



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA

**“CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS PORTADORES DE
CARBAPENEMASAS Y ESTUDIO DEL RESISTOMA DE AISLADOS
CLÍNICOS DE *P. aeruginosa*”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

PRESENTA:
M.C. JESSICA GÓMEZ MARTÍNEZ

ASESORAS DE TESIS:
**D.C. PATRICIA LOZANO ZARAIN
D.C. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA**

PUEBLA, PUEBLA

DICIEMBRE 2023



BUAP

Puebla, Puebla a 28 de noviembre 2022.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este medio a los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Doctorado de la academia **Jessica Gómez Martínez**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:


"Caracterización de plásmidos portadores de carbapenemasas y estudio del resistoma de aislados clínicos de *P. aeruginosa*"


A nuestro juicio, la academia **Jessica Gómez Martínez** puede proceder a la digitación de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"


D.C. Yolanda Sáenz Domínguez


D.C. Manuel Ángel Cevallos Gaos


D.C. Margarita Ma. de la Paz Arce Hernández


Rigoberto Castañeda Lucio


D.C. Cristina González Vázquez

Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@comso.buap.mx

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla** por haberme brindado el espacio y recursos para formarme profesionalmente. Gracias.

Este estudio se realizó con recursos de **Proyectos VIEP 2023**, de su **Programa de Apoyos para la Consolidación de los Cuerpos Académicos** con el proyecto titulado “Estudio del resistoma, moviloma y el papel de las microvesículas de membrana externa en la resistencia a los antibióticos en *Acinetobacter spp* y *Pseudomonas aeruginosa*” (**ID proyecto: 00168**).

Al **Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT)** por la beca otorgada durante el periodo 2019-2023 con número de becario **613250**.

Al **Posgrado en Microbiología** del **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas** y a todos los profesores y su personal por su disponibilidad y apoyo para realizar mis estudios de doctorado y la asistencia a congresos y cursos.

Al **Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad** por abrirme nuevamente sus puertas para que desarrollara este proyecto y ser mi segunda casa durante estos 4 años. Me siento muy orgullosa por haber formado parte de su gran equipo de trabajo.

Al **Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla** quien a través de la **Q.F.B. Guadalupe Jiménez Flores** y el **M.C.M.I. José Luis Gálvez Romero** facilitaron las cepas utilizadas en esta tesis y por todo el apoyo brindado (**No. de proyecto: 188.2018**).

Se agradece a la **Vicerrectoría de Investigación de Estudios de Posgrado** por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Eje IV. Modelo de la Investigación abierta y compartida. Objetivo 13. Formar recursos humanos que impacten positivamente el contexto social y científico como consecuencia de su accionar en una comunidad para lograr una educación desarrollada de la transformación. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2021-2025.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la **D.C. Patricia Lozano Zarain**, por confiar nuevamente en mí y jamás rendirse conmigo durante este proceso. Por todo el esfuerzo, dedicación y empeño que le puso a este proyecto. Gracias por guiarme en todo momento, tenerme paciencia y animarme cuando más lo necesité. Mucho de lo que hoy sé, se lo debo a usted. Gracias.

A la **D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia**, por su apoyo incondicional, por sus siempre tan acertados comentarios, aportaciones y preguntas que me ayudaron durante mi paso por el doctorado. Muchas gracias por todas sus enseñanzas y por codirigir esta tesis.

A la **D.C. Yolanda Sáenz**, por compartirme sus conocimientos y experiencia sobre las *Pseudomonas* y la genómica, sus sugerencias y comentarios enriquecieron significativamente este trabajo de tesis. Gracias.

A la **D.C. Margarita Ma de la Paz**, por las aportaciones y los comentarios brindados que han sido importantes para la realización de esta tesis y para mi formación como profesionista. Gracias.

Al **D.C. Miguel Castañeda Lucio**, por sus sugerencias y consejos que fueron clave para el desarrollo y conclusión de esta tesis. Muchas gracias por su disposición para resolver mis dudas.

Al **D.C. Miguel Ángel Cevallos Gaos**, por su apoyo y disposición para ayudarme a comprender el fascinante y complejo mundo de la genómica. Gracias por sus sugerencias durante el desarrollo de esta tesis.

A la **D.C. Cristina González Vázquez**, por su dedicación y tiempo empleados en la revisión de esta tesis, pero sobre todo por el apoyo brindado en el laboratorio. De verdad muchas gracias.

Siempre estaré agradecida por la oportunidad de aprender de ustedes.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres, **Lino y Magali**, por ser mi apoyo incondicional desde siempre, porque a pesar de no estar cerca físicamente, sé que puedo contar con ustedes. Gracias por tener las palabras correctas en los momentos más difíciles. Ustedes siempre me han impulsado a perseguir mis sueños y jamás rendirme. Los amo infinitamente.

A mi prometido **Yosef**, porque sin su apoyo, palabras de aliento y amor incondicional, esto no hubiera sido posible. Gracias por ser mi inspiración y fortaleza. ¡Por fin nos titulamos del doctorado! Te amo inmensamente.

A mis hermanitas, **Nicole y Rocío**, por ser mi refugio seguro y mis cómplices en todo momento. Mi vida sin ustedes no sería la misma, son mi inspiración. Las amo.

A mis abuelitos **Eulalia y Lino** que siempre me dieron su amor incondicional y que ya no pudieron verme cumplir este paso tan importante. Los extraño todos los días. Los amo hasta el cielo. A mi abuelita **Esperanza** gracias por su amor, su cariño y por estar siempre pendiente de mí. La amo.

A mis tíos **Porfy, Bianca y Carlos** porque siempre han estado presentes en cada paso que doy, brindándome apoyo y amor. Simplemente gracias. Los quiero mucho.

A mis hermanos **Agustín, Ángel y Alejandría**, porque siempre han estado conmigo en los momentos buenos y no tan buenos, porque sé que puedo contar siempre con ustedes. Gracias por ser parte de mi vida. Los quiero muchísimo.

A mis mejores amigas de siempre **Rocío y Natividad**, mis hermanas por elección, porque a pesar de que nos separan miles de kilómetros ustedes siempre han estado en cada etapa de mi vida para echarme porras. Las amo mucho.

A mis compañeritos y hermanitos académicos del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad: **María, Jaime, Yesenia, Alejandra, Verónica, Elsy, Lorena, Brenda, Jorge, Chuy, Luis, Cristian**, por todos los momentos vividos dentro y fuera del laboratorio. Porque esta travesía no hubiera sido tan divertida y amena sin su compañía. Los voy a extrañar muchísimo.

ÍNDICE

	Página
Resumen	1
1. Introducción	3
Infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS).....	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> : Características generales y genoma.....	4
Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	6
Mecanismos de resistencia a antibióticos de <i>P. aeruginosa</i>	8
Resistencia intrínseca.....	8
Resistencia adquirida por mutaciones.....	9
Mutaciones que modifican el sitio blanco del antibiótico.....	10
Mutaciones que reducen la captación de antibióticos.....	10
Mutaciones que sobreexpresan las bombas de expulsión.....	11
Resistencia adquirida a través de transferencia horizontal de genes.....	12
Enzimas Beta-lactamasas.....	12
Clase A (Beta-lactamasas de espectro extendido).....	13
Clase B (Metalo Beta-lactamasas).....	13
Clase C (Cefalosporinasas).....	13
Clase D (Oxacilinasas).....	14
Enzimas modificadoras de aminoglucósidos.....	14
Plásmidos.....	15
Módulo de replicación.....	15
Módulo de estabilidad.....	16
Módulo de transferencia.....	17
Rango de hospedero.....	19
Clasificación de plásmidos.....	19
Otros Elementos Genéticos Móviles.....	21
Fagos-plásmidos.....	21
Elementos Integrativos Conjugativos (ICEs).....	21
Integrones.....	21
Transposones.....	23
2. Antecedentes generales	24
3. Antecedentes específicos	26
4. Justificación	28
5. Objetivos	29
6. Materiales y métodos	31
Cepas de estudio.....	31
Condiciones éticas.....	32
Cepas control.....	32
Búsqueda de genes de resistencia.....	32
Obtención del templado de ADN total por ebullición.....	32
Amplificación de genes de resistencia a antibióticos mediante PCR.....	33
Electroforesis de los productos de PCR.....	35
Purificación de los productos de PCR.....	36
Extracción de ADN plasmídico.....	36
Extracción plasmídica por Kieser.....	36
Caracterización parcial de plásmidos.....	37

<u>Tipificación por amplificación por PCR de MOB con oligonucleótidos degenerados.....</u>	38
<u>Determinación del peso molecular de los plásmidos por PFGE-S1.....</u>	39
<u>Tipificación molecular.....</u>	42
<u>PFGE-SpeI.....</u>	42
<u>Cepas utilizadas para secuenciación masiva para el análisis de plásmidos y genómica comparativa</u>	43
<u> Condiciones de crecimiento y preparación de las cepas.....</u>	44
<u> Extracción de ADN y secuenciación masiva.....</u>	44
<u> Ensamble <i>de novo</i> y anotación de genes.....</u>	45
<u> Análisis bioinformático para el estudio de plásmidos y otros elementos genéticos móviles.....</u>	46
<u> Análisis de fagos.....</u>	47
<u> Análisis comparativo de pPE52IMP y de los plásmidos obtenidos del GenBank.....</u>	47
<u> Análisis filogenético de la replicasa RepA del plásmido pPE52IMP.....</u>	47
<u>Genómica comparativa.....</u>	48
<u> Identificación del MLST.....</u>	49
<u> Análisis del resistoma.....</u>	49
<u> Análisis del viruloma.....</u>	49
<u> Identificación de elementos genéticos móviles/movilizables.....</u>	49
<u>Generación de gráficos, heatmaps y dibujos.....</u>	50
<u>7. Resultados.....</u>	51
<u>Aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</u>	51
<u>Detección de genes de resistencia a antibióticos.....</u>	53
<u>Caracterización parcial de plásmidos de cepas portadoras de carbapenemasas.....</u>	53
<u>Caracterización parcial de plásmidos mediante MOB.....</u>	54
<u>Determinación del número de plásmidos y su peso molecular por PFGE-S1.....</u>	55
<u>Relación clonal de las cepas de <i>P. aeruginosa</i>.....</u>	57
<u>Genómica comparativa de <i>P. aeruginosa</i> aisladas de diferentes nichos ecológicos.....</u>	59
<u> Características generales de los genomas de <i>P. aeruginosa</i>.....</u>	60
<u> Tipificación de secuencias multilocus (MLST).....</u>	63
<u> Comparación genómica de las cepas del hospital regional ISSSTE de Puebla</u>	65
<u> Análisis del pangenoma de las cepas del hospital regional ISSSTE de Puebla</u>	66
<u>y del GenBank.....</u>	
<u> Genes de resistencia a antibióticos.....</u>	71
<u> Mutaciones en genes asociados con la resistencia a antibióticos.....</u>	75
<u> Factores de virulencia.....</u>	77
<u> Moviloma y genes de resistencia asociados a elementos genéticos móviles...</u>	79
<u> Presencia de plásmidos, relaxasas MOB, CRISPR-Cas y proteínas Anti-CRISPR.....</u>	83
<u>Análisis del plásmido pPE52IMP de la cepa PE52.....</u>	85
<u> Análisis comparativo de pPE52IMP y plásmidos con estructuras similares.....</u>	87
<u> Análisis filogenético de RepA de plásmidos portadores de genes de resistencia.....</u>	91
<u>Características de los genomas.....</u>	93
<u>Comparación genómica y MLST.....</u>	93
<u>Análisis de los elementos genéticos móviles/movilizables de las cepas PE21 y PE83</u>	94
<u>Análisis de los elementos genéticos móviles/movilizables de las cepas PE112 y PE197</u>	100

<u>Análisis de los elementos genéticos móviles/movilizables de las cepas PE151 y PE224</u>	105
8. <u>Discusión</u>	108
9. <u>Conclusiones</u>	131
10. <u>Perspectivas</u>	133
11. <u>Bibliografía</u>	133
12. <u>Anexos</u>	158
Actividades desarrolladas durante el doctorado	207

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Mecanismo de A) conjugación y B) movilización de plásmidos	18
2	Estructura de los integrones y proceso de integración de un casete	22
3	Cepas de <i>P. aeruginosa</i> incluidas en cada análisis	43
4A	Servicios de origen de 39 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> del Hospital Regional ISSTE de Puebla	52
4B	Sitios anatómicos de donde fueron recuperados los 39 aislados	52
5	Perfil genotípico de resistencia de las 39 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aisladas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla	53
6	Electroforesis de los plásmidos obtenidos por el método de Kieser de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> portadoras de carbapenemasas provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla	54
7	PFGE-S1 de las cepas provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla	56
8	Determinación de la relación clonal de las cepas portadoras de plásmidos y/o MOB _P del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla	58
9	ST de los genomas de cepas de <i>P. aeruginosa</i> orina (A), de esputo (B) y ambientales (C)	64
10	Comparación genómica de cepas de <i>P. aeruginosa</i> del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla	65
11	Representación gráfica del análisis del pangenoma de las 65 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67
12	Dendrograma basado en la presencia y ausencia del genoma accesorio de las 65 cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	69
13	Árbol filogenético generado a partir de SNPs de genomas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	70
14	Presencia y ausencia de genes de resistencia en genomas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> urinarios, de esputo y ambientales	73
15	Variantes de la familia bla _{OXA-50} de genomas de cepas de <i>P. aeruginosa</i> aisladas de A) Orina, B) Esputo y C) Ambientales	74
16	Resistencia mutacional de los 65 genomas de <i>P. aeruginosa</i> urinarios, de esputo y ambientales	76
17	Presencia y ausencia de genes de virulencia en genomas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	78
18	Elementos genéticos móviles (EGM) que están distribuidos en los 65 genomas de cepas de <i>P. aeruginosa</i> urinarias (A), de esputo (B) y ambientales (C)	80
19	Elementos genéticos móviles portadores de genes de resistencia a beta-lactámicos encontrados en plásmidos de los genomas de <i>P. aeruginosa</i>	81
20	Elementos genéticos móviles portadores de genes de resistencia a beta-lactámicos encontrados en elementos conjugativos integrativos con sistema de secreción de tipo 4 completo en genomas de <i>P. aeruginosa</i>	82
21	Presencia y ausencia de relaxasas MOB, sistemas CRISPR-Cas cromosómicos, sistemas CRISPR-Cas plasmídicos y anti-CRISPR en genomas de <i>P. aeruginosa</i>	84

Continuación índice de figuras...

