:1–39. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00035-13>
- de Silva VA, Senanayake SM, Dias P, Hanwella R (2012) De los pesticidas a los fármacos: análisis de series temporales de los métodos de autolesión en Sri Lanka. *Bull World Health Organ* 90:40–46. <https://doi.org/10.2471/BLT.11.091785>
- Deng Y, Bao X, Ji L et al (2015) Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 14:1–11. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0100-6>
- Deshmukh M, Turkarslan S, Astor D et al (2003) The dithiol:disulfide oxidoreductases DsbA and DsbB of *Rhodobacter capsulatus* are not directly involved in cytochrome c biogenesis, but their inactivation restores the cytochrome c biogenesis defect of CcdA-null mutants. *J Bacteriol* 185:3361–3372. <https://doi.org/10.1128/JB.185.11.3361-3372.2003>
- Dhillion BK, Laird MR, Shay JA et al (2015) IslandViewer 3: more flexible, interactive genomic island discovery, visualization and analysis. *Nucleic Acids Res* 43:W104–W108. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv401>
- Di Cesare A, Eckert EM, Corno G (2016) Co-selection of antibiotic and heavy metal resistance in freshwater bacteria. *J Limnol* 75:59–66. <https://doi.org/10.4081/jlimnol.2016.1198>
- Du L, Sánchez C, Chen M et al (2000) The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Chem Biol* 7:623–642. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00011-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00011-9)
- Dunning Hotopp JC (2011) Horizontal gene transfer between bacteria and animals. *Trends Genet* 27:157–163. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.01.005>
- Espinosa-Camacho LF, Delgado G, Miranda-Novales G et al (2017a) Complete genome sequences of two *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from children with bacteremia. *Genome Announc* 5:8–9. <https://doi.org/10.1128/genomea.00927-17>
- Espinosa-Camacho LF, Delgado G, Soberón-Chávez G et al (2017b) Complete genome sequences of four extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains, isolated from adults with ventilator-associated pneumonia at a Tertiary Referral Hospital in Mexico City. *Genome Announc* 5:1–3. <https://doi.org/10.1128/genomea.00925-17>
- Estahbanati HK, Kashani PP, Ghanaatpisheh F (2002) Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. *Burns* 28:340–348. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(02\)00024-4](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(02)00024-4)
- Faure K, Shimabukuro D, Ajayi T et al (2003) O-antigen serotypes and type III secretory toxins in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 41:2158–2160. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.5.2158-2160.2003>
- Favrot L, Blanchard JS, Vergnolle O (2016) Bacterial GCN5-related *N*-acetyltransferases: from resistance to regulation. *Biochemistry* 55:989–1002. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01269>
- Firouzi-Dalvand L, Pooladi M, Nowroozi J et al (2016) Presence of *exoU* and *exoS* genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. *Infect Epidemiol Med* 2:8–11. <https://doi.org/10.18869/modares.iem.2.2.8>
- Gellatly SL, Hancock REW (2013) *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* 67:159–173. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>
- Ghaly TM, Chow L, Asher AJ et al (2017) Evolution of class 1 integrons and dispersal via food-borne bacteria. *PLoS ONE* 12:1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179169>
- Gillings M, Boucher Y, Labbate M et al (2008) The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *J Bacteriol* 190:5095–5100. <https://doi.org/10.1128/JB.00152-08>
- Gross H, Loper JE (2009) Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat Prod Rep* 26(11):1408–1446. <https://doi.org/10.1039/b817075b>
- Guzik MW, Narancic T, Ilic-Tomic T et al (2014) Identification and characterization of an acyl-CoA dehydrogenase from *Pseudomonas putida* KT2440 that shows preference towards medium to long chain length fatty acids. *Microbiology (united Kingdom)* 160:1760–1771. <https://doi.org/10.1099/mic.0.078758-0>
- Hacker J, Carniel E (2001) Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep* 2(5):376–381. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve097>

- Harrison EM, Carter ME, Luck S, Ou HY, He X, Deng Z, O'Callaghan C, Kadioglu A, Rajakumar K (2010) Pathogenicity islands PAPI-1 and PAPI-2 contribute individually and synergistically to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. *Infect Immun* 78(4):1437–1446. <https://doi.org/10.1128/IAI.00621-09>
- He J, Baldini RL, Deziel E et al (2004) The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci* 101:2530–2535. <https://doi.org/10.1073/pnas.0304622101>
- Hopkins KL, Meunier D, Findlay J et al (2016) SPM-1 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 in the UK. *J Med Microbiol* 65(7):696–697. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000269>
- Jamet A, Nassif X (2015) New players in the toxin field: polymorphic toxin systems in bacteria. *Mbio* 6:1–8. <https://doi.org/10.1128/mbio.00285-15>
- Jeraldo P, Cunningham SA, Quest D et al (2015) Draft genome sequences of nine *Pseudomonas aeruginosa* strains, including eight clinical isolates. *Genome Announc* 3:3–4. <https://doi.org/10.1128/genomea.01154-15>
- Jia B, Raphenya AR, Alcock B et al (2017) CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 45:D566–D573. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1004>
- Jolley KA, Bray JE, Maiden M (2018) Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res* 3:124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
- Kedzierska B, Hayes F (2016) Emerging roles of toxin-antitoxin modules in bacterial pathogenesis. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules21060790>
- Kidd TJ, Ramsay KA, Hu H et al (2013) Shared *Pseudomonas aeruginosa* genotypes are common in Australian cystic fibrosis centres. *Eur Respir J* 41:1091–1100. <https://doi.org/10.1183/09031936.00060512>
- Kidd TJ, Ramsay KA, Vidmar S et al (2015) *Pseudomonas aeruginosa* genotypes acquired by children with cystic fibrosis by age 5-years. *J Cyst Fibros* 14:361–369. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.12.007>
- Klockgether J, Reva O, Larbig K, Tümmler B (2004) Sequence analysis of the mobile genome island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa* C. *J Bacteriol* 186:518–534. <https://doi.org/10.1128/JB.186.2.518-534.2004>
- Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L et al (2011) *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Front Microbiol* 2:1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00150>
- Konz D, Klens A, Schörgendorfer K, Marahiel MA (1997) The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetase. *Chem Biol* 4:927–937. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(97\)90301-X](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(97)90301-X)
- Kos VN, Déraspe M, McLaughlin RE et al (2015) The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 59:427–436. <https://doi.org/10.1128/AAC.03954-14>
- Koskiniemi S, Lamoureux JG, Nikolakakis KC et al (2013) Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition. *Proc Natl Acad Sci* 110:7032–7037. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300627110>
- Kour P, Pedit H, Borr P (2002) Susceptibilidad antimicrobiana y serotipaje de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes VIH / SIDA. *Rev Cubana Med Trop* 54:140–144
- Kulasekara BR, Kulasekara HD, Wolfgang MC et al (2006) Acquisition and evolution of the *exoU* locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188:4037–4050. <https://doi.org/10.1128/JB.02000-05>
- Kung VL, Ozer EA, Hauser AR (2010) The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:621–641. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00027-10>
- Kung VL, Khare S, Stehlik C et al (2012) An *rhs* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a virulence protein that activates the inflammasome. *Proc Natl Acad Sci* 109:1275–1280. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109285109>
- Lacotte Y, Ploy M, Raheerison S (2017) Class 1 integrons are low-cost structures in *Escherichia coli*. *Nat Publ Gr*. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.38>
- Langille MGI, Hsiao WWL, Brinkman FSL (2010) Detecting genomic islands using bioinformatics approaches. *Nat Publ Gr*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2350>
- Larbig KD, Larbig KD, Christmann A et al (2002) Gene islands integrated into tRNA society. *J Bacteriol* 184:6665–6680. <https://doi.org/10.1128/JB.184.23.6665>
- LaRoche-Johnston F, Monat C, Coulombe S, Cousineau B (2018) Bacterial group II introns generate genetic diversity by circularization and trans-splicing from a population of intron-invaded mRNAs. *PLoS Genet* 14:1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007792>
- Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S et al (2012) Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol* 50(4):1355–1361. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>
- Lee SF, Forsberg CW, Gibbins AM (1992) Type II DNA restriction-modification system and an endonuclease from the ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85. *J Bacteriol* 174:5275–5283. <https://doi.org/10.1128/jb.174.16.5275-5283.1992>
- Leong LEX, Lagana D, Carter GP et al (2018) Burkholderia Lata 24:2109–2111
- Li PL, Hwang I, Miyagi H et al (1999) Essential components of the Tl plasmid trb system, a type IV macromolecular transporter. *J Bacteriol* 181:5033–5041
- Liang X, Pham XQT, Olson MV, Lory S (2001) Identification of a genomic island present in the majority of pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183:843–853. <https://doi.org/10.1128/JB.183.3.843-853.2001>
- Lin MF, Lin YY, Tu CC, Lan CY (2017) Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and their correlation with antimicrobial resistance. *J Microbiol Immunol Infect* 50:224–231. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2015.04.004>
- Liu B, Zheng D, Jin Q et al (2019) VFDB 2019: A comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res* 47:D687–D692. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1080>
- Liu Y, Gao Z, Liu G et al (2020) Structural insights into the transcriptional regulation of HigBA toxin—antitoxin system by antitoxin HigA in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 10:3158. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03158>
- Long F, Su C, Zimmermann MT et al (2011) Mediated metal. *Transport* 467:484–488. <https://doi.org/10.1038/nature09395.Crystal>
- Lu Q, Eggimann P, Luyt C-E et al (2014) *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes. *Crit Care* 18:1–9. <https://doi.org/10.1186/cc13697>
- Ma J, Sun M, Dong W et al (2017) PAAR-Rhs proteins harbor various C-terminal toxins to diversify the antibacterial pathways of type VI secretion systems. *Environ Microbiol* 19:345–360. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13621>
- Martins WMBS, Narciso AC, Cayô R et al (2018) SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 clone recovered from microbiota of migratory birds. *Diagn Microbiol Infect Dis* 90:221–227. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.11.003>
- Mathee K, Narasimhan G, Valdes C et al (2008) Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(8):3100–3105. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711982105c>

- Moore NM, Flaws ML (2011) Epidemiology and Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. Clin Lab Sci 24:43–46
- Morales-Espinosa R, Soberón-Chávez G, Delgado-Sapién G et al (2012) Genetic and phenotypic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* population with high frequency of genomic islands. PLoS ONE. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037459>
- Morales-Espinosa R, Delgado G, Espinosa LF et al (2017) Fingerprint analysis and identification of strains ST309 as a potential high risk clone in a *Pseudomonas aeruginosa* population isolated from children with bacteremia in Mexico City. Front Microbiol 8:1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00313>
- Moura A, Soares M, Pereira C et al (2009) INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. Bioinformatics 25:1096–1098. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp105>
- Nascimento APB, Ortiz MF, Martins WMBS et al (2016) Intracolonial genome stability of the metallo- β -lactamase SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277, an endemic clone disseminated in Brazilian hospitals. Front Microbiol. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01946>
- Nowak-Thompson B, Chaney N, Wing JS et al (1999) Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. J Bacteriol 181:2166–2174
- Nye TM, Jacob KM, Id EKH et al (2019) DNA methylation from a type I restriction modification system influences gene expression and virulence in *Streptococcus pyogenes*. PLoS Pathog 15(6):e1007841. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007841>
- Ohnishi K, Kiritani K (1992) Nucleotide components transport sequences and characterization of *liv* genes encoding of the high-affinity amino acid system in *Salmonella typhimurium* active transport of branched-chain amino acids across the cytoplasmic membrane of *Salmonella typhimurium*. Transport 112:93–101
- Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C (2015) The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. Drug Resist Update 21–22:41–59. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2015.08.002>
- Ozer EA, Allen JP, Hauser AR (2014) Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools spine and AGENT. BMC Genomics 15:1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-737>
- Parcell BJ, Oravcova K, Pinheiro M et al (2018) *Pseudomonas aeruginosa* intensive care unit outbreak: winnowing of transmissions with molecular and genomic typing. J Hosp Infect 98:282–288. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.12.005>
- Pea C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S et al (2015) Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. Clin Infect Dis 60:539–548. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu866>
- Phillips ZN, Husna AU, Jennings MP et al (2019) Phasevarions of bacterial pathogens – phase-variable epigenetic regulators evolving from restriction—modification systems. Microbiol (Reading) 165(9):917–928. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000805>
- Pingoud A, Jeltsch A (2001) Structure and function of type II restriction endonucleases. Nucleic Acids 29:3705–3727
- Pirnay JP, Bilocq F, Pot B et al (2009) *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. PLoS ONE. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007740>
- Pullinger GD, Lax AJ (1992) A *Salmonella dublin* virulence plasmid locus that affects bacterial growth under nutrient-limited conditions. Mol Microbiol 6:1631–1643. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb00888.x>
- Rankin DJ, Rocha EPC, Brown SP (2011) What traits are carried on mobile genetic elements, and why. Heredity (edinb) 106:1–10. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.24>
- Rojas Pirela ML, Botello Suárez WA, Ball Vargas MM (2014) Antibiotic- and heavy-metal resistance in bacteria isolated from deep subsurface in El Callao region, Venezuela. Rev Colomb de Biotecnología 16(2), 141–149. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.41004>
- Römmling U, Schmidt KD, Tümmler B (1997) Large chromosomal inversions occur in clone C strains isolated from cystic fibrosis patients. FEMS Microbiol Lett 150:149–156. [https://doi.org/10.1016/s0378-1097\(97\)00112-2](https://doi.org/10.1016/s0378-1097(97)00112-2)
- Roy PH, Tetu SG, Larouche A et al (2010) Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. PLoS ONE 5:1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008842>
- Rumbaugh KP (2014) Genomic complexity and plasticity ensure *Pseudomonas* success. FEMS Microbiol Lett 356:141–143. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12517>
- Schubert RA, Dodd IB, Egan JB, Shearwin KE (2007) Cro's role in the CI-Cro bistable switch is critical for λ 's transition from lysogeny to lytic development. Genes Dev 21:2461–2472. <https://doi.org/10.1101/gad.1584907>
- Schulert GS, Feltman H, Rabin SDP 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. <https://doi.org/10.1086/379372>
- Siguier P (2006) ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. Nucleic Acids Res 34:D32–D36. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj014>
- Silby MW, Winstanley C, Godfrey SAC et al (2011) *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. FEMS Microbiol Rev 35:652–680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>
- Silveira MC, Albano RM, Asensi MD, Carvalho-Assef APDA (2016) Description of genomic islands associated to the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone ST277. Infect Genet Evol 42:60–65. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.024>
- Steele MI, Lorenz D, Hatter K et al (1992) Characterization of the *mmsAB* operon of *Pseudomonas aeruginosa* PAO encoding methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase and 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase. J Biol Chem 267:13585–13592
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL et al (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 406:959–964. <https://doi.org/10.1038/35023079>
- Subedi D, Vijay AK, Kohli GS et al (2018) Comparative genomics of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different geographic sites. Sci Rep 8:15668. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34020-7>
- Thrane SW, Taylor VL, Freschi L et al (2015) The widespread multidrug-resistant serotype O12 *Pseudomonas aeruginosa* clone emerged through concomitant horizontal transfer of serotype antigen and antibiotic resistance gene clusters. mBio 6(5):e01396–15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01396-15>
- Vasquez-Rifo A, Veksler-Lublinsky I, Cheng Z et al (2019) The *Pseudomonas aeruginosa* accessory genome elements influence virulence towards *Caenorhabditis elegans*. Genome biology 20(1):270. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1890-1>
- Vasu K, Nagaraja V (2013) Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense. Microbiol Mol Biol Rev 77:53–72. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00044-12>
- Vogt MS, Schühle K, Kölzer S et al (2019) Structural and functional characterization of an electron transfer flavoprotein involved in toluene degradation in strictly anaerobic bacteria. J Bacteriol 201:1–17
- Waldor MK, Davis BM (2014) Mobile genetic elements and bacterial pathogenesis. Mob DNA II:1040–1059. <https://doi.org/10.1128/9781555817954.ch45>
- Wang Y, Wang X, Schwarz S et al (2014) IMP-45-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* of canine origin. J