Figura	Título	Página
22	Estructura del plásmido pPE52IMP de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PE52	86
23	Comparación de la estructura del plásmido pPE52IMP y plásmidos del GenBank con backbones similares	88
24	Comparación de pPE52IMP con plásmidos de otros géneros bacterianos con un esqueleto similar	90
25	Árbol filogenético UPGMA de las proteínas replicasa A en plásmidos portadores de genes de resistencia.	92
26	Comparación genómica de cepas de <i>P. aeruginosa</i>	94
27	Estructura del plásmido pPE21GES de la cepa <i>P. aeruginosa</i> PE21	96
28	Regiones de los fagos presentes en el plásmido pPE21GES	97
29	Estructura del plásmido pPE21IMP de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PE21	98
30	Estructura parcial del megaplásmido parcial de la cepa <i>P. aeruginosa</i> PE83	99
31	Estructura parcial del plásmido de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PE83	100
32	Estructura de los plásmidos pPE112IMP y pPE197IMP de las cepas PE112 y PE197	101
33	Estructura de la ICE putativa presente en las cepas PE112 y PE197	102
34	Estructura del fago-plásmido de las cepas PE112 y PE197	103
35	Comparación de la secuencia del fago-plásmido de las cepas PE112 y PE197 y los fagos A) H70, B) bacteriophage sp, C) P1 y D) Punavirus P1	104
36	Localización cromosómica de <i>bla</i> _{IMP-99} presente en las cepas PE151 y PE224	105
37	Estructura del plásmido tipo Incl de las cepas PE151 y PE224	106
38	Estructura de los plásmidos integrados al cromosoma de pPE151IMP y pPE224IMP	107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Comparación de los sistemas de clasificación de beta-lactamasas	12
2	Características de las cepas PE21, PE52, PE63 y PE83	31
3	Cepas control	32
4	Componentes para una reacción de PCR	33
5	Oligonucleótidos para amplificar por PCR los genes de resistencia a beta-lactámicos	34
6	Oligonucleótidos para amplificar por PCR los genes de resistencia a beta-lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas	35
7	Programas para el análisis de las secuencias de los genes secuenciados	36
8	Oligonucleótidos de las subfamilias MOB y condiciones de PCR	38
9	Condiciones del corrimiento electroforético de la PFGE-S1	41
10	Tipo de relaxasas MOB encontradas en las cepas portadoras y no portadoras de plásmidos del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla	55
11	Características de cepas de <i>P. aeruginosa</i> portadoras de plásmidos del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla	56
12	Características generales de los ensamblados <i>de novo</i> de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PE21, PE52, PE63 y PE83	59
13	Características generales de los genomas de <i>P. aeruginosa</i> incluidos en este estudio	60
14	Características de los plásmidos de <i>P. aeruginosa</i> del GenBank con estructura similar a pPE52IMP	87
15	Características de los plásmidos de otros géneros bacterianos del GenBank con <i>backbone</i> similar a pPE52IMP	89

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gramnegativo que tiene la capacidad de adaptarse y sobrevivir a diversos ambientes. Es un patógeno de importancia clínica, especialmente en infecciones asociadas a la atención de la salud debido a su capacidad de desarrollar resistencia a múltiples antibióticos, incluyendo carbapenémicos, ya sea mediante mutaciones cromosómicas o por la adquisición de genes por transferencia horizontal. El objetivo de este estudio fue caracterizar plásmidos portadores de carbapenemasas y estudiar el resistoma de aislados clínicos de *P. aeruginosa*. Se realizó la identificación de genes de resistencia mediante PCR y secuenciación (Sanger); la extracción de plásmidos mediante el método de lisis alcalina (Kieser); la tipificación mediante amplificación por PCR de relaxasas (MOB); y la determinación del peso molecular y número de plásmidos por electroforesis de campos pulsados (PFGE-S1); secuenciación masiva con Illumina y/o minION de 8 cepas de interés. El análisis bioinformático se realizó con SPAdes, Unicycler, RAST, Prokka, MLST 2.0, Roary, Parsnp, ResFinder 4.1, Clustal Omega, ICEberg, MGEfinder, VFDB, PHASTER, Rstudio y Proksee. Se analizaron un total de 64 cepas de *P. aeruginosa* mutidrogorresistentes- y resistentes a carbapenémicos. De las cuales 21 cepas provenían del Hospital para el niño poblano y 43 provenientes de pacientes del Hospital I.S.S.S.T.E de Puebla. A las 21 cepas del hospital para el niño poblano se le buscaron genes de resistencia mediante PCR pero no se encontró ninguno.

Por otro lado, de los 43 aislados del Hospital I.S.S.S.T.E de Puebla, 4 cepas fueron parcialmente estudiadas en un estudio previo (PE21, PE52, PE63 y PE83). De las 39 cepas restantes, 17 portaron *bla*_{IMP}, 23 portaron *bla*_{GES}, 1 cepa portó *bla*_{VIM}, 39 portaron *bla*_{OXA-50} y 36 portaron *aac(6')-Ib*. De las cepas portadoras de *bla*_{IMP} y/o *bla*_{GES}, 10 cepas presentaron de 1 a 2 plásmidos con tamaños que van desde 27 hasta 126 kb aproximadamente y con relaxasas *MOB*_{H2}, *MOB*_{P11} y *MOB*_{P14}. Mediante PFGE se detectaron 12 pulsotipos y las cepas se agruparon en 4 principales clados. Se seleccionó una cepa de cada clado para secuenciar su genoma completo (PE112, PE197, PE151 y PE224).

Para el análisis de genómica comparativa, se incluyeron los genomas de las cepas PE52, PE63 y PE83 (tracto urinario) y PE21 (esputo), 59 genomas completos de cepas de orina, esputo (de pacientes sin fibrosis quística) y ambientales. El análisis filogenético mostró que los genomas se agrupaban según su secuencia tipo (ST) y no según su nicho ecológico, destacando los ST235 y ST773 en genomas de cepas clínicas y ST27 en genomas de ambientales y las cepas del hospital de Puebla pertenecían a ST167, ST2731 y ST549. Sin embargo, presentaron diferencias en los genes de resistencia y virulencia de acuerdo con el nicho. Destacando la presencia de genes involucrados en la adaptación al medio ambiente en los genomas ambientales y la presencia de mutaciones de genes relacionados a la

resistencia a los antibióticos, en contraste con los genomas clínicos que no portan esos genes de adaptación y portan en su mayoría genes de resistencia acarreados en elementos genéticos móviles y movilizables presentes en el cromosoma. En el caso del viruloma se muestra la presencia de *exoS* en genomas urinarios y *exoU* y *pIdA* en esputo. El pangenoma estaba formado de 20,911 genes, de los cuales 4,246 eran genes *core*, 898 genes del *soft-core*, 1,709 genes *shell* y 14,058 eran genes *cloud*. Se relacionó la presencia de CRISPR-Cas y anti-CRISPR con la presencia de plásmidos y observamos que las cepas de Puebla tenían plásmidos y CRISPR-Cas.

Por otro lado, se analizó la presencia de elementos genéticos móviles en las cepas PE21, PE52, PE83, PE112, PE151, PE197 y PE224. Encontrando el plásmido pPE52IMP en la cepa PE52 con un tamaño de 27 kb, que portaba *bla*_{IMP-56} y *MOB*_{P11}. El análisis filogenético de RepA de los plásmidos reveló que pPE52IMP y cuatro plásmidos del GenBank estaban en el mismo clado y tenían *backbones* similares, probablemente formando una nueva familia de plásmidos. El análisis de la presencia de plásmidos de un hospital poblano reveló que una misma cepa poseía plásmidos, megaplásmidos y/o plásmidos integrados en el cromosoma portando diferentes genes de resistencia y la presencia de un fago-plásmido extracromosómico en dos cepas.

Este estudio resalta la variabilidad del contenido genético (resistencia, virulencia y elementos genéticos móviles) entre aislados de *P. aeruginosa* de diferentes nichos, aunque estas se agrupan de acuerdo con su ST. Las cepas poblanas mostraron la presencia de plásmidos, plásmidos integrados portadores de genes de resistencia y fagos-plásmidos. Además, se describe la presencia de un plásmido presente en diferentes cepas del hospital poblano el cual pertenece a una nueva familia plásmidos que acarrear genes de resistencia descrita en este trabajo.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, genes de resistencia antimicrobiana, plásmidos, elementos genéticos móviles, genómica comparativa.

1. INTRODUCCIÓN

Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS)

Las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) (llamadas anteriormente infecciones nosocomiales) son infecciones adquiridas por los pacientes mientras reciben atención médica y que aparecen 48 h después de la hospitalización o dentro de los 30 días posteriores de haber recibido atención médica (Haque *et al.*, 2018). Anteriormente, el término se refería a aquellas infecciones adquiridas solamente en los hospitales. Sin embargo, ahora incluye infecciones desarrolladas en entornos donde los pacientes reciben atención médica, como las clínicas de medicina familiar, atención domiciliaria y atención ambulatoria (Haque *et al.*, 2018). Existen diversos factores de riesgo asociados a las IAAS, que incluyen el uso y mantenimiento de dispositivos médicos, como catéteres y ventiladores, así como complicaciones postquirúrgicas, transmisión entre pacientes y trabajadores de la salud, sistemas de aires acondicionados contaminados, entre otras (Almeida, 2015).

En México, durante el año 2022, se notificaron a la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) un total de 56,856 IAAS. Aunque cabe mencionar que el número de casos es un indicador bruto y no representa la situación epidemiológica de las IAAS en México en su totalidad, sino que es el resultado de la vigilancia epidemiológica activa de 363 unidades de 2do y 3er nivel del sistema centinela. De las 56,856 IAAS, la Ciudad de México notificó 12,273 casos, siendo la entidad federativa con el mayor número de reportes. En cambio, Puebla ocupó el 6to lugar con un total de 2,085 casos reportados (RHOVE, 2022).

Las IAAS pueden ser causadas por bacterias, hongos, virus y otros tipos de patógenos menos comunes (Almeida, 2015). Entre las bacterias que más frecuentemente causan IAAS se encuentran los estafilococos coagulasa negativos, las especies de enterococos, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Acinetobacter* (de la Rosa-Zamboni *et al.*, 2023). Sin embargo, en el año 2022, la RHOVE reportó a *P. aeruginosa* como el segundo microorganismo más aislado de IAAS en México (RHOVE, 2022). Las infecciones causadas por este

microorganismo se asocian a una elevada morbilidad y mortalidad en personas con neumonía asociada a ventilación mecánica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística (FQ), infecciones urinarias, de herida y quemaduras (Jurado-Martín *et al.*, 2021).

***Pseudomonas aeruginosa*:**

Características generales y genoma

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo, ubicuo, capaz de sobrevivir en diversos nichos ecológicos debido a su versatilidad metabólica (Botelho *et al.*, 2019). Pertenece al grupo de patógenos "ESKAPE" (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* y especies de *Enterobacter*), denominados así debido a su capacidad para "escapar" de la acción de los antimicrobianos (Botelho *et al.*, 2019).

Existen 8 familias de antibióticos que frecuentemente se emplean para tratar infecciones causadas por *P. aeruginosa*, que incluyen aminoglucósidos (gentamicina, amikacina, netilmicina, tobramicina), cefalosporinas (ceftazidima, cefepime), fluoroquinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina), penicilinas con inhibidores de la beta-lactamasas (ticarcilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam), monobactámicos (aztreonam), ácidos fosfónicos (fosfomicina), polimixinas (colistina y polimixina B) y carbapenémicos (imipenem, meropenem, doripenem), siendo estos últimos los utilizados como última elección terapéutica (Botelho *et al.*, 2019). Sin embargo, la acelerada aparición de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a casi todos los antibióticos (incluidos los carbapenémicos), dificulta el tratamiento de las infecciones causadas por este microorganismo (Moradali *et al.*, 2017). Por lo anterior, en el 2017 la Organización Mundial de la Salud incluyó a *P. aeruginosa* en el grupo de patógenos prioritarios de nivel crítico, junto con *Acinetobacter baumannii* y las *Enterobacteriaceae* resistentes a los carbapenémicos (Tacconelli *et al.*, 2018). Por fortuna, recientemente se han introducido nuevos fármacos, dos de los cuales son ceftazidima/avibactam y ceftolozano/tazobactam, que combinan una potente cefalosporina con un inhibidor de beta-lactamasas, aunque su eficacia se limita a aislados resistentes a

carbapenémicos no productores de carbapenemasas (Contreras-Gómez *et al.*, 2022). Por otro lado, el imipenem/cilastatina/relebactam tiene espectro ampliado frente a patógenos Gram negativos multirresistentes, incluida *P. aeruginosa* difícil de tratar (O'Donnell & Lodise, 2022), pero carece de actividad contra cepas de *P. aeruginosa* productoras de metalo-beta-lactamasas (NDM, IMP, VIM), beta-lactamasas de espectro extendido (BLEEs) tipo VEB y productoras de carbapenemasas tipo GES (O'Donnell & Lodise, 2022). Por último, el cefidericol, que es una cefalosporina siderófora usada para el tratamiento de infecciones causadas por patógenos resistentes a carbapenémicos productores de metalo-beta-lactamasas (MBL) como IMP, VIM y NDM (Timsit *et al.*, 2022).

P. aeruginosa PAO1 es una cepa de referencia y su genoma fue el primero de este microorganismo en secuenciarse. El tamaño de su genoma es de 6.3 Mpb y comprende de 5,697 genes según la base de datos del GenBank. La implementación de la secuenciación masiva en diversos estudios científicos ha sido fundamental, ya que se ha logrado conocer que el tamaño del genoma de *P. aeruginosa* puede variar entre 5.5 y 7 Mpb, situándolo como uno de los genomas bacterianos más grandes que existe (Sawa *et al.*, 2020). Tiene una estructura de mosaico y está compuesto por el genoma *core* y el genoma accesorio, siendo la suma de estos el llamado pangenoma. El genoma *core* de *P. aeruginosa* es altamente conservado, está conformado por la mayoría de los genes *housekeeping* y se estima que representa aproximadamente el 90% del total de su genoma (Ozer *et al.*, 2014). Por el contrario, el genoma accesorio es muy variable, se adquiere mediante transferencia horizontal y está implicado en la expansión y adaptación de la bacteria (Kung *et al.*, 2010). Los principales componentes del genoma accesorio de *P. aeruginosa* son elementos integrativos y conjugativos (ICE), profagos y elementos similares a fagos, transposones, secuencias de inserción, integrones y plásmidos (Ozer *et al.*, 2014).

Debido a que el genoma *core* disminuye su tamaño conforme más genomas se agregan al análisis, se han propuesto definiciones basadas en la persistencia de los genes en el genoma. El pangenoma se dividió en 4 clases: 1) genoma *core* para la

familia de genes persistente en el 99 a 100% de los genomas, 2) *soft-core*, para los genes presentes en el 95 al 99% de los genomas, 3) genoma *Shell*, para los genes presentes en el 15 al 95% de los genomas y 4) genoma *cloud*, para los genes presentes en el 0 al 15% de los genomas (Collins & Higgs, 2012).

Factores de virulencia de *P. aeruginosa*

La persistencia de *P. aeruginosa* también está relacionada con su virulencia. Esto último como resultado de la producción de una amplia variedad de factores de virulencia, entre los que se encuentran el lipopolisacárido, pili tipo IV, elastasa (LasA, LasB), varias exotoxinas (ExoY, ExoS, ExoT, ExoU), proteasa alcalina, fosfolipasas, pequeñas moléculas (fenazinas, ramnolípidos y cianuro) y sideróforos (pioverdina y pioquelina) (Shehabi & Kamal, 2019).

P. aeruginosa expresa seis tipos de sistemas de secreción que participan en el transporte de varios factores de virulencia, incluyendo enzimas, exotoxinas y otras proteínas (Verdial *et al.*, 2023). Uno de los más estudiados es el sistema de secreción tipo III (SST3), involucrado en la invasión del hospedero mediante la inyección de toxinas efectoras (ExoT, ExoY, ExoS y ExoU) en el citosol de las células eucariotas (Jouault *et al.*, 2022). Consta de un "inyectosoma" que está compuesto por 1) un aparato de secreción que transporta las toxinas efectoras a través de las membranas bacterianas y 2) un aparato de translocación que traslada las toxinas efectoras a través de la membrana de la célula hospedera (Juan *et al.*, 2017). Entre las proteínas efectoras del SST3 se encuentra ExoS, que es una molécula bifuncional con actividad de proteína activadora de GTPasa (GAP) y de adenosina difosfato ribosil transferasa (ADPRT) (Jouault *et al.*, 2022). Por otro lado, ExoU es una citotoxina con actividad de fosfolipasa A2 y es considerada la efectora más virulenta del SST3, ya que es capaz de causar lisis y necroptosis en células epiteliales, macrófagos y neutrófilos (Foulkes *et al.*, 2019). Estas dos citotoxinas, son mutuamente excluyentes, sin embargo, el número de estudios de *P. aeruginosa* portando el fenotipo *exoU+/exoS+* se está incrementando (Gómez-Martínez *et al.*, 2023; Ozer *et al.*, 2019; Horna *et al.*, 2019; Morales-Espinosa *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2023; Yi *et al.*, 2021). Recientemente se examinó el potencial patogénico de

cepas de *P. aeruginosa* portando ambas citotoxinas y se demostró *in vitro* e *in vivo* que las cepas *exoU+*/*exoS+* eran más virulentas en comparación con PAO1 y que la citotoxina ExoU contribuye en el potencial de virulencia de *P. aeruginosa* (Song *et al.*, 2023). ExoT al igual que ExoS, es una molécula bifuncional con actividad de proteína activadora de GTPasa en su N-terminal y actividad de adenosina difosfato ribosil transferasa (ADPRT) en la región C-terminal (Jouault *et al.*, 2022). Sin embargo, aunque ExoT y ExoS comparten 76% de identidad de secuencia de aminoácidos en sus dominios de ADP-ribosilación, ADP-ribosilan diferentes proteínas del hospedero (Sun & Barbieri, 2003). Por último, ExoY es una adenilil ciclasa que altera el citoesqueleto de actina, inhibe la captación bacteriana por las células hospederas y aumenta la permeabilidad del endotelio (Hauser, 2009).

Los sistemas de secreción restantes juegan diferentes papeles en la virulencia de *P. aeruginosa*. Por ejemplo, el sistema de secreción tipo 1 sirve para la secreción de proteasas, la utilización de hierro y la captación de hemo. El sistema tipo 2 (SST2) secreta varias enzimas líticas. Por su parte el sistema de secreción tipo 4 es el único que no sólo transporta proteínas sino también ácidos nucleicos. El sistema de secreción tipo 5 está relacionado con la secreción de proteínas relacionadas con la formación de *biofilm* y la adhesión. Por último, el sistema de secreción tipo 6 está involucrado en la liberación de toxinas a las bacterias vecinas, la translocación de efectores a células hospederas y la formación de *biofilm* (Liao *et al.*, 2022). Particularmente, los pili tipo IV utilizan una versión modificada del SST2 para su biogénesis y juegan un papel en la motilidad *twitching* y *swarming*, la adhesión a superficies, la formación de *biofilm* y la agregación célula-célula (Leighton *et al.*, 2015).

P. aeruginosa también produce otras toxinas, como la exotoxina A que se secreta por un SST2 que inhibe la síntesis de proteínas e induce la muerte celular programada. También la fosfolipasa C (PLC) no hemolítica y hemolítica, esta última capaz de inducir permeabilidad vascular, daño orgánico y muerte celular. Por otro lado, la exolisina ExlA que induce la permeabilización de la membrana plasmática, lo cual provoca la muerte celular necrótica; y, por último, la piocianina que es un

metabolito secundario de color azul con actividad redox capaz de producir citotoxicidad en el hospedero (Liao *et al.*, 2022).

Otros factores de virulencia de gran importancia en *P. aeruginosa*, son la proteasa alcalina que inhibe la activación del complemento, la fagocitosis por neutrófilos y la fibronectina. Por otro lado, las elastasas LasA y LasB que degradan las proteínas de los tejidos del hospedero, causando daños tisulares (Al-Wrafy *et al.*, 2017).

Mecanismos de resistencia a antibióticos de *P. aeruginosa*

La resistencia a diferentes antimicrobianos se debe a dos tipos de resistencia: 1) resistencia intrínseca y 2) resistencia adquirida.

Resistencia intrínseca

P. aeruginosa tiene alta resistencia intrínseca a una amplia variedad de antibióticos que incluyen los aminoglucósidos, fluoroquinolonas y beta-lactámicos (Breidenstein *et al.*, 2011). Este tipo de resistencia está codificada en el genoma *core*, como la baja permeabilidad de la membrana externa, la producción de beta-lactamasas AmpC y *bla*_{OXA-50} y la bomba de eflujo MexAB-OprM expresada constitutivamente en este microorganismo (Botelho *et al.*, 2019).

AmpC es una cefalosporinasa que se produce constitutivamente a niveles basales en *P. aeruginosa* y le confiere resistencia a aminopenicilinas (Lister *et al.*, 2009). Sin embargo, también puede ser inducible debido a la exposición a una serie de antibióticos beta-lactámicos (por ejemplo, bencilpenicilina y cefalosporinas de espectro estrecho) y, por lo tanto, contribuir a la resistencia intrínseca a estos antibióticos (Poole, 2011). Por otro lado, OXA-50 es una oxacilinasasa de clase D que se encuentra de manera natural en todas las cepas de *P. aeruginosa*; su espectro de hidrólisis es estrecho e incluye a antibióticos como ampicilina, bencilpenicilina, cefaloridina, cefalotina, nitrocefina y piperacilina, y de forma infrecuente hidroliza imipenem a un nivel bajo (Girlich *et al.*, 2004). Por último, la bomba de eflujo MexAB-OprM que se expresa constitutivamente y confiere resistencia basal a una amplia gama de antibióticos como los beta-lactámicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas,

macrólidos, cloranfenicol, novobiocina y trimetoprim con sulfametoxazol (Llanes *et al.*, 2004).

Resistencia adquirida por mutaciones

La resistencia adquirida es debida a mutaciones en el ADN cromosómico o por la adquisición de ADN extraño a través de la transferencia horizontal de genes. Por otro lado, los mecanismos de resistencia intrínsecos pueden potenciarse al adquirir mutaciones. Ejemplos de esto son algunas variantes de la familia OXA-50-like, tales como las enzimas OXA-488 y OXA-494 que varían por dos sustituciones de aminoácidos con respecto a OXA-50 (Thr16Ala/Gln25Arg y Asp109Glu/Arg167His, respectivamente) (Streling *et al.*, 2022); debido a esas sustituciones, OXA-488 es tres veces más eficaz hidrolizando la bencilpenicilina y dos veces más eficaz hidrolizando el imipenem y, OXA-494 tiene mayor actividad frente a la ticarcilina y oxacilina (Streling *et al.*, 2022). Por otro lado, aunque la sobreexpresión de AmpC puede ser por inducción, también puede sobreexpresarse de manera constitutiva debido a mutaciones en *ampR* (factor de transcripción) y *ampD* (amidasa citosólica) que causan la desrepresión de AmpC (Lister *et al.*, 2009), dando como resultado, resistencia hacia cefalosporinas de espectro extendido (como ceftazidime) y penicilinas (como ticarcilina) (Poole, 2011).

Otras mutaciones cromosómicas que dan lugar a resistencia a los antimicrobianos son aquellas que modifican el sitio blanco del antibiótico (ejemplo: mutaciones en los genes *gyrA*, *gyrB*, *parA*, *parC* reducen la afinidad de las fluoroquinolonas), reducen la captación de antibióticos (como la pérdida o alteración de la porina OprD) y sobreexpresan bombas de expulsión (por mutaciones en el represor *mexR* de la bomba MexAB-OprM, el regulador negativo *nfxB* de la bomba de eflujo mexCD-oprJ, el regulador *mexZ* de la bomba MexXY-OprM) (Henrichfreise *et al.*, 2007; Rossolini *et al.*, 2017).

- *Mutaciones que modifican el sitio blanco del antibiótico*

Las dianas de las fluoroquinolonas son las topoisomerasas (ADN girasa y topoisomerasa IV), responsables de superenrollar el ADN lo que permite su empaquetamiento en la célula bacteriana (Kumar, 2017). La ADN girasa, está compuesta de dos subunidades (GyrA y GyrB), codificadas por los genes *gyrA* y *gyrB*, respectivamente. Por otro lado, la topoisomerasa IV también se compone de dos subunidades (ParC y ParE), codificadas por los genes *parC* y *parE*, respectivamente (Akasaka *et al.*, 2001). Uno de los mecanismos responsables de la resistencia a fluoroquinolonas, son las mutaciones sin sentido en las llamadas Regiones Determinantes de la Resistencia a las Quinolonas (QRDR) en las subunidades de la ADN girasa y la topoisomerasa IV, las cuales disminuyen la afinidad de unión de las quinolonas a sus respectivos blancos farmacológicos (López-Causapé *et al.*, 2018). Algunas de estas mutaciones reportadas son G81D, T83A, T83I, Y86N, D87G, D87N, D87Y, Q106L en GyrA; S466F, S466Y, Q467R, E468D en GyrB; S87L, S87W en ParC y S457G, S457T, E459D, E459K en ParE (López-Causapé *et al.*, 2018).

- *Mutaciones que reducen la captación de antibióticos*

OprD actúa como un canal específico para aminoácidos básicos, algunos péptidos pequeños y antibióticos carbapenémicos (imipenem y meropenem) (Li *et al.*, 2012). Su estructura consta de un β -barril de 18 hebras que forman nueve loops (L1 a L9), de los cuales el L2 y L3 están asociados con la unión y el paso del imipenem (Li *et al.*, 2012; Shu *et al.*, 2017). Se ha demostrado que la resistencia a los carbapenémicos puede deberse a la disminución de la expresión transcripcional de *oprD* o la inactivación de esta porina a través de un desplazamiento de marco de lectura por mutaciones, inserciones/delecciones y/o un codón de paro prematuro (Shu *et al.*, 2017). Por el contrario, se han reportado que delecciones en la secuencia *oprD* pueden generar el loop L7-corto, que se asocia con el fenotipo de susceptibilidad a meropenem (González-Vázquez *et al.*, 2021).

- *Mutaciones que sobreexpresan las bombas de expulsión*

Existen seis familias de bombas de eflujo que expulsan múltiples fármacos: la familia *Small Multidrug Resistance* (SMR), la *superfamilia Major Facilitator* (MFS), la familia *Resistance/Nodulation/Cell division* (RND), la *ATP-binding Cassette* (ABC), la familia *Multidrug and Toxic compound Extrusion* (MATE), y la familia recientemente descrita *Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux* (PACE) (Lorusso *et al.*, 2022). Sin embargo, las bombas de eflujo de la familia RND son las que contribuyen más significativamente a la resistencia antimicrobiana de *P. aeruginosa* (Poole, 2011). Los miembros que pertenecen a esta familia son las bombas de eflujo MexAB-OprM, MexXY, MexCD-OprJ y MexEF-OprN y, son un sistema tripartito compuesto por un transportador de membrana interna (MexB, MexY, MexD y MexF), un canal de membrana externa (OprM, OprJ y OprN) y una proteína adaptadora periplásmica (MexA, MexX, MexC y MexE) (Daury *et al.*, 2016).

Las mutaciones en los genes reguladores *mexR*, *nalC* o *nalD* pueden ser responsables de la sobreexpresión de la bomba MexAB-OprM y se asocian a la resistencia de la mayoría de los antibióticos antipseudomónicos, excepto colistina; mientras que la sobreexpresión de MexXY es causada por mutaciones en los genes *mexZ*, *parSR* y *amgS* y afecta la resistencia a cefepime, fluoroquinolonas y aminoglucósidos (Guénard *et al.*, 2014; López-Causapé *et al.*, 2018).

Varias mutaciones en el represor *nfxB* se han asociado con un incremento en la expresión de la bomba MexCD-OprJ, lo cual provoca cepas resistentes a fluoroquinolonas (levofloxacino y ciprofloxacino), cloranfenicol, tetraciclina y cefalosporinas de segunda generación (Li *et al.*, 2000). Además, las mutaciones en *mexD* pueden cambiar la especificidad del sustrato de esta bomba de expulsión, lo cual se ha asociado con la resistencia a la carbenicilina, ceftolozano-tazobactam y ceftazidima-avibactam (Lorusso *et al.*, 2022). Por otro lado, las mutaciones en el regulador *nfxC* causan la sobreexpresión de la bomba MexEF-OprN y resistencia a quinolonas, cloranfenicol y trimetoprim (Li *et al.*, 2000). Además, estas mutaciones en *nfxC* también causan menor susceptibilidad a los carbapenémicos, relacionada a la reducción de la expresión del gen *oprD* (Richardot *et al.*, 2016).

Resistencia adquirida a través de transferencia horizontal de genes

Por otro lado, la resistencia adquirida también se produce a través de la transferencia horizontal de genes de resistencia, como los que codifican beta-lactamasas y enzimas modificadoras de aminoglucósidos, a través de elementos genéticos móviles/movilizables (Mohanty *et al.*, 2020).

- Enzimas Beta-lactamasas

Existen dos esquemas para clasificar las beta-lactamasas: el de Ambler que usa la homología de la secuencia de aminoácidos y el de Bush-Jacoby que está basado en los perfiles de hidrólisis del sustrato, es decir, qué clase de beta-lactámicos degradan y el grado en que la actividad disminuye por el inhibidor de beta-lactamasas (Tabla 1) (Bush & Jacoby, 2010).

Tabla 1. Comparación de los sistemas de clasificación de beta-lactamasas.

Bush-Jacoby	Ambler	Sustratos	Inhibidos por EDTA	Inhibidas por ácido clavulánico o tazobactam
1	Clase C	Cefalosporinas Cefaminasas	(-)	No
2	Clase A	Penicilinas Cefalosporinas	(-)	Si
2a				Si
2b				Si
2be				Si
2br				No
2ber				No
2ce				Si
2d	Clase D	Penicilinas Cefalosporinas Carbapenémicos	(-)	Variable
2de				
2df				
2e				Si
2f				Variable
3	Clase B	Carbapenémicos	(+)	No
3a	B1			
3b	B2			
3a	B3			

Tomado de Bonomo, 2017

La clasificación estructural de Ambler comprende cuatro clases moleculares: A) las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) que son inhibidas por el ácido clavulánico, B) las metalo-beta-lactamasas (MBL), C) las cefalosporinas (AmpC)

y D) las oxacilinasas (OXA). Las clases A, C y D tienen serina en el centro activo, mientras que las MBL tienen uno o dos cationes divalentes de Zn^{2+} (Tabla 1) (Meletis *et al.*, 2012).

- *Clase A (Beta-lactamasas de espectro extendido)*

Las beta-lactamasas de espectro extendido de clase A hidrolizan cefalosporinas de amplio espectro como cefotaxima y ceftazidima, aztreonam, penicilinas y cefalosporinas de espectro estrecho (Poole, 2011). Dentro de este grupo se encuentran las enzimas tipo SHV, TEM, PER, VEB, GES, IBC, KPC, entre otras (Lee *et al.*, 2005). Aunque cabe mencionar que las enzimas tipo SHV, TEM, KPC y GES, son las beta-lactamasas de clase A adquiridas horizontalmente más prevalentes en *P. aeruginosa* (Glen & Lamont, 2021).

Algunas hidrolizan antibióticos carbapenémicos como *bla*_{KPC-2} y otras variantes han ampliado su espectro como *bla*_{GES-2}, *bla*_{GES-5}, *bla*_{GES-6}, *bla*_{GES-20} (Halat & Moubareck, 2022; Villegas *et al.*, 2007).

- *Clase B (Metallo beta-lactamasas)*

Las metalo-beta-lactamasas son metaloproteínas dependientes de Zn(II) capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos e incluso inhibidores de beta-lactamasas como ácido clavulánico y sulbactam, pero son inhibidas por quelantes de metales como el EDTA (Bahr *et al.*, 2021). Dado que las metalo-beta-lactamasas son muy divergentes en secuencia, ligandos metálicos en el sitio activo y estequiometría del Zn(II), se han dividido en tres subclases: B1 que son activas con 2 iones metálicos, B2 que son activas en su forma mono-Zn(II) y B3 que son binucleares (López *et al.*, 2022). Se han identificado varios tipos de MBL, como IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, DIM, AIM, FIM y NDM, siendo las enzimas tipo VIM e IMP las que más comúnmente se encuentran en *P. aeruginosa* (Acharya *et al.*, 2017).

- *Clase C (Cefalosporinasas)*

Además de las mutaciones en *ampR* y *ampD* que sobreexpresan la AmpC cromosómica (mencionado anteriormente), también se han reportado polimorfismos en la secuencia del gen *ampC* (Berrazeg *et al.*, 2015). A estas variantes se les llamó

PDC (*Pseudomonas*-derived cephalosporinases) (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009) y algunas de ellas como PDC-2, PDC-3, PDC-4, o PDC-5 muestran susceptibilidad reducida para todos los beta-lactámicos, incluyendo ceftazidima, cefepima, cefpirome, aztreonam, imipenem, y meropenem, en comparación con PDC-1 (la PDC de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1) (Halat & Moubareck, 2022).

De igual manera, se han descrito beta-lactamasas clase C transferibles por elementos genéticos móviles que tienen actividad contra penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos; FOX y CMY-2 son algunas de las que se han encontrado en plásmidos de *P. aeruginosa* (Glen & Lamont, 2021).

- *Clase D (Oxacilinasas)*

A este grupo de beta-lactamasas se les dio el nombre de oxacilinasas debido a que tenían actividad hidrolizante hacia oxacilina y cloxacilina (Kong *et al.*, 2005). No obstante, se ha observado que algunas variantes recientes inactivan con menor eficacia a estos dos antibióticos, pero todas hidrolizan amino y carboxipenicilinas (Sawa *et al.*, 2020). Esta clase de enzimas no las inhibe el ácido clavulánico, el tazobactam y el sulbactam, pero pueden inhibirse *in vitro* por cloruro de sodio (NaCl) (Bonomo, 2017).

En *P. aeruginosa* se han encontrado las variantes OXA-2, OXA-10, OXA-5, OXA-46, OXA-11 y OXA-18. Y otras con actividad carbapenemasa como OXA-40, OXA-198, OXA-48, y OXA-181 (El Garch *et al.*, 2011; Yoon & Jeong, 2021).