- Antimicrob Chemother 69:2579–2581. <https://doi.org/10.1093/jac/dku133>
- Werren JH (2011) Selfish genetic elements, genetic conflict, and evolutionary innovation. *Proc Natl Acad Sci* 108:10863–10870. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102343108>
- Winstanley C, Langille MGI, Fothergill JL et al (2009) Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the liverpool epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res* 19:12–23. <https://doi.org/10.1101/gr.086082.108>
- Witney AA, Gould KA, Pope CF et al (2014) Genome sequencing and characterization of an extensively drug-resistant sequence type 111 serotype O12 hospital outbreak strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 20:O609–O618. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12528>
- Wittman V, Lin HC, Wong HC (1993) Functional domains of the penicillinase repressor of *Bacillus licheniformis*. *J Bacteriol* 175:7383–7390. <https://doi.org/10.1128/jb.175.22.7383-7390.1993>
- Wu Y, Aandahl RZ, Tanaka MM (2015) Dynamics of bacterial insertion sequences: can transposition bursts help the elements persist? Theories and models. *BMC Evol Biol* 15:1–12. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0560-5>
- Yamazoe M, Onogi T, Sunako Y et al (1999) Complex formation of MukB, MukE and MukF proteins involved in chromosome partitioning in *Escherichia coli*. *EMBO J* 18:5873–5884. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.21.5873>
- Zakharova IB, Viktorov DV (2015) Integrative conjugative elements (ICEs) of microorganisms. *Mol Genet Microbiol Virol* 30:114–123. <https://doi.org/10.3103/s0891416815030076>
- Zatyka M (2002) Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements. *FEMS Microbiol Rev* 21:291–319. [https://doi.org/10.1016/s0168-6445\(97\)00061-2](https://doi.org/10.1016/s0168-6445(97)00061-2)
- Zhou Y, Liang Y, Lynch KH et al (2011) PHAST: a fast phage search tool. *Nucleic Acids Res* 39:347–352. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr485>

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



Complete Genome Sequences of Four Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains, Isolated from Adults with Ventilator-Associated Pneumonia at a Tertiary Referral Hospital in Mexico City

Luis F. Espinosa-Camacho,^a Gabriela Delgado,^a Gloria Soberón-Chávez,^b Luis D. Alcaraz,^c Jorge Castañón,^d Rosario Morales-Espinosa^{a*}

Microbiology and Parasitology Department, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico^a; Molecular Biology and Biotechnology Department, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico^b; Laboratorio Nacional de Ciencias de la Sostenibilidad, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico^c; Intensive Care Unit and Critical Care Unit, Hospital Juárez de México, Mexico City, Mexico^d

ABSTRACT Four extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains, isolated from patients with pneumonia, were sequenced using PacBio RS-II single-molecule real-time (SMRT) technology. Genome sequence analysis identified great variability among mobile genetic elements, as well as some previously undescribed genomic islands and new variants of class 1 integrons (In1402, In1403, In1404, and In1408).

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacterium and is considered to be an opportunistic human pathogen associated with infections in immunocompromised patients. The presence of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) strains is associated with high mortality in patients with chronic infections (1, 2). Here, we present the complete genome sequences of four *P. aeruginosa* strains (Pa58, Pa84, Pa124, and Pa127), all isolated from adult patients with pneumonia associated with the use of automatic ventilators in an intensive care unit at a tertiary referral hospital in Mexico City.

Strains Pa58, Pa124, and Pa127 were resistant to different β -lactams, including carbapenems, as well as aminoglycosides and fluoroquinolones. Strain Pa84 was resistant to only imipenem, ciprofloxacin, and levofloxacin. All of the strains were susceptible to polymyxin B. Two strains belong to sequence type 309 (ST-309), a high-risk clone previously documented in Mexico (3).

The genomic DNA of the strains was purified with the DNeasy blood and tissue kit (Qiagen) and sent to the Yale Center for Genome Analysis for PacBio RS-II single-molecule real-time (SMRT) sequencing. A standard library of 20-kb fragments was prepared and sequenced on four SMRT cells with the P4-C2 chemistry. The continuous long reads were assembled using the HGAP/Quiver protocol in SMART portal version 3 (4). The genome features are described in Table 1.

The sequences were annotated using the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The annotation was manually curated, and the genomes were analyzed for the presence of mobile elements (Table 1), antibiotic resistances genes, efflux pumps, and potential virulence factors using the IslandPath-DIMOB, SIGI-HMM, IslandPick (5), CARD (6), VirulenceFinder (7), and Integral (8) databases.

All of the strains have a core genome size averaging 6.15 Mb, with a variable accessory genome. The strains presented different islands inserted at previously described loci (9). However, these islands present a different gene composition and size

Received 26 July 2017 Accepted 31 July 2017 Published 7 September 2017

Citation Espinosa-Camacho LF, Delgado G, Soberón-Chávez G, Alcaraz LD, Castañón J, Morales-Espinosa R. 2017. Complete genome sequences of four extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains, isolated from adults with ventilator-associated pneumonia at a tertiary referral hospital in Mexico City. *Genome Announc* 5:e00925-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00925-17>.

Copyright © 2017 Espinosa-Camacho et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Rosario Morales-Espinosa, marosari@unam.mx.

* Present address: Rosario Morales-Espinosa, Bacterial Genomic Laboratory, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

TABLE 1 Genome features and accession numbers of four *P. aeruginosa* strains

General composition of genome	Data for strain:			
	Pa58	Pa84	Pa124	Pa127
Sequence type	308	No data	309	309
No. of contigs	2	1	4	13
Coverage (×)	~83	~89	~91	~91
Genome size (bp)	7,241,575	6,566,724	7,008,516	7,148,302
G+C content (%)	65.80	66.23	65.84	65.74
No. of coding sequences (total)	6,927	6,202	6,617	6,777
No. of tRNAs	63	63	63	63
No. of rRNA operons	4 (5S, 16S, 23S)	4 (5S, 16S, 23S)	4 (5S, 16S, 23S)	4 (5S, 16S, 23S)
No. of noncoding RNAs	4	5	4	4
No. of pseudogenes (total)	244	139	131	205
No. of genomic islands	5	3	3	3
No. of prophages	12	8	10	9
No. of integrative plasmids	3	0	2	2
No. of CRISPR-Cas arrays	1	2	0	0
Class 1 integron(s)	In51, In173, In1212, In1403, and In1404		In1402	In1408
Nucleotide accession no.	CP021775	CP021999	CP021774	CP022000
Biosample accession no.	SAMN05020321	SAMN05020322	SAMN05020323	SAMN05020324

than those of the previously reported PAGI-1, PAPI-2, PAGI-4, and pKLC102 strains (10–12). Strains Pa58, Pa124, and Pa127 presented a new island of 70 open reading frames, which is integrated in the tRNA-arg (PA0256) 3' end. This new island has genes involved in a type I restriction modification system.

Many bacteriophages were detected in all of the strains, most of them having genes involved in phage biogenesis and heavy-metal resistance. Strains Pa58 and Pa84 presented a CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated genes) array in their chromosomes.

All of the strains showed genes of four efflux pump systems, MexAB, MexCD, MexEF, and MexXY. Strain Pa58 also has genes of the AcrAB efflux pump from *Enterobacter cloacae*. All of the strains carried the OprD, OprJ, and OprM porins, the β -lactams OXA-2 and OXA-50, and the genes *fosA* and *aph(3')*. GyrA presented a mutation at amino acid position 83 (T \rightarrow I), conferring resistance to fluoroquinolones.

Strains Pa58, Pa124, and Pa127 presented new variants of class 1 integrons, namely, In1402 (<http://integrall.bio.ua.pt/?acc=CP021774>), In1403 and In1404 (<http://integrall.bio.ua.pt/?acc=CP021775>), and In1408 (<http://integrall.bio.ua.pt/?acc=CP022000>), which present the resistance genes *aadA1*, *aadA6*, OXA-2, and *sul1*. All of the strains presented type IV secretion system genes, as well as type III secretion system (*exoU*, *exoS*, *exoT*, and *exoY*) genes.

Accession number(s). These whole-genome projects have been deposited in GenBank under the accession numbers listed in Table 1. The BioProject accession number is PRJNA389181.

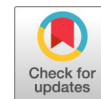
ACKNOWLEDGMENTS

We thank José Luis Méndez for performing the antibiotic susceptibility essays, and Guilin Wang from the Yale Center for Genome Analysis, Yale University, for skillful PacBio sequencing.

This report is part of the doctoral research carried out by Luis Fernando Espinosa Camacho at the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and supported by fellowship 619928 from CONACYT. This work was also supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA/PAPIIT, UNAM) (IN213816 to Rosario Morales-Espinosa). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or decision to submit the work for publication.