Enzimas modificadoras de aminoglucósidos

El mecanismo más común de resistencia a aminoglucósidos es la modificación química por enzimas modificadoras de aminoglucósidos (Garneau-Tsodikova & Labby, 2016). Basado en el tipo de modificación química, pueden dividirse en 3 clases: aminoglucósido fosforiltransferasas (APHs), aminoglucósidos acetiltransferasas (AACs) y aminoglucósido nucleotidiltransferasas (ANTs) (Poole, 2011). Las más comunes identificadas en *P. aeruginosa* son *aac(6')-Ib*, *aac(3)-IV*, *ant(2'')-Ia* y *aph(3')-Ia* (Zhang *et al.*, 2023) y suelen encontrarse acompañadas

de otros genes de resistencia a otros antibióticos, acarreadas por integrones (Poole, 2011).

Este tipo de beta-lactamasas y enzimas modificadoras de aminoglucósidos son frecuentemente codificadas en plásmidos y/o integrones, transposones, elementos conjugativos integrativos (ICE), islas genómicas, fagos y fagos-plásmidos que les permiten su amplia diseminación en diferentes ambientes.

Plásmidos

Los plásmidos son elementos genéticos circulares extracromosómicos (aunque hay algunos tipos lineares), y capaces de replicarse de forma independiente al cromosoma (Hülter *et al.*, 2017). Tienen una estructura modular, lo que significa que las funciones relacionadas se agrupan en módulo de replicación, módulo de estabilidad, módulo de transferencia y módulo de adaptabilidad (Garcillán-Barcia *et al.*, 2011).

Módulo de replicación

Este módulo está conformado por los genes implicados tanto en la replicación como en el control de número de copias del plásmido (Garcillán-Barcia *et al.*, 2011). La replicación de los plásmidos puede llevarse a cabo por uno de tres mecanismos generales: círculo rodante, desplazamiento de la hebra y mecanismos de tipo theta.

En la replicación por círculo rodante, la proteína Rep se une y corta en el *dso* (del inglés: *double-strand origin*); esto genera un 3'-OH libre lo que permite que la ADN polimerasa III del hospedero inicie la replicación de la hebra líder, posteriormente se recirculariza con una ADN ligasa del hospedero y se forma el primer ADN circular. La síntesis de la hebra rezagada inicia cuando la ARN polimerasa hospedera sintetiza un cebador en el origen *sso* (Del inglés: *Single-strand origin*), posteriormente la ADN polimerasa III sintetiza la hebra hermana, y al final una ligasa del hospedero une los extremos de la hebra. El producto final son 2 moléculas de ADN circular de doble hebra (Ruiz-Masó *et al.*, 2015).

Replicación theta: Se le da este nombre debido a que cuando la replicación comienza, se abren las dos hebras de ADN en el *ori* y se crea una estructura que se ve como la letra griega “theta” (θ) (Lilly & Camps, 2015). Según su modo de iniciar la replicación, los replicones de tipo theta se han agrupado en cuatro clases (A, B, C y D). Los replicones theta clase A codifican una proteína Rep que se une al origen y facilita la separación del ADN. Los replicones clase B se caracterizan por carecer de un gen *rep*; en su lugar, la separación de las hebras de ADN y la síntesis del pre-cebador de ARN son realizadas por la ARN polimerasa bacteriana. Los de clase C contienen orígenes de replicación pequeños y codifican una proteína Rep primasa que también facilita el desenrollamiento del ADN. Por último, el funcionamiento de los replicones de clase D requiere la participación de una proteína Rep en la separación del ADN y el procesamiento del cebador (Bardaji *et al.*, 2017).

Para que la replicación por desplazamiento de cadena se lleve a cabo, el plásmido codifica una primasa RepB, una RepC que inicia la replicación y una helicasa RepA. El proceso inicia con RepC interactuando con los *iterones* del origen de replicación y con RepA, que cataliza el desenrollamiento bidireccional del ADN, promoviendo la exposición de los dos sitios *ssi* (repetidas invertidas) en las dos hebras de ADN. Posteriormente, RepB reconoce esos sitios, sintetiza los cebadores y la replicación ocurre en direcciones opuestas desde los dos orígenes. Los productos finales son círculos *singles strand*-desplazados y círculos superenrollados de doble hebra, donde los ssADN pueden contener secuencias *ssi* que se utilizan para iniciar la síntesis de su hebra complementaria (del Solar *et al.*, 1998; Lilly & Camps, 2015).

Módulo de estabilidad

Los plásmidos también tienen mecanismos que aseguran que todas las células hijas reciban y mantengan al menos una copia del plásmido al momento de la división celular. Entre ellos se encuentran: 1) los sistemas de partición, 2) la segregación al azar y 3) la muerte post-segregacional.

-Sistemas de partición. Se componen de tres elementos: un sitio de partición similar a un centrómero actuando en *cis* y dos proteínas denominadas típicamente ParA y ParB (Schumacher, 2007). La proteína ParB se une al sitio similar a centrómero.

Después, múltiples moléculas de ParB se extienden sobre y alrededor del sitio, creando una gran estructura nucleoproteica (complejo de partición). Una vez emparejados los plásmidos con ParB, los complejos de partición son reconocidos por la ATPasa ParA, que impulsa la separación de los plásmidos hacia cada célula (Schumacher, 2007).

Estos sistemas de partición pueden dividirse en 3 clases en función de las propiedades de las ATPasas: los sistemas de tipo I codifican ATPasas Walker, los sistemas de tipo II contienen sitios de unión al ATP similares a la actina eucariota y los sistemas tipo III codifican GTPasas que se asemejan a tubulina (Yano *et al.*, 2018).

-Segregación al azar. La ausencia de sistemas de partición activos en plásmidos de alto número de copias (>15 copias/célula) ha llevado a plantear un modelo de distribución al azar. Este modelo asume la difusión libre de plásmidos a través del citoplasma antes de la división celular, para que cada célula hija reciba al menos un plásmido (Million-Weaver & Camps, 2014).

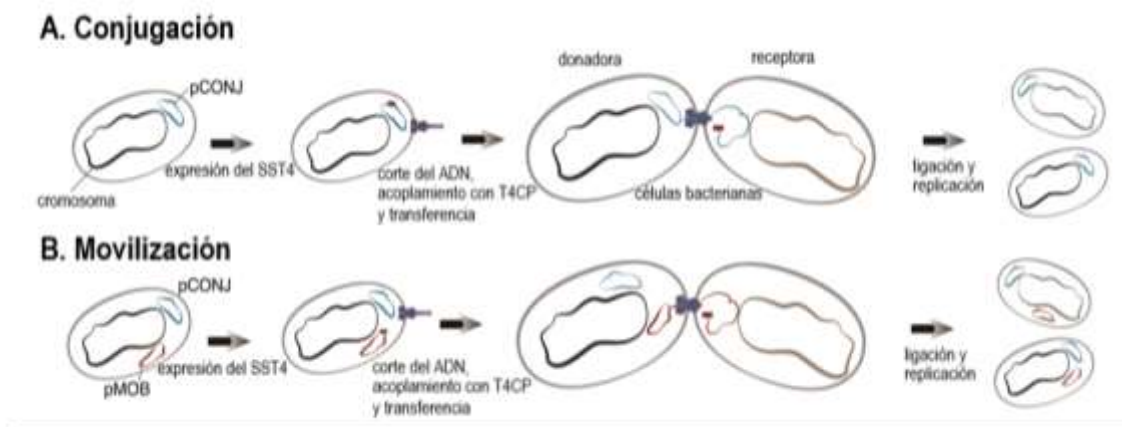
-Muerte post-segregacional. Algunos plásmidos aseguran su mantenimiento en la población a través de sistemas toxina-antitoxina que matan células hijas libres de plásmido. Estos sistemas constan de una toxina estable y una antitoxina lábil presentes en el mismo plásmido. Cuando el plásmido está presente, codifica la antitoxina que se une a la toxina y la inactiva, esto asegura que solamente las células hijas que hereden el plásmido sobrevivan; si por alguna razón el plásmido está ausente en alguna célula hija, la antitoxina inestable es degradada y la toxina estable la mata (Million-Weaver & Camps, 2014; Savari *et al.*, 2016).

Módulo de transferencia

La conjugación es un mecanismo de transferencia horizontal de genes que requiere contacto entre la células donadora y receptora (Dionisio *et al.*, 2019). De acuerdo con este proceso los plásmidos pueden ser categorizados como conjugativos, movilizables y no conjugativos. Los plásmidos conjugativos codifican toda la maquinaria requerida para la conjugación, es decir, un origen de transferencia (*oriT*), una relaxasa que se une al *oriT*, un sistema de secreción tipo 4 (SST4) y una

proteína acopladora tipo 4 (T4CP); si por el contrario sólo codifica relaxasa, *oriT* y/o T4CP se le llama plásmido movilizable y requerirá de un plásmido conjugativo en la misma célula para poder transferirse (Dionisio *et al.*, 2019). Un ejemplo en *Pseudomonas* es la movilización eficaz de los plásmidos IncP-4 por los plásmidos IncP-1 (Thomas & Haines, 2004). Por último, los plásmidos no movilizables no son capaces de transferirse por conjugación, pero sí por otros mecanismos de transferencia horizontal.

El proceso de conjugación consta de dos etapas: en la primera etapa, el ADN se procesa por un set de proteínas MOB y en la segunda etapa el ADN se transporta a través del SST4 (Cabezón *et al.*, 2017). La conjugación inicia por la acción de una relaxasa que rompe la molécula de ADN en el *oriT* y se une covalentemente a una hebra (ssADN) formando un complejo nucleoproteico relaxasa-ssADN. Este complejo se presenta al SST4 por una proteína acopladora tipo 4 (ATPasa) y se transfiere a la célula receptora donde finalmente se recirculariza (Coluzzi *et al.*, 2022).



Tomado de: *Mol Biol Evol*, Volume 39, Issue 6, June 2022. msac115, <https://doi.org/10.1093/molbev/msac115>

Figura 1. Mecanismo de A) conjugación y B) movilización de plásmidos. El proceso se explica en el texto principal. pCONJ significa plásmido conjugativo y pMOB significa plásmido movilizable. Tomado de Coluzzi *et al.*, 2022.

Rango de hospedero

El rango de hospedero de un plásmido se refiere a los diversos microorganismos en los que un plásmido puede replicarse y mantenerse estable (Suzuki *et al.*, 2018). En consecuencia, los plásmidos pueden clasificarse en rango de hospedero estrecho y amplio y hay diversos factores que lo determinan, por ejemplo: 1) la presencia de múltiples orígenes de replicación, 2) inicio de la replicación que no requiera proteínas del hospedero y 3) pocos sitios para enzimas de restricción, porque de esta forma pueden superar fácilmente la barrera de restricción de las células hospederas (Jain & Srivastava, 2013). Algunos ejemplos de plásmidos de amplio rango de hospedero son los que tienen grupo de incompatibilidad IncP-1, IncP-3, IncP-4, IncP-6 (Thomas & Haines, 2004), mientras que plásmidos pertenecientes a IncP-2, IncP-5, IncP-7, IncP-10, IncP-12 e IncP-13 tienen estrecho rango de hospedero y no pueden transferirse de *Pseudomonas* a *Escherichia coli* (*E. coli*) (Dai *et al.*, 2016).

Clasificación de plásmidos

Clasificar a los plásmidos ha sido una tarea ardua que ha ido cambiando a través del tiempo. El primer esquema de clasificación se basó en la incompatibilidad de los plásmidos, la cual se define como la incapacidad que tienen los plásmidos con sistemas de replicación y partición similares, de coexistir en una misma célula hospedera (Shintani *et al.*, 2015). En *P. aeruginosa* se han reconocido un total de 14 grupos de incompatibilidad, que van desde IncP-1 a IncP-14 y algunos de ellos son equivalentes a los definidos en *E. coli*; por ejemplo, IncP-1, IncP-3, IncP-4 e IncP-6 son equivalentes a IncP, IncA/C, IncQ e IncG/U, respectivamente (Yano *et al.*, 2018). Sin embargo, este esquema de tipificación tiene algunas dificultades que impiden su uso de rutina, y años más tarde esta técnica sería reemplazada con éxito por el uso de la tipificación por replicón (PBRT) y tipificación por MOB, que están basados en las funciones de replicación y movilidad del plásmido, respectivamente (Orlek *et al.*, 2017).

La tipificación por replicón primero se basó en la hibridación del ADN utilizando 19 sondas específicas del loci Inc (Couturier *et al.*, 1988) y posteriormente en la PCR. La tipificación por replicón mediante PCR la desarrolló Carattoli *et al.*; y se basa en un conjunto de oligonucleótidos dirigidos a diferentes regiones asociadas con la replicación, incluidos los genes *rep*, iterones y RNAI (HI1, HI2, I1-I, X, L/M, N, FIA, FIB, W, Y, P, FIC, A/C, T, FIIs, FrepB, K, B/O) (Carattoli *et al.*, 2005). Más adelante, García-Fernández *et al.*, 2010 y Villa *et al.*, 2010 añadieron oligonucleótidos para la identificación de otros replicones (FIly, FIik, RepAFII, HI2) (Villa *et al.*, 2010). Finalmente, esta técnica se desarrolló para la detección de replicones *in silico* mediante una base de datos llamada PlasmidFinder, la cual actualmente puede detectar 471 secuencias de replicones plasmídicos: 142 de Enterobacteriaceae y 329 de bacterias Grampositivas (Garcillán-Barcia *et al.*, 2023).

Por otro lado, existe otra clasificación llamada “Degenerate Primer MOB Typing” (DPMT, por sus siglas en inglés) que está basada en la relaxasa (proteínas multidominio cuya actividad relaxasa reside en su dominio N-terminal) de plásmidos de γ -Proteobacterias (Orlek *et al.*, 2017). Para esta clasificación se trazaron las relaciones evolucionarias entre las secuencias de las relaxasas, se detectaron 6 familias MOB (MOB_C, MOB_F, MOB_H, MOB_P, MOB_Q, and MOB_V) y se diseñaron oligonucleótidos degenerados (Alvarado *et al.*, 2012). Cabe recalcar que este método tiene la ventaja de que identifica nuevas relaxasas y clasifica una mayor cantidad de plásmidos en comparación con el método PBRT. Más adelante se desarrollaría un servidor web llamado “MOBscan” (Garcillán-Barcia *et al.*, 2020) para la identificación y clasificación de las relaxasas en 9 clases MOB y, MOB-suite que reúne un set de herramientas para la agrupación y tipificación de plásmidos a partir de ensamblajes de genomas (Robertson *et al.*, 2020).

Las tipificaciones anteriores tienen una aplicación limitada para abarcar y analizar la estructura de la población del plasmidoma, ya que están basadas en sólo un gen del plásmido. Por lo tanto, se desarrolló una clasificación taxonómica de plásmidos llamada unidad taxonómica de plásmidos, o PTUs, basada en métricas de identidad nucleotídica media (ANI, por sus siglas en inglés) (Redondo-Salvo *et al.*, 2020), la

cual está disponible en un servidor web de acceso libre llamado COPLA (Redondo-Salvo *et al.*, 2021).

Otros Elementos Genéticos Móviles

Fagos-plásmidos

Existen otros elementos que pueden encontrarse de manera extra-cromosómica al igual que los plásmidos y son conocidos como Fagos-Plásmidos (Pfeifer *et al.*, 2021). Estos elementos, requieren un gen iniciador de la replicación y un sistema de partición homólogos a los de plásmidos, pero también necesitan genes de fagos temperados, como los involucrados en la lisogenia, lisis, empaquetamiento del ADN y la estructura del virión (Pfeifer & Rocha, 2023). Se ha reportado que algunos de ellos participan en la diseminación de genes de resistencia, como es el caso del fago-plásmido pBH6::Phage BH9 encontrado en *P. aeruginosa* acarreando la carbapenemasa *bla_{KPC-2}* (Galetti *et al.*, 2019).

Elementos Integrativos Conjugativos (ICEs)

Los ICEs presentan dos estados diferentes: un estado integrativo en el que su ADN reside en el cromosoma, y un estado conjugativo en el que su ADN se escinde del cromosoma y puede pasar a otra célula mediante conjugación; estas reacciones de integración y escisión son catalizadas por una integrasa (Delavat *et al.*, 2017). Igual que los plásmidos conjugativos, los ICEs codifican 1) una relaxasa, 2) proteínas del SST4, 3) una proteína acopladora tipo IV y 4) un origen de transferencia (*oriT*) (Johnson & Grossman, 2015). Sin embargo, en contraste a los plásmidos, los ICEs no son capaces de replicarse de manera independiente, sino que se replican con el cromosoma del hospedero (Zakharova & Viktorov, 2015). En *P. aeruginosa* se han encontrado ICEs acarreando genes de resistencia como *crpP* (Botelho *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2021).