REFERENCES

1. Morales-Espinosa R, Soberón-Chávez G, Delgado-Sapién G, Sandner-Miranda L, Méndez JL, González-Valencia G, Cravioto A. 2012. Genetic and phenotypic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* population with high frequency of genomic islands. PLoS One 7:e37459. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037459>.
2. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 18:268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
3. Morales-Espinosa R, Delgado G, Espinosa LF, Isselo D, Méndez JL, Rodríguez C, Miranda G, Cravioto A. 2017. Fingerprint analysis and identification of strains ST309 as a potential high risk clone in a *Pseudomonas aeruginosa* population isolated from children with bacteremia in Mexico City. Front Microbiol 8:313. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00313>.
4. Chin CS, Alexander DH, Marks P, Klammer AA, Drake J, Heiner C, Clum A, Copeland A, Huddleston J, Eichler EE, Turner SW, Korlach J. 2013. Non-hybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. Nat Methods 10:563–569. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2474>.
5. Dhillon BK, Laird MR, Shay JA, Winsor GL, Lo R, Nizam F, Pereira SK, Wagelchner N, McArthur AG, Langille MG, Brinkman FS. 2015. IslandViewer 3: more flexible, interactive genomic island discovery, visualization and analysis. Nucleic Acids Res 43:W104–W108. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv401>.
6. McArthur AG, Wagelchner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, Bhullar K, Canova MJ, De Pascale G, Ejim L, Kalan L, King AM, Koteva K, Morar M, Mulvey MR, O'Brien JS, Pawlowski AC, Piddock LJ, Spanogiannopoulos P, Sutherland AD, Tang I, Taylor PL, Thaker M, Wang W, Yan M, Yu T, Wright GD. 2013. The comprehensive antibiotic resistance database. Antimicrob Agents Chemother 57:3348–3357. <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-13>.
7. Kleinheinz KA, Joensen KG, Larsen MV. 2014. Applying the ResFinder and VirulenceFinder web-services for easy identification of acquired antibiotic resistance and *E. coli* virulence genes in bacteriophage and prophage nucleotide sequences. Bacteriophage 4:e27943. <https://doi.org/10.4161/bact.27943>.
8. Moura A, Soares M, Pereira C, Leitão N, Henriques I, Correia A. 2009. INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. Bioinformatics 25:1096–1098. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp105>.
9. Römling U, Schmidt KD, Tümmler B. 1997. Large genome rearrangements discovered by the detailed analysis of 21 *Pseudomonas aeruginosa* clone C isolates found in environment and disease habitats. J Mol Biol 271:386–404. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1186>.
10. Liang X, Pham XQ, Olson MV, Lory S. 2001. Identification of a genomic island present in the majority of pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 183:843–853. <https://doi.org/10.1128/JB.183.3.843-853.2001>.
11. Larbig KD, Christmann A, Johann A, Klockgether J, Hartsch T, Merkl R, Wiehlmann L, Fritz HJ, Tümmler B. 2002. Gene islands integrated into tRNA^{Gly} genes confer genome diversity on a *Pseudomonas aeruginosa* clone. J Bacteriol 184:6665–6680. <https://doi.org/10.1128/JB.184.23.6665-6680.2002>.
12. Klockgether J, Reva O, Larbig K, Tümmler B. 2004. Sequence analysis of the mobile genome island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa* C. J Bacteriol 186:518–534. <https://doi.org/10.1128/JB.186.2.518-534.2004>.



Complete Genome Sequences of Two *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Children with Bacteremia

Luis F. Espinosa-Camacho,^a Gabriela Delgado,^a Guadalupe Miranda-Navales,^b Gloria Soberón-Chávez,^c Luis D. Alcaraz,^d Rosario Morales-Espinosa^{a*}

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico^a; Unidad de Investigación en Epidemiología Hospitalaria, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Mexico City, Mexico^b; Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico^c; Laboratorio Nacional de Ciencias de la Sostenibilidad, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico^d

ABSTRACT Two *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from children with bacteremia in Mexico City were sequenced using PacBio RS-II single-molecule real-time (SMRT) technology. The strains consist of a 7.0- to 7.4-Mb chromosome, with a high content of mobile elements, and variation in the genetic content of class 1 integron In1409.

Pseudomonas aeruginosa is associated with chronic recurrent pulmonary infections that are responsible for high mortality in children with underlying conditions such as hematology-oncology diseases, extended hospitalization in the intensive care unit (ICU), and prematurity (1).

Two *P. aeruginosa* strains (Pa1207 and Pa1242) were sequenced. The strains were isolated from children with bacteremia admitted to a pediatric hospital in Mexico City. Strain Pa1207 was resistant to different β -lactams (including carbapenems and cephalosporins), amikacin, and tobramycin but was susceptible to gentamicin, polymyxin B, and fluoroquinolones. Strain Pa1242 presented only intermediate resistance to polymyxin B and was susceptible to 19 antimicrobials tested.

The genomic DNA of the strains was purified with the DNeasy blood and tissue kit (Qiagen) and sent to the Yale Center for Genome Analysis for PacBio RS II single-molecule real-time (SMRT) sequencing. A standard library of 20-kb fragments was prepared and sequenced on two SMRT cells with P4-C2 chemistry. The continuous long reads were assembled using the HGAP/Quiver protocol in SMART Portal v3 (2). The final assemblies had mean coverages of $\sim 146\times$ and $\sim 181\times$ for Pa1207 and Pa1242, respectively, and consisted of chromosomes of 7,411,863 bp and 7,050,510 bp, with mean G+C contents of 65.7% and 65.8%, respectively. A total of 7,153 genes were annotated for Pa1207: 7,072 CDSs, 65 tRNAs, 12 rRNAs, 4 noncoding RNAs (ncRNAs), and 247 pseudogenes. For strain Pa1242, 6,735 genes were annotated: 6,654 CDSs, 65 tRNAs, 12 rRNAs, 4 ncRNAs, and 346 pseudogenes.

The sequences were annotated using the NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The annotation was manually curated and enriched by the presence of mobile elements, antibiotic resistances genes, efflux pumps, and potential virulence factors using the IslandPath-DIMOB, SIGI-HMM, Island-Pick (3), CARD (4), VirulenceFinder (5), and Integrall (6) databases. Strain Pa1207 presented 4 genomic islands, 10 prophages, and 3 integrative plasmids. Strain Pa1242 presented 4 different genomic islands and 8 prophages.

In both strains, there are three large genomic islands inserted at previously identified loci (7–10) but with different genetic compositions. One island conserved the first

Received 26 July 2017 Accepted 31 July 2017 Published 31 August 2017

Citation Espinosa-Camacho LF, Delgado G, Miranda-Navales G, Soberón-Chávez G, Alcaraz LD, Morales-Espinosa R. 2017. Complete genome sequences of two *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from children with bacteremia. *Genome Announc* 5:e00927-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00927-17>.

Copyright © 2017 Espinosa-Camacho et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Rosario Morales-Espinosa, marosari@unam.mx.

* Present address: Rosario Morales-Espinosa, Bacterial Genomic Laboratory, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, Mexico City, México.

31 open reading frames (ORFs) described in *P. aeruginosa* genome island 1 (PAGI-1), and the other had only the 4 ORFs described in pathogenicity island 2 (PAPI-2). Strain Pa1207 presents a mobile element shared with *Pseudomonas fluorescens*, which encodes to dehydrogenases, type VI secretion system components, and hypothetical proteins. Other islands in both strains are hybrids formed for genes from PAPI-1/pKLC-102, where a group of genes of the major pilins are conserved.

The two strains presented efflux systems MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprM, and MexXY, the porin OprD, and the β -lactam OXA-50. Strain Pa1207 presents an integron class 1 (In1409) not previously described (<http://integrall.bio.ua.pt/?acc=CP022001>). The integron carried genes AAC(6′)-33, *aadA6*, *blaOXA-2*, and *sul1*. The two strains presented type III secretion system (*exoU*, *exoS* and *exoT*, *exoY*) genes.

Accession number(s). These whole-genome projects have been deposited in GenBank under the nucleotide accession no. CP022001 (Pa1207) and CP022002 (Pa1242), BioSample no. SAMN05020325 (Pa1207) and SAMN05020326 (Pa1242), and BioProject no. PRJNA389181.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank José Luis Méndez for performing the antibiotic susceptibility essays and Guilin Wang from the Yale Center for Genome Analysis, Yale University, for skillful PacBio sequencing.

This paper is part of the doctoral research carried out by L.F.E.-C., a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), who received fellowship 619928 from CONACYT. This work was also supported by DGAPA/PAPIIT-UNAM (IN213816 to R.M.-E.).

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

REFERENCES

- Morales-Espinosa R, Delgado G, Espinosa LF, Isselo D, Méndez JL, Rodríguez C, Miranda G, Cravioto A. 2017. Fingerprint analysis and identification of strains ST309 as a potential high risk clone in a *Pseudomonas aeruginosa* population isolated from children with bacteremia in Mexico City. *Front Microbiol* 8:313. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00313>.
- Chin CS, Alexander DH, Marks P, Klammer AA, Drake J, Heiner C, Clum A, Copeland A, Huddleston J, Eichler EE, Turner SW, Korlach J. 2013. Non-hybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat Methods* 10:563–569. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2474>.
- Dhillon BK, Laird MR, Shay JA, Winsor GL, Lo R, Nizam F, Pereira SK, Wagelchner N, McArthur AG, Langille MG, Brinkman FS. 2015. IslandViewer 3: More flexible, interactive genomic island discovery, visualization and analysis. *Nucleic Acids Res* 43:W104–W108. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv401>.
- McArthur AG, Wagelchner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, Bhullar K, Canova MJ, De Pascale G, Ejim L, Kalan L, King AM, Koteva K, Morar M, Mulvey MR, O'Brien JS, Pawlowski AC, Piddock LJ, Spanogiannopoulos P, Sutherland AD, Tang I, Taylor PL, Thaker M, Wang W, Yan M, Yu T, Wright GD. 2013. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob Agents Chemother* 57:3348–3357. <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-13>.
- Kleinheinz KA, Joensen KG, Larsen MV. 2014. Applying the ResFinder and VirulenceFinder Web-services for easy identification of acquired antibiotic resistance and *E. coli* virulence genes in bacteriophage and prophage nucleotide sequences. *Bacteriophage* 4:e27943. <https://doi.org/10.4161/bact.27943>.
- Moura A, Soares M, Pereira C, Leitão N, Henriques I, Correia A. 2009. INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics* 25:1096–1098. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp105>.
- Römling U, Schmidt KD, Tümmler B. 1997. Large genome rearrangements discovered by the detailed analysis of 21 *Pseudomonas aeruginosa* clone C isolates found in environment and disease habitats. *J Mol Biol* 271:386–404. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1186>.
- Liang X, Pham XQ, Olson MV, Lory S. 2001. Identification of a genomic island present in the majority of pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183:843–853. <https://doi.org/10.1128/JB.183.3.843-853.2001>.
- Larbig KD, Christmann A, Johann A, Klockgether J, Hartsch T, Merkl R, Wiehlmann L, Fritz HJ, Tümmler B. 2002. Gene islands integrated into tRNA^{gly} genes confer genome diversity on a *Pseudomonas aeruginosa* clone. *J Bacteriol* 184:6665–6680. <https://doi.org/10.1128/JB.184.23.6665-6680.2002>.
- Klockgether J, Reva O, Larbig K, Tümmler B. 2004. Sequence analysis of the mobile genome island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa* C. *J Bacteriol* 186:518–534. <https://doi.org/10.1128/JB.186.2.518-534.2004>.



Fingerprint Analysis and Identification of Strains ST309 as a Potential High Risk Clone in a *Pseudomonas aeruginosa* Population Isolated from Children with Bacteremia in Mexico City

Rosario Morales-Espinosa^{1*}, Gabriela Delgado¹, Luis F. Espinosa¹, Dassaev Isselo², José L. Méndez¹, Cristina Rodriguez³, Guadalupe Miranda⁴ and Alejandro Cravioto⁵

¹ Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ² Servicio de Pediatría, Hospital Regional 36 San Alejandro, IMSS, Puebla, Mexico, ³ Laboratorio de Bacteriología, Facultad de Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, ⁴ Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Unidad de Investigación en Epidemiología Hospitalaria, Mexico City, Mexico, ⁵ Global Evaluative Sciences USA, Inc., Seattle, WA, USA

OPEN ACCESS

Edited by:

Jorge Blanco,
Universidade de Santiago de
Compostela, Spain

Reviewed by:

Antonio Oliver,
Hospital Universitario Son Dureta,
Spain
Yuji Morita,
Aichi Gakuin University, Japan
Javier Fernández,
Central University Hospital of Asturias,
Spain

*Correspondence:

Rosario Morales-Espinosa
marosari@servidor.unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Infectious Diseases,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 15 December 2016

Accepted: 15 February 2017

Published: 01 March 2017

Citation:

Morales-Espinosa R, Delgado G,
Espinosa LF, Isselo D, Méndez JL,
Rodríguez C, Miranda G and
Cravioto A (2017) Fingerprint Analysis
and Identification of Strains ST309 as
a Potential High Risk Clone in a
Pseudomonas aeruginosa Population
Isolated from Children with Bacteremia
in Mexico City. *Front. Microbiol.* 8:313.
doi: 10.3389/fmicb.2017.00313

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen and is associated with nosocomial infections. Its ability to thrive in a broad range of environments is due to a large and diverse genome of which its accessory genome is part. The objective of this study was to characterize *P. aeruginosa* strains isolated from children who developed bacteremia, using pulse-field gel electrophoresis, and in terms of its genomic islands, virulence genes, multilocus sequence type, and antimicrobial susceptibility. Our results showed that *P. aeruginosa* strains presented the seven virulence genes: *toxA*, *lasB*, *lecA*, *algR*, *plcH*, *phzA1*, and *toxR*, a type IV pilin alleles (TFP) group I or II. Additionally, we detected a novel pilin and accessory gene, expanding the number of TFP alleles to group VI. All strains presented the PAPI-2 Island and the majority were *exoU*+ and *exoS*+ genotype. Ten percent of the strains were multi-drug resistant phenotype, 18% extensively drug-resistant, 68% moderately resistant and only 3% were susceptible to all the antimicrobial tested. The most prevalent acquired β -Lactamase was KPC. We identified a group of ST309 strains, as a potential high risk clone. Our finding also showed that the strains isolated from patients with bacteremia have important virulence factors involved in colonization and dissemination as: a TFP group I or II; the presence of the *exoU* gene within the PAPI-2 island and the presence of the *exoS* gene.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *exoS* and *exoU* genes, genomics island, TFP alleles, ST309, bacteremia, children

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacterium, which is categorized as an opportunistic pathogen due to its ability to cause infections mainly in immunocompromised patients. It is a ubiquitous microorganism, metabolically versatile, which is able to adapt to many environments (Gilligan, 1995; Lyczak et al., 2000). An important virulent characteristic is the formation of

biofilms and its natural multiresistance to a wide range of antibiotics and disinfectants (Drenkard and Ausubel, 2002; Wolska and Szweda, 2009; Poole, 2011; Rybtke et al., 2015). This microorganism has been associated with nosocomial infections and outbreaks in Intensive Care Units (ICU) for adults, children and neonates (Thuong et al., 2003; Agodi et al., 2007; Zhang et al., 2012). It is a microorganism with the capacity to colonize different surfaces and in hospitals this is common in the colonization of humid sources, such as air conditioning units, sink faucets, and medical equipment (automatic ventilators and humidifiers; Agodi et al., 2007; Kerr and Snelling, 2009).

Approximately, a 30% of the general population carries *P. aeruginosa* on their skin and in their mucosa and intestine (Thuong et al., 2003; Agodi et al., 2007). This bacterium is associated with chronic recurrent infections in patients with cystic fibrosis and it represents a high mortality in children with underlying conditions such as hemato-oncology diseases, cardiovascular surgeries, extended hospitalization in the ICU, gastrointestinal malformations, and prematurity (Fergie et al., 1994; Zhang et al., 2012). Some reports have shown that the incidence of bacteremia due to *P. aeruginosa* falls between 0.09 and 3.8 cases per 1,000 patients with a greater frequency in boys (Grisaru-Soen et al., 2000) with underlying conditions, such as hemato-oncological diseases. Nonetheless, *P. aeruginosa* also causes infections, such as ear infections or skin infections in healthy people exposed to poorly chlorinated water in swimming pools or tubs for hydromassage (Mena and Gerba, 2009; Rybtke et al., 2015).

The genome of *P. aeruginosa* is highly variable due to the insertion of different mobile elements, such as genomic and pathogenic islands that contribute to chromosomal organization and genetic content thereby providing versatility to the bacteria that allows for better adaptation to different niches (Shen et al., 2006; Wiehlmann et al., 2007). Horizontal gene transfer (HGT) is a major force in bacterial evolution conferring a great variability between the species (Jolley and Maiden, 2010; Darmon and Leach, 2014).

The majority of the studies related to *P. aeruginosa* and pediatric cohorts have been performed in patients with cystic fibrosis (Cf; Kus et al., 2004; Kidd et al., 2015), which have genetic and phenotypic characteristic well-studied. The distribution of pilin alleles amongst CF human isolates belong to pilin group I. Biofilm production is thought to be a hallmark of chronic colonization of the CF lung; *P. aeruginosa* “hypermutators” can be isolated from 37 to 54% of the patients with chronic CF infections. MutS, a critical component of the mismatch repair system, is commonly lost in hypermutator strains, resulting in elevated mutation rates. *P. aeruginosa* hypermutator strains isolated from chronically infected patients are often more resistant to antibiotics, possess a mucoid phenotype with small-colony variants on culture medium, and lose both the lipopolysaccharide (LPS) O-antigen and motility (Deretic et al., 1994; Mahenthiralingam et al., 1994; Govan and Deretic, 1996; Häußler et al., 1999, 2003; Oliver et al., 2000; Leone et al., 2008; Chung et al., 2012; Kidd et al., 2012; Rybtke et al., 2015). Published data show the importance of *P. aeruginosa* as a cause of bacteremia in patients who develop neutropenia

following chemotherapy and the bacterium has been associated with nosocomial infections (Pronovost et al., 2006). However, there is little published data on the genetic characteristics and the susceptibility patterns of *P. aeruginosa* strains isolated from blood samples from children who developed bacteremia and/or neutropenia following chemotherapy (Oliver et al., 2015; Peña et al., 2015). In the present study, we characterized a collection of *P. aeruginosa* strains isolated from the blood of 60 children with a background of underlying conditions that developed bacteremia and neutropenia post-chemotherapy in a highly specialized hospital in Mexico City.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Stains

A collection of 60 clinical *P. aeruginosa* strains was used in this study. The clinical isolates were isolated from blood sample taken between October 2011 and May 2014. All patients were treated in the Pediatric Hospital at Centro Medico Nacional, Siglo XXI in Mexico City. The project was approved by the Ethics Committee (No. R-2014-3603-44) of the Pediatric Hospital at the Centro Medico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social. In all cases, the parents or guardians were informed about the nature of the study and were asked to sign a consent form.

The following reference strains were used as positive controls: *P. aeruginosa* PA14 strain, which is an isolate from burn (Berkeley, California, USA) (Lee et al., 2006); two strains from *P. aeruginosa* clone C: C strain, is a typical CF isolate (Hannover Medical School, Germany) and SG17M strain, an environmental isolate from a river water in the city of Mulheim, Germany (Römling et al., 1994, 1997; Lee et al., 2014); *P. aeruginosa* PAO1 strain, which is an isolate from wound (Melbourne, Australia) (Holloway, 1955; Lee et al., 2006). All the strains were maintained in 15% glycerol at -70°C . Each strain was biochemically typed using conventional biochemical tests (Murray et al., 1995; Mac Faddin, 2000) and the API20 NE system (Identification system for non-enteric Gram-negative rods. bioMérieux, Inc.).

Virulence Genes and Type III Secretion System Genotype (TTSS) Detection

Chromosomal DNA was isolated from overnight cultures in Luria broth (Invitrogen, Carlsbad, Ca. USA), of each of the 60 clinical *P. aeruginosa* isolates, as well as from the *P. aeruginosa* control strains (PA14, PAO1, C, and SG17M). DNA was purified from bacteria by miniprep (DNeasy Blood & Tissue Kit QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer’s instructions. All DNAs were adjusted to 100 ng/ μl at 260/280 nm, using a Tecan Genios equipment. Seven virulence genes (*toxA*, *lasB*, *lecA*, *algR*, *plcH*, *phzA1*, and *toxR*) from *P. aeruginosa* were selected and amplified by PCR using Taq DNA polymerase recombinant (Invitrogen, Carlsbad, Ca. USA) and specific primers (Morales-Espinosa et al., 2012). The type III secretion system genes (*exoS*, *exoT*, and *exoU*) were investigated by PCR. The primers: forward 5' ACTCGTGCCTCCCTTCGTG 3' and reverse 5' GATACTCTGCTGACCTCGCTCTC 3' were used for *exoS* and *exoT* amplification. The conditions for thermal cycling were: an initial denaturation cycle at 94°C for 2 min, followed by 30

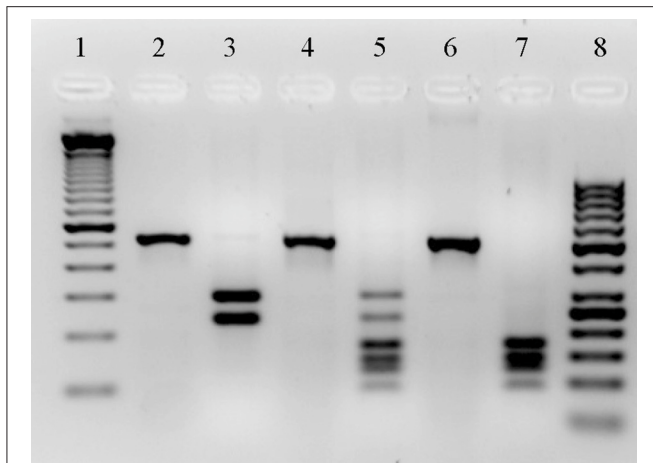


FIGURE 1 | Restriction Patterns created with *HinfI* enzyme from PCR products of *exoT* and *exoS* genes. DNA ladder of 100 bp (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Inc.) and 50 bp (Thermo Fisher Scientific, Inc.) (lines 1 and 8, respectively). PCR products from *P. aeruginosa* PA14 strain, PAO1 strain and a 1208 clinical strain, the primers: forward 5' ACTCGTGCGTCCCTCGTG 3' and reverse 5' GATACTCTGCTGACCTCGCTCTC 3' were used (lines 2, 4, and 6, respectively). Restriction pattern from PA14 strain product, which gave a restriction pattern of two bands for the *exoT* gene: one of 292 bp and the other of 233 bp (line 3). Restriction pattern from PAO1 strain product, which present both *exoT* and *exoS* genes, the bands size correspond to 86, 122, 140, 168, 29, and 233 bp (line 5). Restriction pattern from PCR product of one of our strains, this strain only present the *exoS* gene, which produced a pattern of four bands: 86, 122, 140, and 168 bp (line 7).

cycles at 94°C for 1 min, the annealing temperature was 55°C for 1 min and 72°C for 1 min with a final cycle of 72°C for 2 min. Subsequently, a restriction pattern from the PCR product was created with the *HinfI* (Promega Life Science, Madison, Wisconsin, USA) enzyme. The PA14 strain was used as a positive control for *exoT*, which gave a two bands restriction pattern: one of 292 bp and the other of 233 bp. The PAO1 strain was used as positive control for both *exoS* and *exoT* genes, which produced six bands: 86, 122, 140, 168, 233 and 292 bp (Figure 1). The *exoU* gene was detected by PCR using the primers previously documented by Morales-Espinosa (Morales-Espinosa et al., 2012). Detection of the type IV pili (TFP) alleles was carried out according to Kus' characterization (Kus et al., 2004), in which *P. aeruginosa* TFP are divided into five phylogenetic groups. The complete characterization of TFP alleles was made by sequencing (Sanger method, Macrogene Metagenome Next Generation Sequencing [NGS] Service, Korea) of the PCR products from two strains (1,207 and 1,242), which give a greater PCR product (Genbank accession number KX096875 and KX096876).

Frequency and Content of Genomic Islands

PCR protocols to amplify each gene belonging to PAGI-1 (ORF3, ORF18, and ORF42), PAGI-2 (C22 and C105), PAGI-3 (SG8 and SG100), PAGI-4 (CL22), pKLC102 (CP10, CP44, and CP97), PAPI-1 (the island was detected in its circular form or integrated into the chromosome), and PAPI-2 (*xerC*, RS07-RS08, *exoU*)

were carried out according to authors' instructions (Pronovost et al., 2006; Qiu et al., 2006; Klockgether et al., 2007; Morales-Espinosa et al., 2012).

PFGE (Pulse-Field Gel Electrophoresis) Analysis

Genomic DNA in agarose blocks was prepared using the method previously described by Liu (Liu et al., 1993) with some modifications such as: allowing a bacterial growth of no more than 12 h, subjecting the bacterial package to lysis twice, deproteinizing the DNA-plugs twice and increasing the number of washes (8) of the DNA-plugs with TBE buffer. The *SpeI* (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) enzyme was used to obtain the chromosomal profiles. *SpeI* fragments were separated by a CHEF-DR II device (Bio-Rad, USA) and electrophoresis was performed on 1.2 % agarose gels and 0.5X TBE (45 mM Tris, 45 mM Boric acid, 1 mM EDTA) buffer at 10°C with pulse time ramped from 5 to 25 s over 19 h and 5.3 V/cm and a second block with pulse time ramped from 5 to 60 s over 17 h and 5.3 V/cm. The sizes of *SpeI* fragments were estimated using *XbaI* (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) fragments of *Salmonella* Braenderup global standard H9812. The images were digitized by the Gel Logic 112 imaging system (Kodak, NY, USA). The fingerprinting profile in the PFGE gel was analyzed using BioNumerics v.7.1 (Applied Maths, Belgium) software package. After background subtraction and gel normalization, typing of fingerprint profiles was carried out based on banding similarity and dissimilarity, using the Dice similarity coefficient (Dice, 1945) and the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA; Day and Edelsbrunner, 1984) according to average linkage clustering methods.

MLST (Multilocus Sequence Typing) Genotype

MLST was created according to the MLST scheme for *P. aeruginosa* (<http://pubmlst.org/paeruginosa>) with some modification to the annealing temperatures (according to each specific primer set): *acsA* (64°C), *aroE* (62.3°C), *guaA* (64.1°C), *mutL* (65°C), *nuoD* (56.5°C), *ppsA* (64°C), and *trpE* (63.3°C).

Antimicrobial Susceptibility

To assess the isolates antimicrobial susceptibility, the agar dilution method was used according to the criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute, using the recommended media (CLSI, 2016). ATCC 27853 *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 25922 *Escherichia coli*, ATCC 35218 *E. coli*, ATCC 29213 *Staphylococcus aureus*, and ATCC 29212 *Enterococcus faecalis* were used as quality control. Susceptibility was tested for the following antimicrobial: carbenicillin (Invitrogen Inc., CA, USA); ticarcillin (GlaxoSmithKline, Mexico); piperacillin (Sigma-Aldrich Inc. MO, USA); ticarcillin/clavulanic acid (GlaxoSmithKline, Mexico); piperacillin/tazobactam (Sigma-Aldrich Inc. MO, USA); ceftazidime (Laboratorios Salus S. A. de C. V. Mexico); ceftriaxone (Laboratorios Salus S. A. de C. V. Mexico); cefotaxime (Laboratorios Salus S. A. de C. V. Mexico); cefepime (Laboratorios Salus S. A. de C. V. Mexico);

TABLE 1 | Genomic islands detection and susceptibility profile in *P. aeruginosa* strains associated to fatality cases in children with bacteremia.