Integrones

Los integrones son elementos genéticos que capturan genes exógenos mediante recombinación sitio específica y luego expresan estos genes a partir de un promotor

interno (Ghaly *et al.*, 2021). Tienen tres regiones genéticas distintas, el segmento conservado en el 5' (5'-CS) y el segmento conservado en el 3' (3'-CS), que flanquean la región variable central donde se encuentran los casetes de genes (Domingues *et al.*, 2012). La región 5'-conservada incluye: 1) la integrasa que codifica una tirosina recombinasa (*intI*), 2) el sitio de recombinación (*attI*) que es reconocido por la integrasa y, 3) el promotor (Pc), situado río arriba del sitio de integración, necesario para la transcripción y expresión de los casetes de genes (Domingues *et al.*, 2012). Las secuencias de aminoácidos de las integrasas IntI se han utilizado como base para dividir a los integrones en clases 1, 2, 3, 4, siendo los de clase 1 los más comúnmente relacionados con el acarreamiento y la diseminación de resistencia a antibióticos (Deng *et al.*, 2015). En los integrones de clase 1, la región 3'-conservada es el resultado de una fusión del gen *qacE* del transposón Tn402 con el gen *sul1*, resultando en la delección parcial de *qacE* (*qacE Δ 1*) (Domingues *et al.*, 2012). Por último, la región variable está compuesta de uno o más casetes de genes que consiste en un gen generalmente sin promotor, asociado a un sitio de recombinación denominado *attC* (Richard *et al.*, 2022).

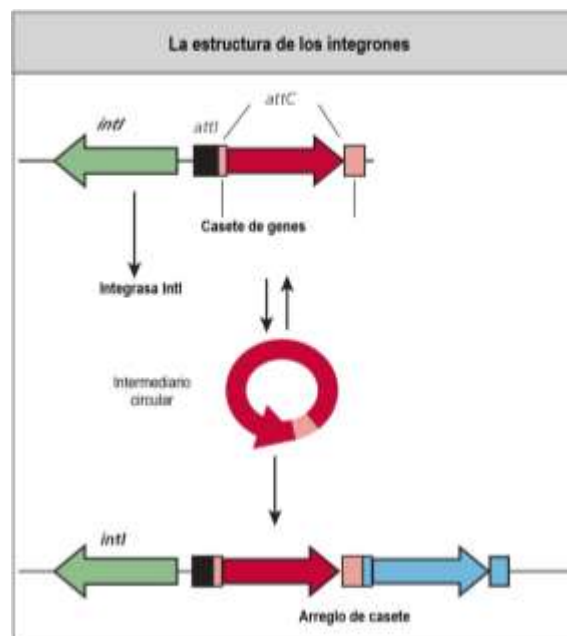


Figura 2. Estructura de los integrones y proceso de integración de un casete. Las flechas verdes representan las integrasas (*intI*), los cuadros negros el sitio de recombinación de la integrasa (*attI*), las flechas rojas y azules representan casetes de genes y los cuadrados rosas representan los sitios de recombinación de los casetes de genes (*attC*). Tomado de Rossolini *et al.*, 2017.

Transposones

Los transposones pueden diseminar genes de resistencia a antibióticos y se dividen en 3 categorías: secuencias de inserción (SIs), transposones compuestos (TnC) y transposones no compuestos (Tn-nC). Los SIs están flanqueados por secuencias repetidas invertidas, los TnC son flanqueados por SIs, en cambio los Tn-nC (también denominados familia Tn3) a diferencia de los TnC no tienen SIs pero son portadores de *tnpA* (transposasa) y *tnpR* (resolvasa) y están flanqueadas por secuencias repetidas invertidas (Babakhani & Oloomi, 2018).

2. ANTECEDENTES GENERALES

Se han reportado cepas de *P. aeruginosa* portadoras de integrones clase 1 y transposones que acarrean genes de resistencia a carbapenémicos (*bla*_{IMP-15}, *bla*_{GES-20}, *bla*_{IMP-18}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-7}) y estos a su vez están movilizados en plásmidos. Sin embargo, la localización de dichos genes sólo pudo observarse mediante Southern blot y su capacidad de transferencia mediante experimentos de conjugación y/o transformación (Balero de Paula *et al.*, 2017; Garza-Ramos, Morfin-Otero, *et al.*, 2008; Garza-Ramos, Tinoco, *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2012).

Gracias al rápido avance de las tecnologías de secuenciación, en las últimas décadas ha aumentado el número de plásmidos completamente secuenciados. El análisis comparativo de secuencias de plásmidos ha permitido comprender mejor la evolución de los plásmidos, su estructura modular y la existencia de puntos calientes para la inserción de genes accesorios. Sin embargo, en comparación con otros géneros bacterianos, es poca la información que se conoce acerca de plásmidos portadores de beta-lactamasas en cepas de *P. aeruginosa*.

Li y colaboradores (2008), secuenciaron el plásmido p07-406 de una cepa de *P. aeruginosa* que tenía un tamaño de 24,179 pb y era portador de un transposón acarreando un integrón con *bla*_{VIM-7}. También se identificaron genes implicados en la conjugación (*trbL*, *trbK*, *trbJ*, *tral*, *traJ*, *traK*), la replicación (*repA*) y la partición (*parC*, *parA*). El plásmido no se transfirió por conjugación bajo las condiciones experimentales que se probaron, pero sí por electroporación (Li *et al.*, 2008).

Por otra parte, Naas y colaboradores (2013), reportaron 2 plásmidos de 2 cepas clínicas de *P. aeruginosa* portadores de *bla*_{KPC-2}. El plásmido pCOL-1 tenía un tamaño de 31,529 pb, perteneciente al grupo de incompatibilidad IncP-6 y tenía genes implicados en la replicación (*repA*-IncP-6, *oriV*), movilización (*mobE*, *mobD*, *mobC*, *mobB*, *mobA*, *oriT*), partición (*parA*, *parB*, *parC*), pero no en la conjugación. Por otro lado, el plásmido pPA-2 fue de menor tamaño (7,995 pb), perteneciente a un grupo de incompatibilidad diferente (IncU) y carente de genes implicados en la movilización, partición y conjugación (Naas *et al.*, 2013).

Bonnin y colaboradores en el 2013 reportaron una cepa clínica de *P. aeruginosa* portadora de *bla*_{VIM-2} insertado en un transposón y que a su vez se encuentra localizado en el plásmido pNOR-2000. Su tamaño era de 21,880 pb y su estructura consta de genes implicados en la replicación (*repA*), conjugación (*traG traD, traC, traA*) y partición (*parA, parB*). Sin embargo, no pudo transferirse a *P. aeruginosa* PU21 mediante conjugación (Bonnin *et al.*, 2013).

Xiong y colaboradores (2013), estudiaron una cepa de *P. aeruginosa* de origen clínico que portaba los genes *bla*_{IMP-9} y *bla*_{OXA-10} en 2 integrones clase 1 acarreados por el plásmido pOZ176. Tenía un tamaño de 500,839 pb, pertenecía al grupo IncP-2 y su estructura constaba de genes implicados en la replicación (*repA*), conjugación (*traF, virD2, traG y trbBCDEJLFGI*) y mantenimiento (*parA, parB*) (Xiong *et al.*, 2013).

Feng y colaboradores (2016) reportaron el plásmido pP378 del grupo IncN en una cepa clínica de *P. aeruginosa*. Tenía un tamaño de 51.21 kb y era portador de *bla*_{IMP-4} acarreado por un integrón clase 1. Su estructura estaba compuesta de genes de replicación (*repA*), transferencia (*traK, tral, traJ, traL, korA-korB traM, traA, traB, traC, traD, traN, traE, traO, traF, traG, nuc*) y mantenimiento (*operón stbABC-orfD y resP*). pP378 fue transferido a una cepa de *E. coli* EC600 mediante conjugación (Feng *et al.*, 2016).

Galetti y colaboradores en el 2016 aislaron una cepa de *P. aeruginosa* portadora de *bla*_{KPC-2} codificado en el plásmido fago-like pBH6::Phage BH9. Su tamaño era de 41,087 pb y su estructura estaba conformada por el profago BH9 Mu-like insertado en plásmido pBH6 (Galetti *et al.*, 2019).

Y finalmente Hu y colaboradores en el 2019 reportaron una cepa de *P. aeruginosa* (PA1011) acarreando un plásmido portador de *bla*_{KPC-2} con un tamaño de 62,793 pb. Su *backbone* incluye regiones de replicación (*repA*), partición (*parA*) y sistema de secreción (genes *vir*) (Hu *et al.*, 2019).

En México son escasos los estudios de plásmidos portadores de genes de resistencia de *P. aeruginosa* clínicas. Por otro lado, como describimos anteriormente, podemos observar que los plásmidos que se han reportado hasta ahora a nivel internacional en *P. aeruginosa* son muy diversos en su maquinaria de replicación, partición y movilización. Por lo tanto, resulta de suma importancia llevar a cabo este tipo de estudios.

3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

En el laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad, se han analizado distintas cepas de *P. aeruginosa* que fueron aisladas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, con el fin de determinar la presencia de mecanismos de resistencia a los antibióticos.

Se estudiaron 59 cepas de *P. aeruginosa* de las cuales 41 fueron multidrogosresistentes y/o resistentes a carbapenémicos. Posteriormente se buscaron genes de resistencia a beta-lactámicos, siendo 24 las cepas portadoras de *bla*_{GES} y/o *bla*_{IMP}. De las 24 cepas, a 17 se les realizó extracción plasmídica, 8 de estas cepas portaron plásmidos con tamaños que van desde 182 a 368 kb aproximadamente. Por otro lado, también se clasificaron por el método “Degenerate prime MOB typing” y se observó que 7 pertenecieron a la subfamilia MOB_{P11} y una cepa perteneció a la subfamilia MOB_{P14} (Gómez-Martínez, 2017; López-García, 2018).

Posteriormente, López-García en el 2019 realizó la detección del gen *bla*_{IMP} mediante *Southern blot* en los plásmidos de 8 cepas; cuatro de ellas eran portadoras del gen *bla*_{IMP} en plásmidos (PE06, PE52, PE62, PE63).

En las cepas PE06 y PE52 (portadoras de *bla*_{IMP-18} y *bla*_{IMP-56} y 2 plásmidos) se detectó el *bla*_{IMP} en los 2 plásmidos. Las cepas PE62 y PE63 (portadoras de *bla*_{IMP-18} y 2 y 3 plásmidos, respectivamente) mostraron dos señales de hibridación positivas al gen *bla*_{IMP} en dos plásmidos en cada cepa. En el caso de la cepa PE21 (portadora de *bla*_{IMP-62} y un plásmido de 360 kb), no estaba claro si el *bla*_{IMP} estaba

en el cromosoma, en el plásmido o en un plásmido insertado en cromosoma, por lo que se decidió secuenciar su genoma para conocer la localización del gen. Se obtuvo la secuencia parcial de 112,602 pb de un plásmido que tenía un contenido de GC de 65.9% y 127 ORFs. Se identificaron principalmente 3 regiones: replicación (*resolvasa*), transferencia (*trbL*, *trbK*, *trbJ*, *tral*, *traJ*, *traK*, *kfrA*) y resistencia (*bla*_{IMP-62}, *bla*_{OXA-2}). Los experimentos de conjugación no fueron exitosos bajo las condiciones usadas en el laboratorio.

En el caso de la cepa PE52 se secuenció su genoma con la finalidad de estudiar los plásmidos portadores de *bla*_{IMP-56} y *bla*_{IMP-18}, pero sólo se logró identificar un plásmido portador de *bla*_{IMP-56}. El plásmido se le nombró pPE52IMP y tenía un tamaño de 63,557 pb, con un contenido de GC de 63%. Se predijeron 96 ORFs y se destacan principalmente 4 regiones: replicación (*repA*), mantenimiento (*parA*, *parB*), transferencia (*trbL*, *trbK*, *trbJ*, *tral*, *traJ*, *traK*, *krfA*) y resistencia (*bla*_{IMP-56}, *bla*_{OXA-2}) y, una gran cantidad de proteínas hipotéticas. Los experimentos de conjugación no fueron exitosos bajo las condiciones usadas en el laboratorio. Debido a la gran cantidad de proteínas hipotéticas, resulta interesante continuar con el análisis para determinar si verdaderamente esta es la estructura del plásmido.

4. JUSTIFICACIÓN

Las Infecciones Asociadas a la atención sanitaria son causadas por diversos microorganismos del grupo ESKAPE, el cual incluye a *Pseudomonas aeruginosa*, quien además de tener resistencia intrínseca a diferentes antibióticos, ha adquirido resistencia a todos los antimicrobianos mediante mutaciones y por transferencia horizontal de genes; esto incluye a los carbapenémicos que son usados como última elección terapéutica frente a infecciones por este microorganismo. Las IAAS causadas por *P. aeruginosa* multidrogoresistentes- resistentes a carbapenémicos (MDR-RC) conlleva a un incremento en las estancias hospitalarias, elevados costos para el sistema de salud e incremento en las tasas de morbilidad y mortalidad.

Hoy en día gracias a los avances en las tecnologías de secuenciación y al fácil acceso a los mismos, se ha podido conocer el genoma completo y algunas secuencias de plásmidos portadores de carbapenemasas de *P. aeruginosa*, sin embargo, en México no se han realizado este tipo de estudios, por lo que es de gran importancia realizarlos con la finalidad de contribuir en el conocimiento epidemiológico del comportamiento en la distribución mundial de estos elementos genéticos móviles, presentes en esta bacteria.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

- Caracterizar plásmidos portadores de genes codificantes de carbapenemasas y estudiar el resistoma de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.

Objetivos particulares y específicos

- I. Confirmar la pureza de cepas clínicas de *P. aeruginosa* de diferentes hospitales.
- II. Determinar el perfil de resistencia de aislados clínicos de *P. aeruginosa*.
 - a) Determinar el perfil fenotípico de resistencia antimicrobiana
 - b) Determinar fenotípicamente la presencia de BLEEs.
 - c) Determinar el perfil genotípico de resistencia antimicrobiana.
- III. Caracterizar parcialmente plásmidos portadores de genes codificantes de carbapenemasas.
 - a) Identificar la presencia de plásmidos en cepas de *P. aeruginosa* portadoras de carbapenemasas.
 - b) Determinar el tamaño de los plásmidos portadores de genes codificantes de carbapenemasas de *P. aeruginosa*.
 - c) Tipificar parcialmente los plásmidos de las cepas.
- IV. Caracterizar plásmidos portadores de genes codificantes de carbapenemasas.
 - a) Secuenciar algunas cepas de *P. aeruginosa* y analizar los plásmidos portadores de carbapenemasas.
 - b) Continuar el estudio de los plásmidos de las cepas PE21 y PE52 que son portadoras de carbapenemasas.
- V. Analizar el genoma de las cepas en estudio

- a) Determinar la secuencia tipo (ST) de los genomas de *P. aeruginosa* en estudio.
- b) Realizar genómica comparativa del resistoma, factores de virulencia y elementos genéticos movilizables de los genomas de *P. aeruginosa* en estudio y genomas reportados en el GenBank.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de estudio

Se trabajó con 64 cepas de *P. aeruginosa* MDR-RC, aisladas de diferentes sitios anatómicos y unidades de servicio del Hospital Regional del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado de Puebla (n= 43) y del Hospital para el Niño Poblano (n= 21).

Los aislados se recolectaron durante el periodo de octubre del 2015 a julio del 2021 y fueron previamente identificados con el sistema semiautomatizado VITEK-2. Las cepas se almacenaron en crioviales con 1 ml de Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) y glicerol al 10% a -70°C, e identificadas con número secuencial designado por el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHyC). Para descongelar las cepas se sembró un inóculo de cada una en placas de agar TSA (BD Bioxon®) por estría cruzada y se incubaron durante 16 a 18 h a 37°C para después realizar el experimento correspondiente.

De las 43 cepas del Hospital regional I.S.S.S.T.E de Puebla, 4 fueron parcialmente estudiadas por López-García *et al.*, 2018 y sus características se muestran en la tabla 2. El perfil fenotípico de resistencia de las 39 cepas restantes fue determinado por Sánchez-Rentería, 2021.