Strain	Child gender/age	Underlying conditions	20 antimicrobials tested			GEIs detected
			S	I	R	
1197	Male/8 years	Acute lymphoblastic leukemia	TI, PI, TM, PT, CA, FE, IM, AZ, AM, GE, TO, PO, CI, LO, NO, LE	CB, CT, ME	CR	PAGI-1, PAPI-1, PAPI-2, pKLC102 [2]
1210	Female/1 year	Hemophagocytic syndrome	IM, ME, AM, GE, TO, PO, CI, LO, NO, LE	CB, TI, TM, CA, FE, AZ	PI, PT, CR, CT	PAPI-1, PAPI-2 [8]
1211	Male/5 years	Aplastic anemia	TI, TM, CA, CR, FE, AZ, AM, GE, TO, PO, CI, LO, NO, LE	CB, PI, CT	PT, IM, ME	PAPI-1, PAPI-2 [8]
1212	Female/14 years	Cavernous angioma	TI, PI, TM, PT, CA, CR, CT, FE, IM, ME, AZ, AM, GE, TO, PO, CI, LO, NO, LE	CB		PAPI-1, PAPI-2 [8]
1220	Male/4 years	Osteosarcoma	AM, GE, TO, PO, NO, LE	CB, TI, PI, TM, CA, FE, AZ, CI, LO	PT, CR, CT, IM, ME	PAPI-1, PAPI-2, pKLC102 [5]
1226	Male/1 year	Biliary atresia	PO, CI, LO, NO, LE	TI	CB, PI, TM, PT, CA, CR, CT, FE, IM, ME, AZ, AM, GE, TO	PAPI-2 [11]
1239	Male/6 years	Acute myeloblastic leukemia	TI, FE, AZ, AM, GE, TO, PO, NO	CB, PI, TM, PT, CA, CI, LO, LE	CR, CT, IM, ME	PAPI-1, PAPI-2 [8]
1241	Female/7 years	Epoxy encephalopathy		PO	CB, TI, PI, TM, PT, CA, CR, CT, FE, IM, ME, AZ, AM, GE, TO, CI, LO, NO, LE	PAGI-1, PAPI-1, PAPI-2 [4]

S, Susceptible; I, Intermediate resistance; R, Resistant. CB, Carbenicillin; TI, Ticarcillin; PI, Piperacillin; TM, Ticarcillin/Clavulanic acid; PT, Piperacillin/Tazobactam; CA, Ceftazidime; CR, Ceftriaxone; CT, Cefotaxime; FE, Cefepime; IM, Imipenem; ME, Meropenem; AZ, Aztreonam; AM, Amikacin; GE, Gentamicin; TO, Tobramycin; PO, Polymyxin B; CI, Ciprofloxacin; LO, Lomefloxacin; NO, Norfloxacin; LE, Levofloxacin. GEIs, Genomic Islands; [number] correspond to GEIs genotype.

imipenem (Ivax Pharmaceuticals Mexico, S. A. de C. V. Mexico); meropenem (AstraZeneca, Mexico); aztreonam (Sigma-Aldrich Inc., MO, USA); amikacin (Laboratorios Pisa S. A. de C. V. Mexico); gentamicin (Sigma-Aldrich Inc. MO, USA); tobramycin (Alcon Laboratorios S. A. de C. V. Mexico); polymyxin B (GlaxoSmithKline, Mexico); ciprofloxacin (Laboratorio Lemery, S. A. de C. V. Mexico); lomefloxacin (Sigma-Aldrich Inc. MO, USA); norfloxacin (Productos Medix S. A de C. V. Mexico); and levofloxacin (Laboratorio Lemery, S. A. de C. V. Mexico).

Acquired β -Lactamases Detection

The most common acquired β -lactamases (Kos et al., 2014; Oliver et al., 2015) were searched for using PCR with specific primers for each group (Table S1). The acquired β -lactamases were sequenced (Macrogen Metagenome Next Generation Sequencing [NGS] Service. Korea) in order to determine the allele type. The conditions for thermal cycling for the β -lactamases genes were: an initial denaturation cycle at 94°C for 2 min, followed by 35 cycles at 94°C for 1 min, the annealing temperature was according to each specific primer set (Table S1) for 1 min and 72°C for 1 min with a final cycle of 72°C for 2 min. All PCR products of each gene were visualized on agarose gel.

RESULTS

We carried out the characterization of 60 *P. aeruginosa* isolates. All isolates showed biochemical patterns of *P. aeruginosa* (data not shown). The isolates were isolated from children, of whom 65% were female and 35% male. The median

age of patients at the time of *P. aeruginosa* bacteremia diagnosis was 5.5 years with a range of 1 month to 14 years and 8 months. All patients admitted to hospital had underlying disease. The most common underlying diseases were hematological and oncological disease (52%) including acute lymphoblastic leukemia, non-Hodgkin lymphoma, solid tumor, hemophagocytic syndrome, histiocytosis and aplastic anemia, and prematurity (24%), other underlying diseases were gastrointestinal malformations, congenital cardiopathy, Wiscott-Aldrich disease, Dandy Walker syndrome, Chiari's malformation, and nephrogenic and diabetes insipidus (Figure 2). Medical records were unavailable for eight patients.

In 28 patients, bacteremia was related to a central catheter. Bacteremia was present in 21 children after chemotherapy treatment, with neutropenia and fever developing. The overall case fatality associated with *P. aeruginosa* bacteremia was 13.3% (8 of 60), who developed septic shock and multi-organ failure (Table 1).

Frequency of Virulence Genes and TTSS Genotype Detection

All of the isolates isolated from the study's patients presented the seven virulence genes that were amplified by PCR. Due to the high identity between the *exoT* (GenBank accession NC_008463.1) and *exoS* (GenBank accession NC_002516.2) genes (>80%), we could not design specific primers for PCR to amplify each gene. Therefore, we had to use a new strategy that allowed us to differentiate between the detection of *exoS* and *exoT* in each of our strains. The *in silico* analysis of restriction

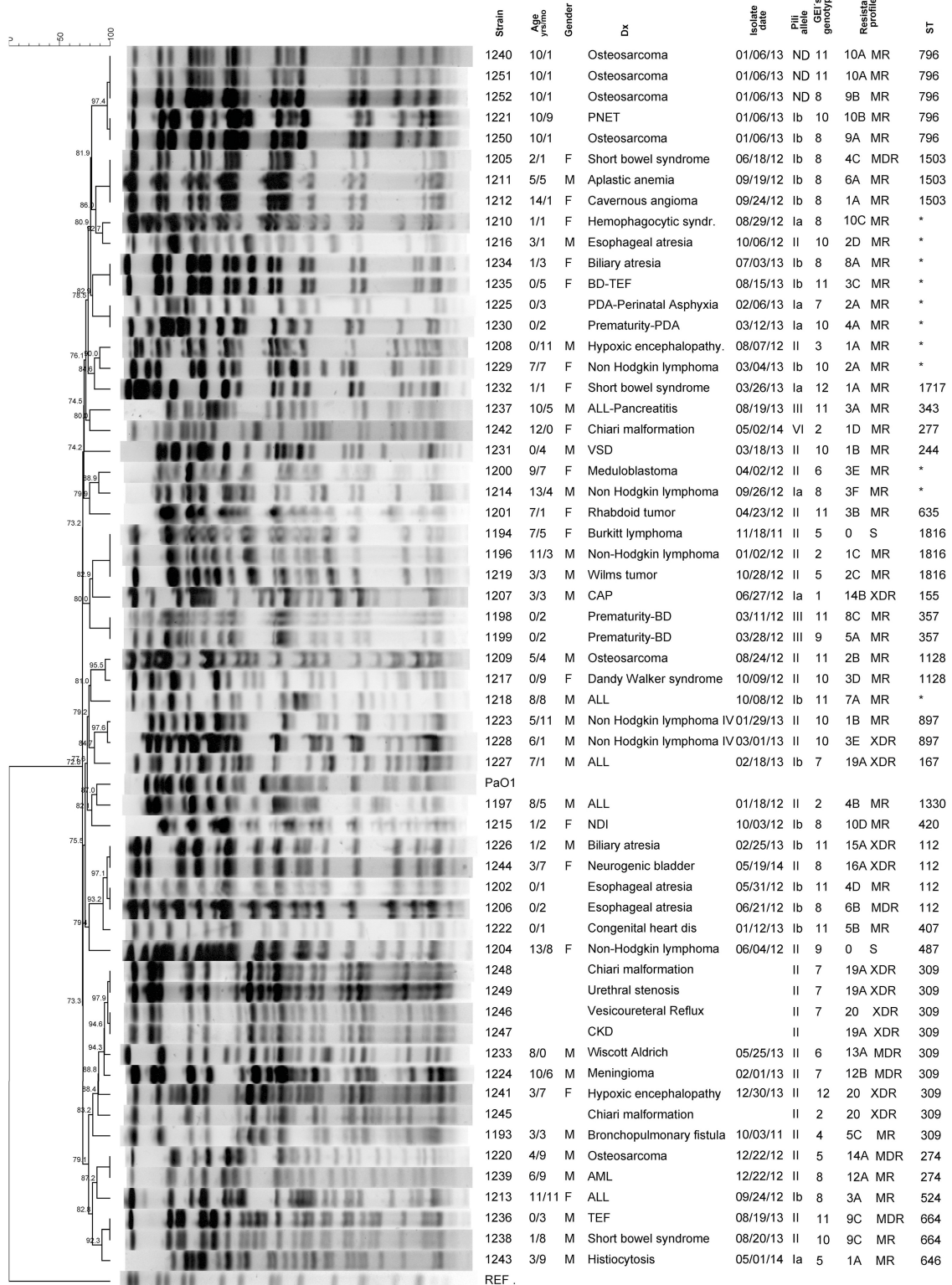


FIGURE 2 | Pulse-Field gel electrophoresis (PFGE) profile dendrogram and genetic and phenotypic characteristics of *P. aeruginosa* strains isolated from children with bacteremia. The dendrogram was generated by Dice similarity coefficient (Dice, 1945) and UPGMA (Day and Edelsbrunner, 1984) clustering methods by using PFGE images of *SpeI* digested genomic DNA. The scale bar shows the correlation coefficient (%). Underlying disease (Dx): PNET, primary
(Continued)

FIGURE 2 | Continued

neuroectodermal tumor; BD-TEF, bronchopulmonary dysplasia-tracheoesophageal fistula; PDA, persistent ductus arteriosus; SGER, severe gastroesophageal reflux; ALL, acute lymphoblastic leukemia; VSD, ventricular septal defect; BD, bronchopulmonary dysplasia; CAP, community acquired pneumonia; NDI, nephrogenic diabetes insipidus; CKD, chronic kidney disease; TEF, tracheoesophageal fistula; AML, acute myeloid leukemia. Asterisk indicate a new ST, which has not been assigned. MDR, Multi-Drug Resistant; MR Moderately Resistant; XDR Extensively drug Resistant. The pili alleles were obtained according to Kus's characterization (Kus et al., 2004), in which *P. aeruginosa* type IV pili are divided into five distinct phylogenetic groups. The GEIs genotype was assigned base on the presence/absence of genomic island, 12 different GEIs genotypes were found (for details see Table S2, Supplementary Material). The resistance profile was formed by a number and a letter: the number indicates how many antibiotics the strain was resistant to; the letters were assigned alphabetically to differentiate among the antimicrobial combinations for which the strains were resistant (detailed information is shown in Table S3, Supplementary Material).

patterns of *exoS* and *exoT* showed that the enzyme *HinfI* yielded two different patterns between them. Based on this new strategy, 75% of the strains were *exoS*+ and 70% *exoT*+. Of all our strains, 90% presented the *exoU* gene, which was detected by PCR using specific primers. In general, the 67% of our strains were *exoS*+/*exoU*+ genotype, 23% were *exoS*-/*exoU*+ and 10% were *exoS*+/*exoU*-. The *exoS*-/*exoU*- genotype was not found in our study population. Previous studies have reported (Oliver et al., 2015; Peña et al., 2015) that the *exoY* and *exoT* genes are present in all strains. Reason for which, we decided not to detect the *exoY* gene in the present study. However, due to our results where found that the 30% of the isolates are negative *exoT*, now, it does appear necessary to characterize the *exoY* gene in our population and to determine if also there are negative *exoY* strains.