Tabla 2. Características de las cepas PE21, PE52, PE63 y PE83

Cepa	Servicio	Origen de aislamiento	Genotipo de resistencia	No. plásmidos	Tamaño	MOB
PE21	MI	Esputo	<i>aph(3'')-Ib, aac(6)-II, aadA1b, aph(3')-Via, aph(3')-lib, aadA6, aac(6)-33, sul1, catB7, catA1, bla_{GES-32}, bla_{OXA-2}, bla_{IMP-62}, bla_{OXA-50}, ampC, fosA</i>	1	368 kb	MOB _{P11} , MOB _{H2}
PE52	MI	Urocultivo	<i>aph(3')-lib, aadA1b, fosA, sul1, catB7, ampC, bla_{IMP-56}, bla_{OXA-2}, bla_{OXA-396}</i>	2	27.6 kb	MOB _{P11}
PE63	Cirugía	Urocultivo	<i>aph(3')-lib, catB7, bla_{OXA-50}, ampC, fosA</i>	1	-	MOB _{P14}
PE83	Epidemiología	Urocultivo	<i>qnrVC1, aac(6)-II, aph(3')-Via, aadA1b, aadA6, aph(3'')-Ib, fosA, sul1, dfrA15, catB7, catA1, ampC, bla_{OXA-2}, bla_{OXA-50}, bla_{IMP-62}</i>	1	350 kb	MOB _{P11}

Condiciones éticas

El protocolo para este estudio se aprobó por el Comité Ético del Hospital Regional I.S.S.S.T.E., Puebla con el número de registro 188.2018. Todos los aislados se recolectaron durante el muestreo de rutina del hospital, y los datos del paciente se mantuvieron bajo anonimato.

Cepas control

En los experimentos realizados en este estudio se utilizaron cepas control cuyas características se enlistan en la tabla 3.

Tabla 3. Cepas control.

Cepa	Microorganismo	Características	Donada por
NCTC 50192	<i>E. coli</i>	Control de plásmidos: 154 kb, 86 kb, 64 kb y 7 kb.	Dr. Ulises Garza Ramos
PAO1	<i>P. aeruginosa</i>	Control negativo, PFGE-SpeI	Dr. Miguel Castañeda
PE21	<i>P. aeruginosa</i>	<i>bla</i> _{IMP-62} , <i>bla</i> _{GES-32} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-50} , MOB _{P11} , MOB _{H2}	LMHyC-CICM, BUAP
PE63	<i>P. aeruginosa</i>	MOB _{P14}	LMHyC-CICM, BUAP
Psi03	<i>P. aeruginosa</i>	<i>bla</i> _{VIM}	LMHyC-CICM, BUAP
AN54	<i>A. baumannii</i>	<i>bla</i> _{NDM}	Dra. Elena Bello López LMHyC-CICM, BUAP
C7226	<i>E. coli</i>	<i>aac</i> (6')-Ib	Dr. Gerardo Cortés Cortés LMHyC-CICM, BUAP
C7219 (N. 57)	<i>E. coli</i>	<i>qnrA</i>	Dr. Gerardo Cortés Cortés LMHyC-CICM, BUAP
SA96	<i>K. pneumoniae</i>	<i>qnrB</i>	M.C. Gabriel Abraham González LMHyC-CICM, BUAP

Búsqueda de genes de resistencia

Obtención del templado de ADN total por ebullición.

Esta técnica se basa en la ruptura celular mediante el proceso físico de la ebullición, permitiendo la salida del contenido celular que queda en suspensión.

Se partió de un cultivo masivo en agar TSA. Posteriormente se depositaron 2 asadas en un microtubo con 800 µl de solución salina isotónica. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Este proceso se repitió 2 veces más. Después del último lavado, la pastilla se resuspendió con 1000 µl de solución inyectable estéril y se colocó en ebullición durante 10 min. Pasado el tiempo se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min y se recuperó el sobrenadante.

El ADN se cuantificó con el NanoDrop 2000® (Thermo Scientific) y la concentración de cada lisado se ajustó a 200 µg/µl.

Amplificación de genes de resistencia a antibióticos mediante PCR

La búsqueda de genes de resistencia a antibióticos se realizó mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos para los genes *bla*_{IMP}, *bla*_{BEL}, *bla*_{TEM}, *bla*_{PER}, *bla*_{GES}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-50}, *bla*_{PSE}, *bla*_{VIM}, *bla*_{VEB}, *bla*_{SPM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-2}, *bla*_{SHV} (resistencia a beta-lactámicos), *aac*(6')-*lb* (resistencia a aminoglucósidos), *qnrB*, *qnrS* y *qnrA* (resistencia a quinolonas). El volumen final de cada reacción de PCR fue de 10 µl y contenía los componentes de la tabla 4.

Tabla 4. Componentes para una reacción de PCR.

Reactivos	Concentración inicial	Volumen añadido (µl)	Concentración final
Agua libre de nucleasas	-	5.9	
Buffer de reacción	10X	1	1X
MgCl ₂	25mM	1	2.5 mM
dNTP's	10mM	0.4	0.4 mM
Primer Forward	25µM	0.3	0.75 mM
Primer Reverse	25µM	0.3	0.75 mM
Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase® (Thermo Scientific)	5U/µl	0.1	0.5 U
ADN	200 µg/µl	1	-
Volumen final	-	10 µl	-

La PCR se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos y las condiciones que se muestran en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Oligonucleótidos para amplificar por PCR los genes de resistencia a beta-lactámicos.

Nombre del primer	Secuencia (5' - 3')	Condiciones	Tamaño del amplicón	Referencia
Beta-lactamasas de espectro extendido				
BEL1-F	ATGAAACTGCTGCTCTACCCG	94°C 5 min - 1c (94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 5 min) 30c 72°C 10 min 10°C/-	817 pb	Bello-López, 2015 (Tesis Maestría)
BEL1-R	CAGAAGCAATTAATAACGCC			
blaKPC-F1	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	94°C 5 min - 1c (94°C 30 seg, 52°C 30 seg, 72°C 1 min) 35c 72°C 10 min 10°C/-	882 pb	Akpaka P, <i>et al.</i>
blaKPC-R2	TTACTGCCCGTTGACGCCCA			
ges1- F	ATGCGCTTCATTCACGCAC	94°C 5 min - 1c (94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min) 30c 72°C 10 min 10°C/-	864 pb	Dubois, V. <i>et al.</i> , 2001
ges1- R	CTATTTGTCCGTGCTCAGG			
oxa2 Ps-F	TTCAAGCCAAAGGCACGATAG	96°C 5 min - 1c (96°C 1 min, 61°C 1 min, 72°C 2 min) 35c 72°C 10 min 10°C/-	703 pb	Steward, 2001
oxa2 Ps-R	TCCGAGTTGACTGCCGGGTTG			
oxa50Ps- F	GAAAGGCACCTTCGTCTCTAC	94°C 4 min - 1c (94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min) 30c 72°C 10 min 4°C/-	453 pb	Craciunas <i>et al.</i> , 2010
oxa50Ps- R	CAGAAAGTGGGTCTGTTCCATC			
PERd- F	GCCACTGTAGGYGTWGCMT	94°C 5 min - 1c (94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 5 min) 30c 72°C 10 min 10°C/-	714 pb	Bello-López, 2015 (Tesis Maestría)
PERd-R	GCGCRATRATRGTTCATTGGT			
VEB1-F	CGACTTCCATTTCCCGATGC	95°C 5 min - 1c (95°C 1 min, 57°C 1 min, 72°C 1 min) 30c 72°C 5 min 10°C/-	643 pb	Naas, T. <i>et al.</i> , 1999
VEB1-R	GGACTCTGCAACAAATACGC			
1blaPSE	TTATTGGCATTTCGCTTTTA	94°C 5 min - 1c (94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min) 30c 72°C 10 min 10°C/-	804 pb	Dubois, V. <i>et al.</i> , 2001
2blaPSE	CGCATCATTTGCTCTG			

Nucleótidos degenerados: **W**= A ó T; **M**= A ó C; **R**= A ó G.

Tabla 6. Oligonucleótidos para amplificar por PCR los genes de resistencia a beta-lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas.

Nombre del primer	Secuencia (5' - 3')	Condiciones	Tamaño del amplicón	Referencia
Metallo- beta-lactamasas				
Vimd1- F	GATGGYGTTTGGTGCATATC	94°C 5 min - 1c (94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 1 min) 30c 72°C 10 min	600 pb	Bello-López, 2015 (Tesis Maestría)
Vimd3-R	CAACRTTMGYTGTGTGYTKGA			
IMPd-F	CTRCCGCAGWAGMGKCTTTG	94°C 5 min - 1c (94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 1 min) 30c 72°C 10 min	515 pb	Bello-López, 2015 (Tesis Maestría)
IMPd-R	GCCADGCTACDANATTTGCGTC			
NDMv-F	AATATTATGCACCCGGTCGCG	94°C 5 min - 1c (94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 1 min) 30c 72°C 10 min 10°C/-	732 pb	Bello-López, 2015 (Tesis Maestría)
NDMv-R	CATCACGATCATGCTGGCCTT			
blaSPM-F1	CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG	94°C 5 min - 1c (94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 1 min) 30c 72°C 10 min 10°C/-	800 pb	Rodrigo E. Mendes <i>et al.</i> , 2008
blaSPM-R2	CCTTTTCCGCGACCTTGATC			
Genes de resistencia a aminoglucósidos				
aac(6')-Ib-F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	94°C 5 min 1c (94°C 45s, 60°C 45s, 72°C 45s) 20 c 72°C 5 min 10°C pausa	482 pb	Park <i>et al.</i> , 2006
aac(6')-Ib-R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT			
Genes de resistencia a quinolonas				
qnrAm-F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	95°C 5 min 1c (95°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min) 40 c 72°C 7 min 10°C pausa	580 pb	Cattoir <i>et al.</i> , 2007
qnrAm-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC			
qnrB-F	GGMATHGAAATTCGCCACTG	95°C 5 min 1c (95°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 1 min) 35 c 72°C 7 min 10°C pausa	264 pb	Cattoir <i>et al.</i> , 2007
qnrB-R	TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA			
qnrS-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	95°C 5 min 1c (95°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 1 min) 35 c 72°C 7 min 10°C pausa	427 pb	Cattoir <i>et al.</i> , 2007
qnrS-R	TCTAAACCGTCGAGTTCCGGC			

Nucleótidos degenerados: **M**= A ó C; **Y**= C ó T; **K**= G ó T; **H**= A ó C ó T; **D**= A ó G ó T; **N**= A ó C ó G ó T; **W**= A ó T; **R**= A ó G.

Electroforesis de los productos de PCR

Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1%, durante 35-45 min a 100 V. Se utilizó el marcador de peso molecular Gene Ruler 100 bp Plus ADN Ladders (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Los geles se tiñeron en una disolución de bromuro de etidio (Ethidium Bromide 10 mg/ml, Sigma, Aldrich, St. Louis, MO, USA.), 0.5 g/L durante 30 seg y se dejaron desteñir en agua destilada

por 30 min. Se utilizó un digitalizador de imágenes MiniBIS Pro-DNR Bio-Imaging Systems para la visualización de las bandas.

Purificación de los productos de PCR

Las bandas de interés de los productos de PCR se purificaron con el kit Zymoclean™ Gel ADN Recovery Kit™ de Zymo Research, siguiendo las instrucciones del fabricante, y se secuenciaron por el método de Sanger en el Laboratorio Nacional de Genómica para Biodiversidad (LANGEBIO), CINVESTAV, Irapuato, Gto. Para el análisis de las secuencias, se utilizaron los programas mostrados en la tabla 7.

Tabla 7. Programas para el análisis de las secuencias de los genes secuenciados.

Programa	Dirección electrónica	Función
FinchTV versión 1.4.0 by Geospiza	https://digitalworldbiology.com/FinchTV	Visualizador de cromatogramas de secuencias de ADN
Nucleic Acid Sequence "Massanger"	https://biomodel.uah.es/en/lab/cybertory/analysis/massanger.htm	Edita y limpia secuencias
BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	Compara secuencias de nucleótidos o proteínas con bases de datos de secuencias y calcula la significancia estadística
Clustal Omega by EMBL-EBI	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/	Realiza alineamientos múltiples de secuencias
ExPASy-Translate tool	https://web.expasy.org/translate/	Permite traducir una secuencia de nucleótidos (ADN/ARN) a una secuencia de proteínas

Extracción de ADN plasmídico

Se realizó la extracción de plásmidos de *P. aeruginosa* mediante el método de lisis alcalina descrito por Kieser, 1984 (Anexo I) (Kieser, 1984).

Extracción plasmídica (Kieser, 1984 modificada)

Se realizó un cultivo masivo en una placa con agar BHI al 3% y se incubó durante 16 - 18 h. Se recolectó todo el crecimiento en un microtubo de 1.5 ml que contenía 1 ml de solución de EDTA 0.01 M. Se homogeneizó con vórtex, se centrifugó a

12,000 rpm durante 5 min y después con la ayuda de una micropipeta se eliminó el exopolisacárido. Posteriormente, se realizó un segundo lavado con 1 ml de solución salina isotónica, repitiendo los pasos de homogenización y centrifugación. Enseguida se decantó la solución salina.

El paquete celular se resuspendió con vórtex y se le adicionó 400 μ l de la solución 1 [Sacarosa 0.3M (15 ml), Tris-HCl 25 mM pH 8 (1.25 ml), EDTA 25 mM pH 8 (2.5 ml) y H₂O (31.25 ml)]. Se resuspendió suavemente con una pipeta hasta obtener una mezcla homogénea. Posteriormente se le adicionaron 100 μ l de lisozima (10 mg/ml) y se homogeneizó con la ayuda de una micropipeta. Esta mezcla se incubó a 4°C durante 30 min y posteriormente se le adicionaron 250 μ l de solución 2 [NaOH 5 M (300 μ l), SDS 10% y H₂O (3.7 ml)]. Se resuspendió con una micropipeta y se incubó a 54°C en el termobloque durante 30 min (homogeneizar por inversión los tubos cada 5-10 min). Posteriormente se agregaron 100 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se homogeneizó con vórtex hasta que la mezcla se volvió una coloración blanca uniforme (Nota: antes del siguiente paso y para evitar accidentes es necesario destapar el tubo). Después, se centrifugó a 13,000 rpm durante 20 min y del sobrenadante se recuperaron aproximadamente 400 μ l. Para el corrimiento electroforético se cargaron 8 μ l de la muestra y 1 μ l de buffer de carga en un gel de agarosa al 0.8%. Las condiciones de corrimiento fueron las siguientes: 100 V, con buffer TAE 1X durante 1,5 h (o hasta que el colorante llegue a la orilla del gel).

Caracterización parcial de plásmidos

Se realizó la caracterización parcial de plásmidos de las cepas portadoras de carbapenemasas mediante PCR, utilizando una clasificación basada en la secuencia de las relaxasas. Alvarado *et al.*, 2012, describieron 18 subfamilias de relaxasas a las cuales nombraron MOB. Sin embargo, en este estudio sólo utilizamos los oligonucleótidos de las subfamilias de relaxasas MOB_{P11}, MOB_{P14} y MOB_{H2}.

Tipificación por amplificación por PCR de MOB con oligonucleótidos degenerados (DPMT)

El volumen final de cada reacción de PCR fue de 10 µl y contenía los componentes de la Tabla 4.

Se buscaron solamente 3 subfamilias de relaxasas, ya que en trabajos previos llevados a cabo en el LMHyC fueron las más prevalentes en las cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla (Gómez-Martínez, 2017; López-García, 2019). La PCR se llevó a cabo usando los oligonucleótidos y las condiciones que se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Oligonucleótidos de las subfamilias MOB y condiciones de PCR.

Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Condiciones	Amplicón
P11-f	CGTGCGAAGGGCGACAARACBTAYCA	94°C 4 min 1c (94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 30s) 25c	180 pb
P1-r	AGCGATGTGGATGTGAAGTTTRTCNGTRTC	72°C 10 min 10°C pausa	
P14-f	CGCAGCAAGGACACCATCAAYCAYTAYRT	94°C 4 min 1c (94°C 30s, 50°C 30s, 70°C 30s) 25c	174 pb
P1-r	AGCGATGTGGATGTGAAGTTTRTCNGTRTC	72°C 10 min 10°C pausa	
H2-f	AGTTCCCAGCCTCAGAAATCCAYCAYKCC	94°C 4 min 1c (94°C 30s, 68°C 30s, 72°C 30s) 25c	264 pb
H2-r	GCGGACCGTGCCANGGRTGCCA	72°C 10 min 10°C pausa	

Los oligonucleótidos fueron diseñados por Alvarado *et al.*, 2012. Nucleótidos degenerados: **R**= A ó G; **B**= C ó G ó T; **Y**= C ó T; **N**= A ó C ó G ó T; **K**= G ó T

Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 2%, durante 35-45 min a 100 V. Se utilizó el marcador de peso molecular Gene Ruler 100 bp Plus ADN Ladders (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio 10 mg/ml (Sigma, Aldrich, St. Louis, MO, USA) durante 30 seg y se dejaron desteñir en agua destilada por 30 min. Se utilizó un digitalizador de imágenes MiniBIS Pro-DNR Bio-Imaging Systems para la visualización de las bandas.

Determinación del peso molecular de los plásmidos con Electroforesis en Gel de Campos Pulsados con Nucleasa S1 (PFGE-S1)

Esta técnica permite la visualización y determinación de peso molecular de los plásmidos, ya que se utiliza la enzima S1 para linearizar plásmidos. Se utilizó una cepa control con plásmidos de peso molecular conocido (*E. coli* NCTC 50192).

Este protocolo es una modificación del método descrito por Barton *et al.*, 1995 (Anexo II).

a) Preparación de los insertos

Se partió de un cultivo masivo de *P. aeruginosa* en una placa grande con agar BHI al 3%. Se recolectó toda la cepa en un microtubo que contenía 1 ml de solución de EDTA 0.01 M, se homogeneizó con vórtex y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min. Después, se eliminó el sobrenadante rico en exopolisacárido con la ayuda de una pipeta de 1000 µl y se realizó un segundo lavado con solución salina isotónica. El paquete celular se resuspendió en 1 ml de Buffer TE (10 mM Tris-HCl pH=8,0, 1 mM EDTA pH=8,0) y se ajustó al patrón no. 2 de MacFarland (6×10^8 células). Las suspensiones bacterianas se mantuvieron en hielo hasta su uso.

Por otro lado, se preparó agarosa de bajo punto de fusión (Pulsed Field Certified Agarose, Biorad) al 1.5% con Buffer TE 1X, se dispensaron 500 µl en microtubos de 1.5 ml y se mantuvieron en un baño maría con agua hirviendo hasta su uso (esto mejora la homogeneización con la suspensión bacteriana). Posteriormente, se mezclaron 500 µl de la suspensión bacteriana con 500 µl de agarosa de bajo punto de fusión y se distribuyó en los moldes cuidadosamente sin formar burbujas. Después, se dejaron gelificar durante 10 min en el refrigerador.

b) Lisis bacteriana

Se añadió 1 ml de buffer de lisis (Tris 50mM pH=8, EDTA 50mM pH=8, Sarcosil 1%, 0.1 mg/L proteinasa K) en un microtubo, se colocó un inserto y se incubó en baño maría con agitación a 54°C durante 24 h.

c) Lavado de insertos

Después de llevarse a cabo la lisis, se eliminó el buffer, se recuperó el inserto en una placa de Petri estéril y se realizaron los siguientes lavados en tubos falcon de 15 ml:

- a) Se añadieron 10 ml de agua destilada estéril y se incubó durante 10 min en baño maría con agitación a 54°C.
- b) Se eliminó el agua destilada, se añadieron 10 ml de buffer TE y se incubó durante 30 min en baño maría con agitación a 54°C. Se repitió 3 veces.
- c) Por último, se añadieron 10 ml de buffer TE y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente.

*Los insertos se guardaron a 4°C en 1 ml de buffer TE hasta su uso (se pueden conservar hasta por 12 meses).

d) Digestión enzimática

Se utilizaron 100 µl de la mezcla de digestión para cada muestra, que estaba compuesta por:

- 0.4 µl de nucleasa S1 (TermoFisher 100 U/µl, 1 ml)
- 20 µl de buffer de la enzima
- 79.6 µl de agua estéril.

Posteriormente, se colocó una cuarta parte del inserto en un microtubo que contenía la mezcla de digestión y se incubó durante 40 min a 37°C en la incubadora.

Para parar la reacción de la enzima S1, se adicionaron 150 µl de solución de paro (EDTA 0.05M pH=8; sarcosil 1%) y se incubó en hielo durante 10 min.

e) Preparación del gel de agarosa

Los fragmentos fueron separados en un gel de agarosa (Pulsed Field Certified Agarose, Bio-Rad) al 1%. Para prepararla, se disolvieron 1.3 g de agarosa en 130 ml TBE 0.5X, se vertió sobre el molde y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

A continuación, los pocillos se rellenaron con los insertos digeridos, y se sellaron con agarosa de la misma concentración temperada a 50°C.

f) Electroforesis

Se realizó en una cubeta de electroforesis en gel de campos pulsados CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EEUU), que se llenó con 2,870 mL de TBE 0.5X suplementado con tiourea 75 µM (0.0162 g). Las condiciones para el corrimiento de electroforesis empleadas se describen en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones del corrimiento electroforético de la PFGE-S1.

Condiciones	
Gradiente	6 V/cm
Rampa lineal pulsada	1-30 seg
Tiempo de corrimiento	22 h
Temperatura	14°C
Ángulo	120°

g) Tinción del gel y visualización

Al finalizar la electroforesis, el gel se tiñó en una solución acuosa de bromuro de etidio (20 µl/ 400 ml) durante 40s, posteriormente se destiñó en agua destilada y se visualizó en un transiluminador ultravioleta MiniBIS Pro-DNR Bio-Imaging Systems cada h, hasta la adecuada visualización de las bandas.

h) Cálculo del peso molecular

Para calcular el peso molecular de los plásmidos, utilizamos el programa “Gel Quant Express”.

1. Seleccionamos la fotografía del gel donde las bandas de los plásmidos se veían más claras y definidas.
2. Seleccionamos “Molecular weight” y después click a la pestaña “lane”.
3. Definimos el número de carriles y los ajustamos en la fotografía del PFGE-S1.

4. Posteriormente, seleccionamos la pestaña “bands”, “add bands” y marcamos cada una de las bandas en la fotografía del PFGE-S1.
5. Regresamos a la opción “Molecular weight”, seleccionamos la opción STD y luego la opción “NCTC 50192”.
6. Finalmente, dimos click a la opción “Linearlog”.
7. Para exportar la tabla de Excel con los pesos moleculares seleccionamos “export table”.

Tipificación molecular

Electroforesis en Gel de Campos Pulsados con enzima SpeI (PFGE-SpeI)

Se le realizó la tipificación molecular solamente a las cepas que fueron portadoras de *bla*_{IMP} y/o *bla*_{GES}. Lo anterior con la finalidad de escoger cepas representativas de cada clado filogenético para realizarles secuenciación masiva.

Los insertos fueron preparados, lisados y lavados como se indicó en los incisos a), b) y c) del apartado de PFGE-S1.

Digestión enzimática con SpeI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Para cada muestra se utilizaron 100 µl de la mezcla de reacción que estaba compuesta por 10 µl de buffer 10X de la enzima, 89 µl de agua inyectable estéril y 1 µl de la enzima SpeI. A cada tubo se le colocó una cuarta parte del inserto de cada cepa en estudio y se incubó durante 6 h a 37°C en el baño maria. La preparación del gel de agarosa se llevó a cabo como indica el inciso e) del apartado de PFGE-S1.

Electroforesis

Se realizó en una cubeta de electroforesis en gel de campos pulsados CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EEUU), que se llenó con 2.870 L de TBE 0.5X suplementado con tiourea 75 µM (0.0162 g). Las condiciones para el corrimiento de electroforesis empleadas fueron: una rampa lineal pulsada de 5 a 15 s con un gradiente de voltaje de 6 V/cm a 14°C durante 10 h; seguida de una rampa

lineal pulsada de 15 a 45 s con un gradiente de voltaje de 6V/cm a 14°C durante otras 10h. La tinción y visualización se realizó como indica el inciso g) del apartado de PFGE-S1.

Análisis de los patrones de PFGE

Las imágenes capturadas fueron analizadas con el programa GelQuant Express Analysis Software. Se construyó el dendrograma con los patrones de bandeo y el análisis de conglomerados se realizó con el software NTSYSpc2.2, utilizando el método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) y la similitud de las cepas se estableció considerando los criterios establecidos por Tenover (Tenover *et al.*, 1995).

Cepas utilizadas para secuenciación masiva para el análisis de plásmidos y genómica comparativa.

Para un mejor entendimiento de las cepas que se usaron en cada uno de los análisis, se describe en la figura 3 las cepas utilizadas, el tipo de secuenciación y el análisis donde se incluyeron.

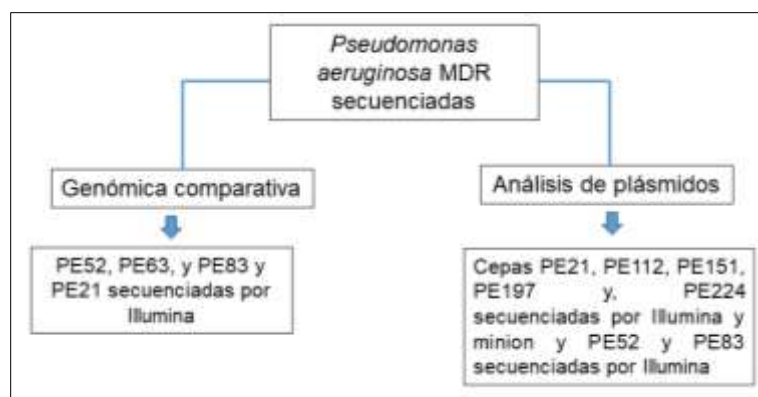


Figura 3. Cepas de *P. aeruginosa* incluidas en cada análisis.

Para este análisis incluimos 8 cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla: cuatro cepas previamente estudiadas experimentalmente, donde se determinó que eran portadoras de *bla*_{IMP}, plásmidos y relaxasa MOB (PE21, PE52, PE63, PE83)

(López-García *et al.*, 2018), y cuatro cepas PE112, PE151, PE197 y PE224 analizadas en este estudio y seleccionadas debido a que cumplían con los criterios antes mencionados y no tenían relación clonal.

Condiciones de crecimiento y preparación de las cepas

Las 8 cepas se sembraron en placas grandes con agar BHI al 2% y todo el crecimiento fue recuperado en un microtubo con 1 ml de EDTA 0.01M. Se homogenizó con vórtex y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min. Posteriormente, se eliminó el exopolisacárido con ayuda de una pipeta y a la pastilla se le adicionó 1 ml de solución salina isotónica. Se homogenizó con vórtex hasta desintegrar la pastilla, se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min y se decantó el sobrenadante; esto se repitió 2 veces más (nota: retirar el exopolisacárido que se desprenda entre los lavados).

Extracción de ADN y secuenciación masiva

El ADN total se extrajo basándonos en el manual del Kit de purificación Wizard Genomic ADN Purification, Promega Corporation. Ma, USA (<https://cutt.ly/u9B0OI4>).

Antes de iniciar con el procedimiento, la pastilla fue resuspendida con la ayuda de vórtex para asegurar su homogeneización con la solución “nuclei”. Posteriormente, se agregaron 600 µl de solución de lisis “nuclei” y se resuspendió suavemente con la pipeta. La mezcla se incubó por 10 min a 80°C en el “thermoblock”; durante la incubación el tubo se invirtió suavemente cada 3 min. Después, se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 5 min, se le añadieron 5 µl de solución de RNAsa y se homogeneizó suavemente con una pipeta. La mezcla se incubó durante 60 min a 37°C en la incubadora y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente, se añadieron 200 µl de solución de precipitación y se homogeneizó por vórtex (no deshacer los grumos de exopolisacárido, esto permitirá obtener un ADN más limpio). A continuación, se incubó en hielo durante 10 min y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5-10 min (se puede repetir este paso en caso de que el sobrenadante siga sucio). Se transfirió el sobrenadante a un tubo que contenía 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló suavemente por inversión

hasta que las hebras de ADN formaron una masa visible. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y se escurrió el exceso con papel absorbente. Después, se añadieron 600 µl de etanol al 70% que estaba a temperatura ambiente y se invirtió el tubo varias veces para lavar la pastilla de ADN. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min, se decantó cuidadosamente el etanol y con ayuda de papel absorbente se eliminó el exceso. La pastilla se dejó secar en la incubadora por 5-10 min y se rehidrató con 100 µl de solución de rehidratación. Se incubó durante una h a 65°C y durante este tiempo se invirtió el tubo periódicamente. El ADN se guardó a -20°C hasta su uso.

La concentración y calidad del ADN se midió en el NanoDrop 2000® (Thermo Scientific) y se realizó un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 0.5% con 0.5-1 µl de ADN, dependiendo de la concentración. Para comprobar la presencia del gen *bla_{IMP}* se realizó la amplificación por PCR.

Las cepas se secuenciaron por diferentes tecnologías: La cepa PE21 se secuenció por illumina MiSeq 2x150 pb, 5 millones de lecturas “paired end” en el SNPSaurus Genomic to Genotype, y por MinION de Oxford Nanopore con 100X de profundidad en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT). Las cepas PE112, PE151, PE197 y PE224 se secuenciaron por illumina Nextseq 2x75 pb, 5 millones de lecturas “paired-end”, y por Oxford Nanopore con 100X de profundidad en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT). Las cepas PE52, PE63 y PE83 se secuenciaron únicamente por illumina MiSeq 2x150 pb, 5 millones de lecturas “paired end” en el SNPSaurus Genomic to Genotype.

Ensamble *de novo* y anotación de genes

El análisis de la calidad y la limpieza de las lecturas, el ensamble *de novo* y la anotación del genoma se realizaron bajo línea de comandos en Linux/Ubuntu. Primero se revisó la calidad de las lecturas crudas con el programa FastQC. Se consideraron lecturas de mala calidad aquellas que tuvieran adaptadores, “Ns”, sobrerrepresentaciones, diferente contenido de bases y GC, entre otras (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/bad_sequence_fastqc.html). La limpieza de las lecturas de mala calidad se realizó con el programa Trim

Galore utilizando las siguientes “flags”: --fastqc, --paired, --retain_unpaired (Anexo III). Posteriormente, el ensamble *de novo* de lecturas cortas de ilumina se realizó con Metassembler a partir de ensamblados generados con Velvet v1.2.10, SPAdes v3.9.0, Platanus y Abyss. Para los ensamblados realizados con Velvet se usaron las “flags” -ShortPaired, -fastq, -separate y se probaron diferentes kmers con la finalidad de tener el mejor ensamble (Anexo III). Por otro lado, para los ensamblados realizados con SPAdes se utilizaron los kmeros default (21, 33, 55, 77) y la “flag” -careful para reducir el número de mismatches e indels cortos (Anexo III). Para comparar la calidad de los ensamblados se utilizó la herramienta QUAST (Quality Assessment Tool for Genome Assemblies) y se consideró como mejor ensamble al que tuviera menor número de contigs y el valor de N50 mayor. Los ensamblados híbridos de lecturas de Illumina y MinION se realizaron con Unicycler v0.5.0 (Wick *et al.*, 2017).

La anotación de los ensamblados se realizó bajo línea de comandos con PROKKA (Rapid Prokaryotic Genome Annotation) (Seemann, 2014) y con la herramienta online RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Aziz *et al.*, 2008).

Análisis bioinformático para el estudio de plásmidos y otros elementos genéticos móviles

Se utilizó el programa PLACNETW (<https://castillo.dicom.unican.es/upload/>) (Vielva *et al.*, 2017) y la opción “plasmid” de SPAdes versión 3.9.0 (Bankevich *et al.*, 2012) para diferenciar los contigs pertenecientes a plásmidos, de los pertenecientes al cromosoma y MAUVE version 20150226 (Darling *et al.*, 2004) para saber si estos nodos se empalmaban.

Se buscaron genes de resistencia utilizando la herramienta online Resfinder 4.0 del “Center for Genomic Epidemiology” (<http://www.genomicepidemiology.org/>) (Bortolaia *et al.*, 2020), utilizando la opción “Other” en la casilla “Select species”. Las variantes de los genes de resistencia fueron corroboradas en la base de datos “Beta-Lactamase DataBase” (BLDB, por sus siglas en inglés) (<http://bldb.eu/>) (Naas *et al.*, 2017) y con la herramienta “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST, por sus siglas en inglés). MOBscan (<https://castillo.dicom.unican.es/mobscan/>) (Garcillán-Barcia *et al.*, 2020) se utilizó para buscar las familias relaxasas MOB.