TFP Allele Characterization and GEIs Detection

With respect to characterization by TFP alleles (Kus et al., 2004), we found that all strains produced a single PCR product ranging in size from ~1.4 to 2.8 kb. Based on PCR product size analysis, 30 out of 60 strains gave a product size of 1,400 bp which was similar to that of group II from the PAO1 reference strain. In addition, three yielded a PCR product of 2,650 bp, as seen for the PA14 control strain and these three strains were determined to belong to group III; 24 strains gave a PCR product (2,800 bp) greater than the PA14 strain; and three strains yielded a PCR product of 1,560 bp. To complete the characterization by TFP allele of the 27 strains with different PCR product sizes, individual PCRs were performed using specific primers for the *tfpO_a*, *tfpO_b*, *tfpY*, and *tfpZ* accessory genes present between *tRNA* and *pilA* (Kus et al., 2004). The results showed that 22 strains amplified the *tfpO* gene (group I), of which seven strains were subgroup Ia and 15 were subgroup Ib, while one strain (1,242 strain) could not be characterized according to Kus's criteria (Kus et al., 2004). Therefore, we selected this strain (1,242) and another strain (1,207) with a 2,800 bp PCR product. Both products were sequenced and analysis of the strain 1,207 showed the presence of the pilin glycosylation gene *tfpO* adjacent to *pilA* (GenBank accession number KX096875), confirming that this strain belongs to group I. However, subgroup 1a or 1b characterization using specific primers for each subgroup (Kus et al., 2004) could not be achieved. Sequence analysis of strain 1,242 showed a novel accessory gene (IS1383), which encodes for a transposase and a new variant of *pilA* gene (GenBank accession number KX096876). The transposase gene has 100% similarity

to a transposase gene described in cyclohexylamine-degrading *Pseudomonas plecoglossicida* NyZ12, while the new variant of *pilA* gene presented high identity in its first 345–381 nucleotides with the *pilA* gene of *P. aeruginosa* M1-G, K122-4, and B136-33 strains. According to this result, we identified a new variant of PilA protein and probably, a new TFP allele (Figure S1). We wanted to know if more strains from our study presented the transposase gene and in turn, the new allele. We could not find more strains with this novel TFP allele in our population. We were not able to sequence the 1,560 bp products of three strains despite three consecutive attempts. However, considering the size of the PCR product, which was very similar to the strain PAO1 Group II, we decided to characterize this *pil* region according to its restriction patterns with *HphI* enzyme, using the PAO1 strain as reference. The restriction pattern presented for the three strains was the same, with two bands of ~750 and 650 bp (data not shown). However, this pattern was very different to that of the PAO1 strain (675, 425, 147, and 96 bp bands size) and other strains from group II, which suggests greater variability in this region and possibly, the presence of other alleles, as yet not described.

With respect to the detection of genomic islands, we found 12 GEIs genotypes (Table S2), and at least one genomic island was found in all of the strains. The most frequently detected genomic island was PAPI-2 (100%), followed by PAPI-1 (55%), PAGI-1 (47%), and pKLC102 (23%). PAGI-2 was detected in only 3% of the strains; the genomic islands PAGI-3 and PAGI-4 were not detected at all in our study population. The majority of the strains had only two islands; just one strain presented up to five GEIs (PAGI-1, PAGI-2, PAPI-1, PAPI-2, and pKLC102); in six strains four GEIs were detected; in 15 strains 3 GEIs were found and 13 strains had one island only. The genetic content of each GEIs was variable, as has been previously documented (Liang et al., 2001; Klockgether et al., 2007; Morales-Espinosa et al., 2012).

PFGE and MLST Genotype

Using *SpeI* fragment patterns, we found 42 different restriction patterns, of which 29 corresponded to 29 single isolates (unique patterns) and 13 were shared by two or three isolates (Figure 2). Strains 1,195 and 1,203 could not be typed with this method. Although, there were 13 strains that shared chromosomal profiles, the majority of the strains were isolated from unrelated patients, in different hospital services and on different dates. In addition, each strain showed a variable number of GEIs or variability in genetic content and/or a different antimicrobial resistance profile. Only four strains (1,240, 1,250, 1,251, and

1,252) presented the same or similar PFGE patterns and were isolated from same patient in the same day. However, all the isolates had different GEIs number with genetic content and different resistant profile, indicating that this patient had a mixed infection.

The sequence type (ST) in our strains was highly variable, and showed a good correlation with the variability found using the PFGE method. The most frequently detected ST was ST309, which was present in nine strains. These strains were grouped in only one cluster (**Figure 2**) and all of them shared the TFP group II, six of out nine strains were isolated of urine from patients with urinary tract infection as primary infection, six had the highest resistance profile to around 20 antimicrobials, and four shared the same GEIs genotype. Additionally, there were six strains from this group that presented up to three different β -lactamases (GES20, OXA2, and KPC). A further 21 strains shared STs: as ST796 (5 strains), ST112 (4 strains), ST1503, and ST1816 (3 strains for each), ST357, ST897, and ST664 (2 strains for each), while the remaining 30 strains presented a unique sequence type (**Figure 2**).

Antimicrobial Susceptibility Profile

With respect to susceptibility, only two strains were susceptible to all 20 antimicrobials tested. The 92% of the strains were susceptible to polymyxin B, and between 70 and 85% were sensitive to quinolones, aminoglycosides, cefepime and ceftazidime, while, from 45 to 67% were susceptible to β -lactam antibiotics (Table S3). With respect to resistance, seven strains were resistant to almost all the antimicrobials. The highest rate of intermediate resistance and resistance was observed for carbenicillin (73%) and ceftriaxone (75%). In general, 31.6% (21) of the strains showed resistance to more than 10 antibiotics; 21.6% (13) of strains were multi-resistant more than five antibiotics. We found 43 profiles (phenotypes) of resistance, based on antimicrobials combination for which they were resistant (Table S3).

Regarding acquired β -lactamases detection, 46.6% strains had at least one β -lactamase, with the most frequent detected being KPC (23 strains), followed by OXA-2 (13), GES-20, and GES-5 (9), while VIM-46 was detected in only one strain. Eleven strains presented 2 or 3 β -lactamases, and the greatest concentrated and highest number of acquired β -lactamase types detected was in the ST309 strains.

Based on phenotype stratification for antimicrobial susceptibility or resistance profiles (Magiorakos et al., 2012), 10% were multi-drug resistant (MDR), 18% extensively drug-resistant (XDR), 68% moderately resistant and only 3% were considered susceptible (**Figure 2**).

Genetic and Phenotypic Characteristics of *P. aeruginosa* Strains Associated to Case Fatality

Total case fatality associated with *P. aeruginosa* bacteremia was 13.3% (8/60). All the children who died were above 1 year of age and the majority of these patients were diagnosed with a hematological disease (**Table 1**). All the children developed septic

shock and multi-organ failure. Characterization of the strains showed genetic and phenotypic variability, with four strains sharing chromosomal patterns (1,211, 1,212, 1,220, and 1,239) between them (**Table 1** and **Figure 2**).

DISCUSSION

European epidemiological surveillance programs show that *P. aeruginosa* is one of the most frequently isolated Gram-negative microorganisms from patients admitted to ICU (Pujol and Limón, 2013). The most important risk factors leading to development of nosocomial infections associated with *P. aeruginosa* in patients are a long period of hospitalization, the existence of a serious pre-existing condition and exposure to invasive procedures (Fergie et al., 1994; Yetkin et al., 2006; Yang et al., 2011). *P. aeruginosa*-associated infections have a high mortality rate due to the presence of virulence factors in the bacterium, innate and acquired multidrug resistance, and immune impairment of the host (Fergie et al., 1994; Lyczak et al., 2000; Corona-Nakamura et al., 2001; Thuong et al., 2003; Poole, 2011). Different studies have shown that *P. aeruginosa* is generally acquired from the hospital environment, person-to-person contact, indirect transmission via contaminated hands, through contaminated respiratory care equipment, catheters, irrigating solutions, and from the use diluted antiseptics and cleaning solutions (Corona-Nakamura et al., 2001; Thuong et al., 2003; Yetkin et al., 2006). Generally, *P. aeruginosa* outbreaks in hospitals are associated with clonally-related strains and through cross transmission in immunocompromised patients with underlying diseases, such as those with malignancies, burns, and prematurity (Agodi et al., 2007; Zhang et al., 2012; Cies et al., 2015). Although *P. aeruginosa* is considered an opportunistic pathogen, it has several virulence factors. These are encoded on plasmids or chromosomal genes, such as *lasB* (encoding for elastase), *toxA* (exotoxin-A), *pilA* (type fimbrial precursor type IV pilin), *plcH* (hemolytic phospholipase C precursor), *phzA1* (phenazine biosynthesis protein), *toxR* (positive transcriptional regulator of *toxA* transcription), *lecA* (lectin; Wick et al., 1990; Walker et al., 1995; Rumbaugh et al., 1999; Woods, 2004; Shen et al., 2006; Wolska and Szwed, 2009; Morita et al., 2015), and four type III effectors: ExoU (phospholipase A2), ExoY (adenylate cyclase), ExoS (ADP-ribosylates numerous proteins, including members of the Ras protein family) and ExoT (a type III cytotoxin that functions as an anti-internalization factor with an N-terminal RhoGAP domain and a C-terminal ADP-ribosyltransferase domain; Sun and Barbieri, 2003; Jia et al., 2006; Cisz et al., 2008; Sun et al., 2012). These last two effectors are closely related to each other and participate in inhibiting phagocytic cells (neutrophil and macrophage function) and in bacterial uptake by epithelial cells (Engel and Balachandran, 2009). The characterization of strains from our current study showed the presence of all virulence genes in 100% of the strains, indicating that these genes are present in the structural integrity of the bacterial chromosome. Contrary to report by other authors (Feltman et al., 2001; Engel and Balachandran, 2009; Oliver et al., 2015; Peña et al., 2015), almost all our strains presented

the *exoU* gene. Determination of the TTSS genotype showed that a high percentage was *exoS*+/*exoU*+ genotype. However, not all strains present the *exoT* gene. The presence of both *exoS* and *exoU* genes has been associated with acute infection in humans, such as bacteremia, and correlates with a worse outcome in clinical infections, a higher bacterial burden and a greater risk of death in mechanically ventilated patients (Feltman et al., 2001; Engel and Balachandran, 2009; Peña et al., 2015). While it is true that the results of the present study confirm this important relationship, between the *exoS*+/*exoU*+ genotype and bacteremia, the infections were resolved via antimicrobial treatment, probably due to low resistance of most of our strains to fluoroquinolones, aminoglycosides and ceftazidime, a third generation cephalosporin indicated for the treatment of patients who develop fever associated with neutropenia. On the other hand, registered mortalities in our study were reduced. Analysis of the results showed that there was no association between the *exoS*+/*exoU*+ genotype and risk of death.

The characterization of TFP alleles in our strains show diversity in TFP alleles to a greater extent than previously documented (Kus et al., 2004). A novel TFP allele was detected on the transposase accessory gene located between *tRNA* and *pilA*, which has been documented in other *Pseudomonas* species. A novel group of the *pilA*_{VI} gene with low sequence identity in its 3' end to other *pilA* groups of different *P. aeruginosa* strains was also detected. The analysis of PilA_{VI} amino acid sequence showed a homology between 31.4 and 42.6% with respect to other groups of PilA (Figure S1). Although, we did not have experimental evidence of the PilA expression, the amino acids sequence is highly homologous in its first 127 aa to other sequences of PilA available in the databases, as it is showed in Figure S1. Using the Swiss-model (homology modeling) software, we obtained a virtual protein structure 100% homologous to *P. aeruginosa* fimbrial protein in its first 125 amino acids (image not shown), although from 126 to 142 aa, no homology was found with respect to the C-terminal region of the same PilA protein. Interestingly, we observed the lack of the two-cysteine residues within of its disulfide-bonded loop (DSL) region, which are involved in the disulfide bond formation contributing to the pilin assembly into fibers and its adhesive capacity (Harvey et al., 2009). The detection of this novel allele supports the notion of horizontal transfer of genes and recombination within homologous regions between bacteria and the incorporation of novel DNA into one of the hypervariable regions of the *P. aeruginosa* chromosome. The singularity of the accessory gene (transposase) and *pilA*_{VI} gene confirmed Kus's observations that each pilin type is stringently associated with a specific accessory gene. Additionally, the presence of the transposase gene immediately adjacent to the *tRNA*^{thr} gene confirms that a mechanism of bacteriophage-mediated transduction was involved in the generation of the new TFP allele. This is not surprising, since it is known that *tRNA* genes are hotspots for bacteriophage integration, where we detected greater genetic variability, as seen in the lack of characterization of three of our strains. The characterization of our strains isolated from the blood of children with bacteremia showed the predominance of two TFP alleles (group I and II).

In her study, Kus reported a similar percentage of group I pilins within environmental strains and pediatric CF isolates, while in other human isolates, there appears to be an approximately equal distribution of strains within pilin groups I, II, and III (Kus et al., 2004). The characterization of different populations of *P. aeruginosa* isolated from different sources is required in order to determine if there is a correlation between the *pilA* allele and a specificity niche.

In addition to virulence genes, the bacterium acquired foreign DNA in combinations of specific blocks of genes that contributed to virulence and/or adaptation to specific niches. These strain-specific segments of the genome are found in limited chromosomal locations, referred to as genomic islands (GEIs), which are acquired by HGT (Ou et al., 2006; Boyd et al., 2008; Juhas et al., 2009). Depending on their functions, they encode for pathogenicity, symbiosis, fitness, metabolic, or resistance traits (Hacker and Kaper, 2000; Dobrindt et al., 2004; Juhas et al., 2009). A large number of GEIs in the *P. aeruginosa* chromosome have been described, but these GEIs are found in varying numbers in some strains and not in others (Schmidt et al., 1996; Liang et al., 2001; Larbig et al., 2002). In the present study, all the strains isolated from children diagnosed with bacteremia possessed the PAPI-2 Island and more than half of them had PAPI-1 with both islands presenting a mosaic structure. Most of the PAPI-2 genes are related to mobility functions, including integrase genes, transposase genes, one pseudogene, and portions of insertion sequences in addition to the presence of seven ORFs that correspond to hypothetical proteins of unknown function (He et al., 2004). Interestingly, in the right end of PAPI-2 there are two genes that correspond to the *exoU* gene and its chaperone *spcU* (He et al., 2004). As mentioned previously, *exoU* encodes a type III effector (ExoU) that plays an important role in pathogenesis. ExoU is a potent cytotoxin with phospholipase A2 activity, which has been associated with the development of septic shock in an animal model (Kurahashi et al., 1999). The presence of *exoU* in almost all our strains isolated from blood samples taken from patients with bacteremia corroborates the data previously reported by Kurahashi. The presence of *exoU* on PAPI-2 defines this island as a pathogenicity island and it is very likely that the expression of ExoU for *P. aeruginosa* strains facilitates the spread through tissues favoring the arrival of bacteria to bloodstream (He et al., 2004; Kulasekara et al., 2006). On the other hand, PAPI-1 genes are involved in adhesion and/or motility, although, the majority of their genes encode for hypothetical proteins, making this island unique (He et al., 2004; Qiu et al., 2006; Carter et al., 2010; Harrison et al., 2010). This island contains two pairs of two-component regulatory systems, which through mutational analysis have been shown to affect plant and mammalian pathogenesis (He et al., 2004). In addition to all genes being involved in type 4 fimbrial assembly and function in the *pil* chromosomal region, the PAPI-I Island has a set of genes (*pilL*, *pilN*, *pilO*, *pilQ*, *pilR*, *pilS*, *pilT*, *pilV*, and *pilM*) involved in type IVb pilus biogenesis that contributes to adherence onto synthetic surfaces, such as catheters (Giltner et al., 2011), which provide an entrance to the circulatory system.

The presence of both PAPI-I and PAPI-2 islands in more than half of our strains show that these islands are contributing

to *P. aeruginosa* virulence, promoting colonization on catheter surfaces and skin injury with the induction of proinflammatory mediators, and passing the bacteria into the blood system benefitting the survival and fitness of the bacterium. The antimicrobial resistance profiles showed that more than half of our strains isolated from children had a moderate resistance profile, which may provide some explanation as to the low mortality rate reported in our study. The number of MDR and XDR strains detected is still low in the present study (Pediatric Hospital), nevertheless, continuous epidemiological surveillance is necessary to monitor MDR and XDR strain presence considering the continuous admission of patients to different hospital services and horizontal genes transfer from hospital microbiota to patient's native microbiota. Analysis of chromosomal profiles and MLST of the strains showed great genetic variability among our population, indicating that there is no clonal relationship. However, it is striking that in a cluster of nine strains, six were isolated from urine and all nine share the ST309, TFP allele (group II), and have the XDR (six strains) or MDR (two strains) phenotype. There are reports of *P. aeruginosa* high-risk clones circulating in hospitals worldwide, which present specific genetic characteristics (ST111, ST235, and ST175) linked to MDR or XDR phenotype (Cabot et al., 2012; Mulet et al., 2013; Witney et al., 2014; Oliver et al., 2015; Peña et al., 2015). The increasing prevalence of these clones complicates the clinical landscape, limiting therapeutic options and having significant impact on morbidity and mortality. The presence in our population of strains ST309 linked to the MDR or XDR phenotype, make them a potential high-risk clone, which was not documented as such, previously. However, it is important to highlight that in our study, this clone was not associated with any of the mortality cases. Studies in other populations and hospitals settings are recommended in order to determine the presence of ST309 as part of a potential high risk clone, its distribution throughout hospitals in Mexico and its importance to the severity of the clinical outcome.

Based on the overall analysis of the results obtained in this study, we found that the strains of *P. aeruginosa* causing bacteremia in each child harbored *exoU* and *exoS*. This results are support for the Berthelot's observations (Berthelot et al., 2003), who characterized genetically and phenotypically 92 *P. aeruginosa* strains isolated from blood: where, they identified four groups of strains (TTSS types) according to level of type III protein secretion and kinetics of cytotoxicity. Additionally, they made the detection of *exoU* and *exoS* genes by real-time PCR. They found a strong correlation among *exoU*+ and *exoS*+ genotype and TTSS phenotype. They concluded that the most of the bacteremic strains (80%) were strongly cytotoxic for macrophages and that the ExoU-secreting isolates killed the phagocytes more rapidly. Based on Berthelot's study, we can deduce that our strains being cytotoxic. It is likely that *exoU* was acquired through horizontal transfer of PAPI-2 from one strains to other. It also appears likely that the patients were carrying the majority of the strains prior to hospital admission and immunosuppression caused by underlying disease favored the multiplication of microorganisms and adherence to catheter surfaces. The presence of *exoU* on PAPI-2 island gives bacteria

the ability to disseminate into the circulation and produce bacteremia, and in some cases the development of septic shock (Engel and Balachandran, 2009).

We identified a reduce number of exogenous β -lactamases among strains, with KPC β -lactamase being the most frequent. However, the presence of a potential high-risk clone, ST309 with a MDR or XDR phenotype, circulating throughout of our hospital could create a serious health problem.

Multiresistant bacteria serve as hosts for the multiple genetic elements (genes, integrons, transposons, and plasmids) that confer their antibiotic resistance phenotypes. This important characteristic allows to the bacteria to be a "successful" bacterial strain, which is an extremely effective vehicle for the dissemination of any genetic element (s) for at least two reasons: (a) all of the hosted resistance elements are transmitted vertically (i.e., from mother to daughter cells) by virtue of the strain's spread and its increasing prevalence and (b) a successful strain has multiple opportunities to act as a donor and to transfer its resistance elements horizontally to other strains, species or genera (Maatallah et al., 2011; Woodford et al., 2011). So that, the identification of a successful multiresistant strain or clone should receive prompt attention to avoid HGT of antimicrobial resistance into bacterial populations, and its dissemination to different hospitals and different regions.

Additionally a high-risk clone should have important characteristics: (a) to be pathogenic (to have virulence factors); (b) to have a resistance profile to at least three groups of antibiotics (extensive drug resistance) and (c) to be present in different places (Woodford et al., 2011). ST309 strains have been documented in France, Australia, Malaysia and even Brazil, which have been isolated from water and some clinical samples such as bronchial lavage, blood, and urinary tract (*P. aeruginosa* PubMLST website).

Despite the fact that the relative contributions of endogenous and exogenous sources to *P. aeruginosa* acquisition are not well-established. At this moment, we can assume that in our study hospital, *P. aeruginosa* infections are not the result of epidemic outbreaks, since the strains associated with infection were highly variable and they were not acquired in the hospital setting.

CONCLUSIONS

To conclude, genetic and phenotypic characterization of 60 isolates of *P. aeruginosa* associated with blood infections in children admitted to a highly specialized hospital in Mexico, showed that the infections were caused by strains with great diversity in their accessory genome. In the majority of the cases, there was no cross-infection between patients associated with a single clone. The *P. aeruginosa* strains isolated from blood and involved in bacteremia were TFP allele group I and II, and cytotoxic (*exoU*+ and *exoS*+). The results support the idea that the presence of PAPI-I and PAPI-2 in the strains contributed to greater virulence, which is associated with better adherence and dissemination into the bloodstream leading to an increased risk of septicemia. We identified the presence of ST309 strains isolated from urinary tract, which possess virulence genes, an

extensive drug resistance phenotype, important characteristics that would contribute to make them a potential high-risk clone.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RM, conceived and designed the experiment, wrote the paper. GM and CR critical review of the article and review the article for intellectual content. RM, GD, and AC, Final approval of the version to be published. JM, CR, performed the experiments of Antimicrobial susceptibility and made the analysis of results. GD, made all genetic analysis corresponding to MLST, Type III Secretion System Genotype and Analyzed in general all results. LE and CR, Designed the primers and performed the experiments for the characterization of the β -lactamase genes and MLST and determined TFSS genotype. DI performed the experiments for PFGE, virulence genes and GEIs determination.

REFERENCES

- Agodi, A., Barchitta, M., Cipresso, R., Giaquinta, L., Romeo, M. A., and Denaro, C. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* carriage, colonization, and infection in ICU patients. *Intensive Care Med.* 33, 1155–1161. doi: 10.1007/s00134-007-0671-6
- Berthelot, P., Attree, I., Plésiat, P., Chabert, J., de Bentzmann, S., Pozzetto, B., et al. (2003). Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia isolates: evidence for a possible association between O serotypes and *exo* genes. *J. Infect. Dis.* 188, 512–518. doi: 10.1086/377000
- Boyd, E. F., Almagro-Moreno, S., and Parent, M. A. (2008). Genomic islands are dynamic, ancient integrative elements in bacterial evolution. *Trends Microbiol.* 17, 47–53. doi: 10.1016/j.tim.2008.11.003
- Cabot, G., Ocampo-Sosa, A. A., Domínguez, M. A., Gago, J. F., Juan, C., Tubau, F., et al. (2012). Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 6349–6357. doi: 10.1128/AAC.01388-12
- Carter, M. Q., Chen, J., and Lory, S. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity island PAPI-1 is transferred via a novel type IV pilus. *J. Bacteriol.* 192, 3249–3258. doi: 10.1128/JB.00041-10
- Chung, J. C. S., Becq, J., Fraser, L., Schulz-Trieglaff, O., Bond, N. J., Foweraker, J., et al. (2012). Genomic variation among contemporary *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically infected cystic fibrosis patients. *J. Bacteriol.* 194, 4857–4866. doi: 10.1128/JB.01050-12
- Cies, J. J., Jain, J., and Kuti, J. L. (2015). Population pharmacokinetics of the piperacillin component of piperacillin/ tazobactam in pediatric oncology patients with fever and neutropenia. *Pediatr. Blood Cancer* 62, 477–482. doi: 10.1002/psc.25287
- Cisz, M., Lee, P., and Rietsch, A. (2008). ExoS controls the cell contact-mediated switch to effector secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 190, 2726–2738. doi: 10.1128/JB.01553-07
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2016). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Sixth Informational Supplement. M100–S26*. Wayne, PA: CLSI.
- Corona-Nakamura, A. L., Miranda-Novales, M. G., Leaños-Miranda, B., Portillo-Gómez, L., Hernández-Chávez, A., Anthon-Rendón, J., et al. (2001). Epidemiologic study of *Pseudomonas aeruginosa* in critical patients and reservoirs. *Arch. Med. Res.* 32, 238–242. doi: 10.1016/S0188-4409(01)00267-3
- Darmon, E., and Leach, D. R. F. (2014). Bacterial genome instability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 1–39. doi: 10.1128/MMBR.00035-13
- Day, W. H. E., and Edelsbrunner, H. (1984). Efficient algorithms for agglomerative hierarchical clustering methods. *J. Classif.* 1, 7–24. doi: 10.1007/BF01890115
- Deretic, V., Schurr, M. J., Boucher, J. C., and Martin, D. W. (1994). Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: environmental stress

FUNDING

This research was funded by DGAPA-PAPIIT Grant number IN212513 from Universidad Nacional Autónoma de México. The funder has no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Abdiel Labariega-Torres, Delia Licona, and Mónica Benedetti Sandner for their technical support.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00313/full#supplementary-material>

- and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. *J. Bacteriol.* 176, 2773–2780. doi: 10.1128/jb.176.10.2773-2780.1994
- Dice, L. R. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26, 297–302. doi: 10.2307/1932409
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., and Hacker, J. (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 414–424. doi: 10.1038/nrmicro884
- Drenkard, E., and Ausubel, F. M. (2002). *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416, 740–743. doi: 10.1038/416740a
- Engel, J., and Balachandran, P. (2009). Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 61–66. doi: 10.1016/j.mib.2008.12.007
- Feltman, H., Schulert, G., Khan, S., Jain, M., Peterson, L., and Hauser, A. R. (2001). Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 147, 2659–2669. doi: 10.1099/00221287-147-10-2659
- Fergie, J. E., Shema, S. J., Lott, L., and Crawford, R. P. C. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in immunocompromised children: analysis of factors associated with a poor outcome. *Clin. Infect. Dis.* 18, 390–394. doi: 10.1093/clinids/18.3.390
- Gilligan, P. H. (1995). “*Pseudomonas*,” in *Manual de Microbiología Clínica*, eds P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (Washington, DC: American Society of Microbiology), 517–525.
- Giltner, C. L., Rana, N., Lunardo, M. N., Hussain, A. Q., and Burrows, L. L. (2011). Evolutionary and functional diversity of the *Pseudomonas* type IVa pilin island. *Environ. Microbiol.* 13, 250–264. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02327.x
- Govan, J. R. W., and Deretic, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* 60, 539–574.
- Grisaru-Soen, G., Lerner-Geva, L., Keller, N., Berger, H., Passwell, J. H., and Barzilai, A. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in children: analysis of trends in prevalence, antibiotic resistance and prognostic factors. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19, 959–963. doi: 10.1097/00006454-200010000-00003
- Hacker, J., and Kaper, J. B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 641–679. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.641
- Harrison, E. M., Carter, M. E. K., Luck, S., Ou, H., He, X., Deng, Z., et al. (2010). Pathogenicity islands PAPI-1 and PAPI-2 contribute individually and synergistically to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. *Infect. Immun.* 78, 1437–1446. doi: 10.1128/IAI.00621-09
- Harvey, H., Habash, M., Aidoo, F., and Burrows, L. L. (2009). Single-residue changes in the C-terminal disulfide-bonded loop of the *Pseudomonas*

- aeruginosa* type IV pilin influence pilus assembly and twitching motility. *J. Bacteriol.* 191, 6513–6524. doi: 10.1128/JB.00943-09
- Häufler, S., Tümmler, B., Weissbrodt, H., Rohde, M., and Steinmetz, I. (1999). Small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Clin. Infect. Dis.* 29, 621–625. doi: 10.1086/598644
- Häufler, S., Ziegler, I., Löttel, A., Götz, F. V., Rohde, M., Wehmhöhner, D., et al. (2003). Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *J. Med. Microbiol.* 52, 295–301. doi: 10.1099/jmm.0.05069-0
- He, J., Baldini, R. L., Déziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N. T., et al. (2004). The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 2530–2535. doi: 10.1073/pnas.0304622101
- Holloway, B. W. (1955). Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 13, 572–581. doi: 10.1099/00221287-13-3-572
- Jia, J., Wang, Y., Zhou, L., and Jin, S. (2006). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* toxin ExoS effectively induces apoptosis in Host Cells. *Infect. Immun.* 74, 6557–6570. doi: 10.1128/IAI.00591-06
- Jolley, K. A., and Maiden, M. C. J. (2010). BIGSdb: scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics* 11:595. doi: 10.1186/1471-2105-11-595
- Juhas, M., van der Meer, J. R., Gaillard, M., Harding, R. M., Hood, D. W., et al. (2009). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 376–393. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x
- Kerr, K. G., and Snelling, A. M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J. Hosp. Infect.* 73, 338–344. doi: 10.1016/j.jhin.2009.04.020
- Kidd, T. J., Magalhães, R. J. S., Paynter, S., Bell, S. C., Grimwood, K., Armstrong, D. S., et al. (2015). The social network of cystic fibrosis center care and shared *Pseudomonas aeruginosa* strain infection: A cross-sectional analysis. *Lancet Respir. Med.* 3, 640–650. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00228-3
- Kidd, T. J., Ritchie, S. R., Ramsay, K. A., Grimwood, K., Bell, S. C., and Rainey, P. B. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* exhibits frequent recombination, but only a limited association between genotype and ecological setting. *PLoS ONE* 7:e44199. doi: 10.1371/journal.pone.0044199
- Klockgether, J., Würdemann, D., Reva, O., Wiehlmann, L., and Tümmler, B. (2007). Diversity of the abundant pKLC102/PAGI-2 family of genomic islands in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 189, 2443–2459. doi: 10.1128/JB.01688-06
- Kos, V. N., Déraspe, M., McLaughlin, R. E., Whiteajer, J. D., Roy, P. H., Alm, R. A., et al. (2014). The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 427–436. doi: 10.1128/AAC.03954-14
- Kulasekara, B. R., Kulasekara, H. D., Wolfgang, M. C., Stevens, L., Frank, D. W., and Lory, S. (2006). Acquisition and evolution of the *exoU* locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188, 4037–4050. doi: 10.1128/JB.02000-05
- Kurahashi, K., Kajikawa, O., Sawa, T., Ohara, M., Gropper, M. A., Frank, D. W., et al. (1999). Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J. Clin. Invest.* 104, 743–750. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00228-3
- Kus, J. V., Tullis, E., Cvitkovitch, D. G., and Burrows, L. L. (2004). Significant differences in type IV pilin allele distribution among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis (CF) versus non-CF patients. *Microbiology* 150, 1315–1326. doi: 10.1099/mic.0.26822-0
- Larbig, K. D., Christmann, A., Johann, A., Hartsch, T., Merkl, R., Fritz, H., et al. (2002). Gene islands integrated into tRNA Gly genes confer genome diversity on a *Pseudomonas aeruginosa* clone gene. *J. Bacteriol.* 184, 6665–6680. doi: 10.1128/JB.184.23.6665
- Lee, C., Peters, V., Melefors, O., and Römling, U. (2014). Draft genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* SG17M, an environmental isolate belonging to clone C, prevalent in patients and aquatic habitats. *Genome Announc.* 2, 2009–2010. doi: 10.1128/genomeA.00186-14
- Lee, D. G., Urbach, J. M., Wu, G., Liberati, N. T., Feinbaum, R. L., Miyata, S., et al. (2006). Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.* 7:R90. doi: 10.1186/gb-2006-7-10-r90
- Leone, I., Chirillo, M. G., Raso, T., Zucca, M., and Savoia, D. (2008). Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 1093–1099. doi: 10.1007/s10096-008-0551-1
- Liang, X., Pham, X. Q., Olson, M. V., and Lory, S. (2001). Identification of a genomic island present in the majority of pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 183, 843–853. doi: 10.1128/JB.183.3.843-853.2001
- Liu, S. L., Hessel, A., and Sanderson, K. E. (1993). The *XbaI-BlnI-CeuI* genomic cleavage map of *Salmonella* Typhimurium LT2 determined by double digestion, end labelling, and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 175, 4104–4120. doi: 10.1128/jb.175.13.4104-4120.1993
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L., and Pier, G. B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.* 2, 1051–1060. doi: 10.1016/S1286-4579(00)01259-4
- Maatallah, M., Cheriaa, J., Backhrouf, A., Iversen, A., Grundmann, H., Do, T., et al. (2011). Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. *PLoS ONE* 6:e25617. doi: 10.1371/journal.pone.0025617
- Mac Faddin, J. F. (2000). *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 268–281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- Mahenthalingam, E., Campbell, M. E., and Speert, D. P. (1994). Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic. *Infect. Immun.* 62, 596–605.
- Mena, K. D., and Gerba, C. P. (2009). Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 201, 71–115. doi: 10.1007/978-4419-0032-6_3
- Morales-Espinosa, R., Soberón-Chávez, G., Delgado-Sapién, G., Sandner-Miranda, L., Méndez, J. L., González-Valencia, G., et al. (2012). Genetic and phenotypic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* population with high frequency of genomic islands. *PLoS ONE* 7:e37459. doi: 10.1371/journal.pone.0037459
- Morita, Y., Tomida, J., and Kawamura, Y. (2015). Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate PA7: identification of a novel MexS variant involved in upregulation of the mexEF-oprN multidrug efflux operon. *Front. Microbiol.* 6:8. doi: 10.3389/fmicb.2015.00008
- Mulet, X., Cabot, G., Ocampo-Sosa, A. A., Domínguez, M. A., Zamorano, L., Juan, C., et al. (2013). Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 5527–5535. doi: 10.1128/AAC.01481-13
- Murray, P. A., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C., and Tenover, R. H. (1995). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC: American ASM Press (Society for Microbiology).
- Oliver, A., Canton, R., Campo, P., Baquero, F., Blazquez, J., Cantón, R., et al. (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288, 1251–1253. doi: 10.1126/science.288.5469.1251
- Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C., and Juan, C. (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist. Update* 21–22, 41–59. doi: 10.1016/j.drug.2015.08.002
- Ou, H., Chen, L., Lonnen, J., Chaudhuri, R. R., Thani, A. B., Smith, R., et al. (2006). A novel strategy for the identification of genomic islands by comparative analysis of the contents and contexts of tRNA sites in closely related bacteria. *Nucleic Acids Res.* 34, 1–11. doi: 10.1093/nar/gnj005
- Peña, C., Cabot, G., Gómez-Zorrilla, S., Zamorano, L., Ocampo-Sosa, A., Murillas, J., et al. (2015). Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin. Infect. Dis.* 60, 539–548. doi: 10.1093/cid/ciu866
- Poole, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front. Microbiol.* 2:65. doi: 10.3389/fmicb.2011.00065
- Pronovost, P., Needham, D., Berenholtz, S., Sinopoli, D., Chu, H., Cosgrove, S., et al. (2006). An intervention to decrease catheter-related bloodstream infections in the ICU. *N. Engl. J. Med.* 355, 2725–2735. doi: 10.1056/NEJMoa061115
- Pujol, M., and Limón, E. (2013). Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 31, 108–113. doi: 10.1016/j.eimc.2013.01.001

- Qiu, X., Gurkar, A. U., and Lory, S. (2006). Interstrain transfer of the large pathogenicity island (PAPI-1) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 19830–19835. doi: 10.1073/pnas.0606810104
- Römling, U., Schmidt, K. D., and Tümmler, B. (1997). Large genome rearrangements discovered by the detailed analysis of 21 *Pseudomonas aeruginosa* clone C isolates found in environment and disease habitats. *J. Mol. Biol.* 271, 386–404. doi: 10.1006/jmbi.1997.1186
- Römling, U., Wingender, J., Müller, H., and Tümmler, B. (1994). A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1734–1738.
- Rumbaugh, K. P., Hamood, A. N., and Griswold, J. A. (1999). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates for possible variations within the virulence genes exotoxin A and exoenzyme S. *J. Surg. Res.* 82, 95–105. doi: 10.1006/jsre.1998.5523
- Rybtke, M., Hultqvist, L. D., Givskov, M., and Tolker-Nielsen, T. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response. *J. Mol. Biol.* 427, 3628–3645. doi: 10.1016/j.jmb.2015.08.016
- Schmidt, K. D., Tümmler, B., and Römling, U. (1996). Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats. *J. Bacteriol.* 178, 85–93. doi: 10.1128/jb.178.1.85-93.1996
- Shen, K., Sayeed, S., Antalis, P., Gladitz, J., Ahmed, A., Dice, B., et al. (2006). Extensive genomic plasticity in *Pseudomonas aeruginosa* revealed by identification and distribution studies of novel genes among clinical isolates. *Infect. Immun.* 74, 5272–5283. doi: 10.1128/IAI.00546-06
- Sun, J., and Barbieri, J. T. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT ADP-ribosylates CT10 regulator of kinase (Crk) proteins. *J. Biol. Chem.* 278, 32794–32800. doi: 10.1074/jbc.M304290200
- Sun, Y., Karmakar, M., Taylor, P. R., and 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. doi: 10.4049/jimmunol.1102148
- Thuong, M., Arvaniti, K., Ruimy, R., de la Salmonière, P., Scanvic-Hameg, A., Lucet, J. C., et al. (2003). Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and risk factors for carriage acquisition in an intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 53, 274–282. doi: 10.1053/jhin.2002.1370
- Walker, S. L., Hiremath, L. S., and Galloway, D. R. (1995). ToxR (RegA) activates *E. coli* RNA polymerase to initiate transcription of *Pseudomonas aeruginosa* ToxA. *Gene* 154, 15–21. doi: 10.1016/0378-1119(94)00870-X
- Wick, M. J., Frank, D. W., Storey, D. G., and Iglewski, B. H. (1990). Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Annu. Rev. Microbiol.* 44, 335–363. doi: 10.1146/annurev.mi.44.100190.002003
- Wiehlmann, L., Wagner, G., Cramer, N., Siebert, B., Gudowius, P., Morales, G., et al. (2007). Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 8101–8106. doi: 10.1073/pnas.0609213104
- Witney, A., Gould, K., Pope, C. F., Bolt, F., Stoker, N. G., Cubbon, M. D., et al. (2014). Genome sequencing and characterization of an extensively drug-resistant sequence type 111 serotype O12 hospital outbreak strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 609–6018. doi: 10.1111/1469-0691.12528
- Wolska, K., and Szveda, P. (2009). Genetic features of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Pol. J. Microbiol.* 58, 255–260.
- Woodford, N., Turton, J. F., and Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 736–755. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x
- Woods, D. E. (2004). Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Trends Microbiol.* 12, 437–439. doi: 10.1016/j.tim.2004.08.003
- Yang, M. A., Lee, J., Choi, E. H., and Lee, H. J. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in children over ten consecutive years: analysis of clinical characteristics, risk factors of multi-drug resistance and clinical outcomes. *J. Korean Med. Sci.* 26, 612–618. doi: 10.3346/jkms.2011.26.5.612
- Yetkin, G., Otlu, B., Cicek, A., Kuzucu, C., and Durmaz, R. (2006). Clinical, microbiologic, and epidemiologic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a University Hospital, Malatya, Turkey. *Am. J. Infect. Control.* 34, 188–192. doi: 10.1016/j.ajic.2005.11.010
- Zhang, Q., Smith, J. C., Zhu, Q., Guo, Z., and MacDonald, N. E. (2012). A five-year review of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in children hospitalized at a single center in southern China. *Int. J. Infect. Dis.* 16, e628–e632. doi: 10.1016/j.ijid.2012.03.014

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Morales-Espinosa, Delgado, Espinosa, Isselo, Méndez, Rodríguez, Miranda and Cravioto. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.