Para la búsqueda de islas genómicas, secuencias de inserción e integrones se utilizó IslandViewer 4 (<https://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer>) (Bertelli *et al.*, 2017), ISfinder (<https://isfinder.biotoul.fr/>) (Siguier *et al.*, 2006) e IntegronFinder 1.0 (Nerón *et al.*, 2022), respectivamente.

Análisis de fagos

PHASTER (<https://phaster.ca/>) (Arndt *et al.*, 2016) fue utilizado para la búsqueda de fagos. Posteriormente las secuencias de fagos fueron anotadas con PHAROKKA en la página web Galaxy (https://usegalaxy.eu/?tool_id=toolshed.g2.bx.psu.edu%2Frepos%2Fiuc%2Fpharokka%2Fpharokka%2F1.3.2%2Bgalaxy0&version=latest) (Bouras *et al.*, 2023). El archivo gbk de la anotación fue usado para la detección de fagos similares con DBSCAN-SWA (Gan *et al.*, 2022) (<http://www.microbiome-bigdata.com/PHISDetector/index/tools/DBSCAN-SWA>) y el archivo fasta para la detección con NCBI virus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/>).

Análisis comparativo de pPE52IMP y de los plásmidos obtenidos del GenBank

Se realizó una búsqueda de plásmidos similares a pPE52IMP en el GenBank utilizando como secuencia *query* el gen *repA* de este plásmido. Posteriormente, se seleccionaron las secuencias completas de los plásmidos que compartían el 100% de identidad con la *repA* de pPE52IMP. MAUVE versión 20150226 (Darling *et al.*, 2004) y CLC Sequence Viewer versión 8.0 se usaron para alinear y comparar las secuencias y se representaron gráficamente con ayuda de Easyfig 2.2.5 (Sullivan *et al.*, 2011).

Análisis filogenético de la replicasa RepA del plásmido pPE52IMP

Se realizó el análisis de RepA de plásmidos portadores de genes de resistencia y se construyó un árbol filogenético para conocer la relación filogenética de la proteína RepA del plásmido pPE52IMP y otros plásmidos de *P. aeruginosa* reportados en el GenBank.

Se obtuvieron un total de 164 secuencias de nucleótidos de plásmidos completos y parciales de la base de datos del GenBank y se descartaron los plásmidos que no portaban genes de resistencia. Posteriormente, utilizamos las palabras clave "replicase", "RepA", "helix-turn-helix domain-containing protein" para buscar en las anotaciones de los plásmidos, la secuencia de RepA. Los dominios de la replicasa A se corroboraron con el programa online Pfam 33.1 (Mistry *et al.*, 2021) y las RepA con codones de paro prematuros o cambios en el ORF se descartaron. Al final se incluyeron un total de 33 secuencias de RepA de plásmidos portadores de genes de resistencia (incluido pPE52IMP) para construir el árbol filogenético. La herramienta "Molecular Evolutionary Genetics Analysis" (MEGA) versión 11.0.10 (Tamura *et al.*, 2021) fue utilizada para inferir la filogenia de las proteínas RepA utilizando el método UPGMA (los parámetros utilizados fueron: tipo de sustituciones de aminoácidos, método del nº de diferencias y 100 réplicas Bootstrap).

Genómica comparativa

Para este análisis se incluyeron los genomas de cuatro cepas de *P. aeruginosa* recuperadas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla: las cepas PE52, PE63 y PE83 que se aislaron de la orina, y la cepa PE21 aislada de esputo. También, se descargaron por orden de aparición 59 genomas completos de la base de datos del GenBank disponibles hasta junio de 2021, de los cuales 19 fueron de cepas aisladas de muestras urinarias, 20 de muestras de esputo (pacientes sin fibrosis quística) y 20 aisladas del medio ambiente. Además, se incluyeron los genomas de las cepas de referencia *P. aeruginosa* PAO1 (NC_002516.2) y PA14 (CP000438.1).

Roary versión 3.12.0 (Andrew *et al.*, 2015) se usó para el análisis del pangenoma, el cual utiliza los archivos GFF3 generados por Prokka para identificar el core genome, soft core, shell genes, and cloud genes. Posteriormente, para generar los árboles filogenéticos del genoma core y accesorio se utilizaron los archivos ".aln" que generó Roary y se usó la indicación FastTree -gtr -nt ".aln". Se utilizó el script Roary_plots.py para visualizar el pangenoma y el árbol filogenético basado en Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) se construyó utilizando Parsnp v1.2 con la flag "-c" activada. iTOL v6.5 (<https://itol.embl.de/>) se usó para visualizar los archivos

'newick' del genoma core y accesorio, generados con Roary y los archivos 'newick' de los SNPs generados con Parsnp.

Identificación del Multilocus Sequence Typing (MLST)

La secuencia tipo (ST) se identificó utilizando la herramienta MLST del Center for Genomic Epidemiology (<https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>), que utiliza la secuencia de alelos MLST y los datos de perfil de PubMLST.org. El complejo clonal del ST se determinó con PHYLOViZ (<https://online.phyloviz.net/index>) que utiliza goeBURST (un refinamiento del algoritmo eBURST) para generar un árbol completo de extensión mínima (MST).

Análisis del resistoma

Se utilizó ResFinder versión 4.1 del "Center for Genomic Epidemiology" (<http://www.genomicepidemiology.org/>), para detectar genes de resistencia a antibióticos utilizando la opción "Other" en la casilla "Select species". Las mutaciones asociadas con la resistencia a antibióticos que conducen a cambios en los aminoácidos se identificaron manualmente utilizando clustal OMEGA (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) en comparación con los genes de PAO1 como referencia.

Análisis del viruloma

Los genes de virulencia se identificaron con VFDB 2019 (Virulence Factors DataBase) (Liu B, *et al.*, 2019). La cepa PA14 de *P. aeruginosa* fue la cepa de referencia debido a que es *exoU* positiva y se considera altamente virulenta.

Identificación de elementos genéticos móviles/movilizables

Los elementos conjugativos integrativos (ICE) y los elementos integrativos y movilizables (IME) se identificaron con la herramienta web ICEfinder 2.0 (<https://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/ICEfinder/ICEfinder.html>) (Liu M, *et al.*, 2019). Además, se analizaron elementos genéticos móviles como transposones simples (Tn), transposones compuestos (CTn) y secuencias de inserción (IS) con MobileElementFinder versión 1.0.3 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MobileElementFinder/>). CrisprCasFinder se utilizó

(<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index>) (Couvin *et al.*, 2018) para identificar "repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas" (CRISPR) y proteínas asociadas a CRISPR (CRISPR-cas, por sus siglas en inglés) tanto en cromosomas como en plásmidos. AcrFinder (<https://bcbl.unl.edu/AcrFinder/>) (Yi *et al.*, 2020) fue usada para buscar sistemas anti-CRISPR.

Generación de gráficos, heatmaps y representaciones

Las gráficas y heatmaps se construyeron utilizando los paquetes ggplot2 y Bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004; Wickham, 2016) de RStudio versión 1.4.1106 (<https://posit.co/download/rstudio-desktop/>), utilizando archivos cvs o txt con los datos de interés. La comparación de los plásmidos se realizó con Easyfig 2.2.5 (Sullivan *et al.*, 2011), usando los archivos gbk de las secuencias y la base de datos del GenBank. La herramienta online Proksee se usó para dibujar los plásmidos circulares (<https://proksee.ca/projects/new>).

7. RESULTADOS

Aislados de *Pseudomonas aeruginosa*

Se incluyeron un total de 64 cepas de *P. aeruginosa* mutidrogorresistentes-resistentes a carbapenémicos, de las cuales 21 cepas provinieron de pacientes del hospital para el niño poblano y no fueron portadoras de los genes de resistencia que se buscaron mediante PCR en este trabajo (*bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{GES}).

Las 43 cepas de *P. aeruginosa* mutidrogorresistentes-resistentes a carbapenémicos restantes provinieron de 36 pacientes con infecciones asociadas a la atención de la salud del Hospital Regional del I.S.S.S.T.E de Puebla, de las cuales 4 fueron parcialmente estudiadas por López-García *et al.*, 2018 y sus características se muestran en la tabla 2. Las 39 cepas restantes se recolectaron desde el año 2015 al 2017 de 32 pacientes y su perfil fenotípico de resistencia se determinó previamente por Sánchez-Rentería *et al.*, 2021. Estas últimas provenían de los servicios de Medicina interna (41.0%), Unidad de cuidados intensivos (28.2%), Urología (18.0%), Cirugía H (7.7%) y otros como Pediatría, Ginecología y Cardiología (5.1%) (Figura 4). Las 39 cepas se recolectaron de Urocultivo (53.8%), Expectoración (7.7%), Lavado bronquial (10.3%), Secreción de herida (7.7%), otras muestras como Hemocultivo, Secreción de herida, entre otros (20.5%) (Figura 4).

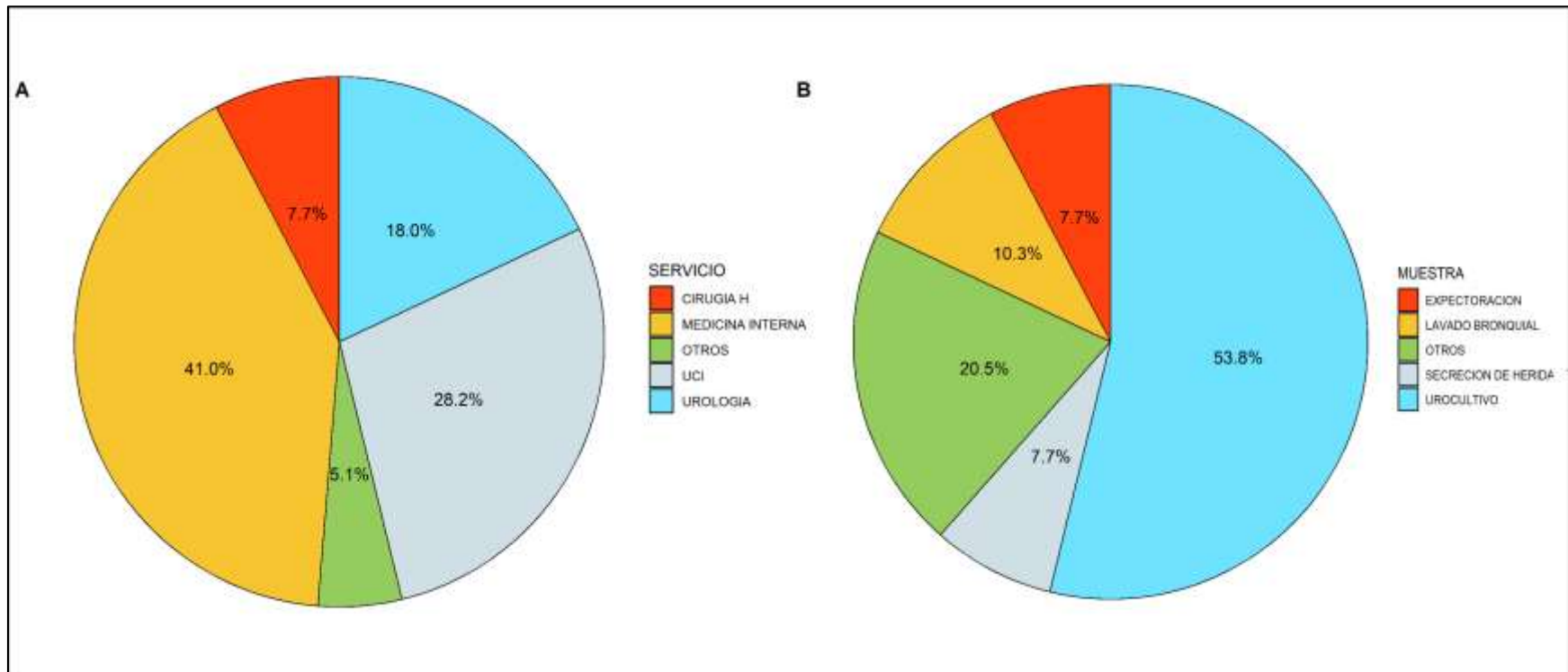


Figura 4. (A) Servicios de origen de 39 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* del Hospital Regional ISSTE de Puebla. **(B)** sitios anatómicos de donde fueron recuperados los 39 aislados. UCI: Unidad de Cuidados Intensivos.

Detección de genes de resistencia a antibióticos

A las 39 cepas de *P. aeruginosa* multidrogorresistente- resistente a carbapenémicos (MDR-RC), se les encontró al menos un gen de resistencia, de las cuales 5 portaron tanto *bla*_{IMP} como *bla*_{GES}, 12 portaron solamente *bla*_{IMP}, 18 portaron solamente *bla*_{GES}, 1 portó *bla*_{VIM}, todas portaron *bla*_{OXA-50} y 36 portaron *aac*(6)-*lb* (Figura 5). Por otro lado, en ninguna de las cepas se detectaron los genes *bla*_{SPM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VEB}, *bla*_{PSE}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEL}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-40}, *qnrS*, *qnrA* y *qnrB*.

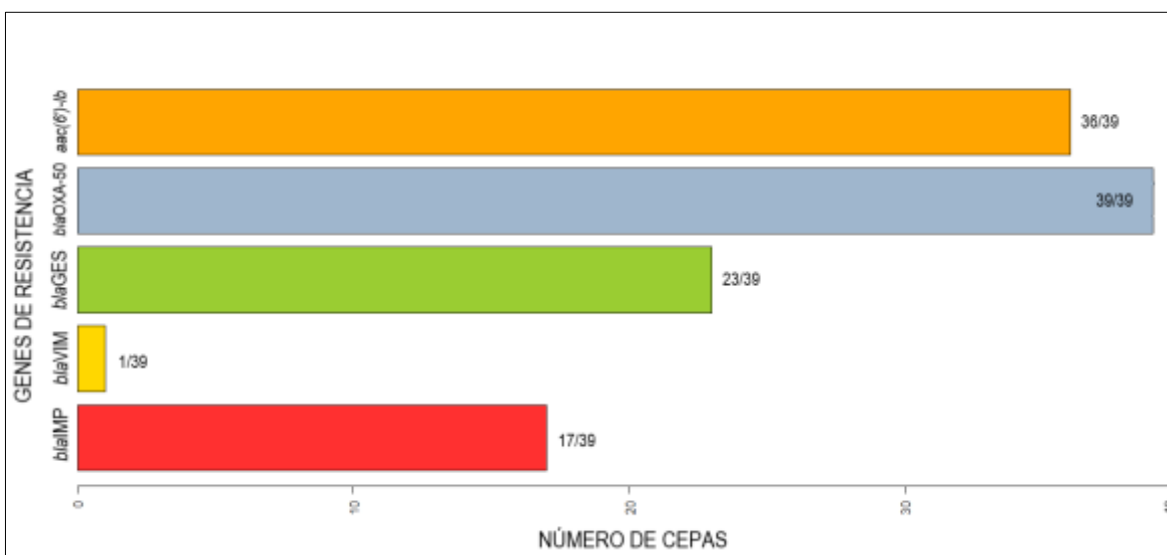


Figura 5. Perfil genotípico de resistencia de las 39 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas del Hospital Regional I.S.S.T.E de Puebla.

Caracterización parcial de plásmidos de cepas portadoras de carbapenemasas

A 39 cepas portadoras de *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} y/o *bla*_{GES} se les determinó la presencia de plásmidos mediante lisis alcalina (Método de Kieser modificado), usando como cepa control la *E. coli* NCTC 50192 con plásmidos de peso molecular conocido. Con esta técnica observamos únicamente 8 cepas (PE112, PE115, PE118, PE151, PE152, PE224, PE197, PE175) portadoras de 1 a 3 bandas plasmídicas (Figura 6). Cabe destacar que algunas cepas se aislaron del mismo paciente, pero presentaron diferente patrón de bandeo como es el caso de PE112, PE115 y PE118. Por otro lado, la cepa PE224 presentó una banda plasmídica, pero en la cepa PE239 no se observaron plásmidos con esta técnica de extracción; y en el caso de las cepas

PE151 y PE152 del mismo paciente presentaron una banda plasmídica aparentemente del mismo tamaño (Figura 6).

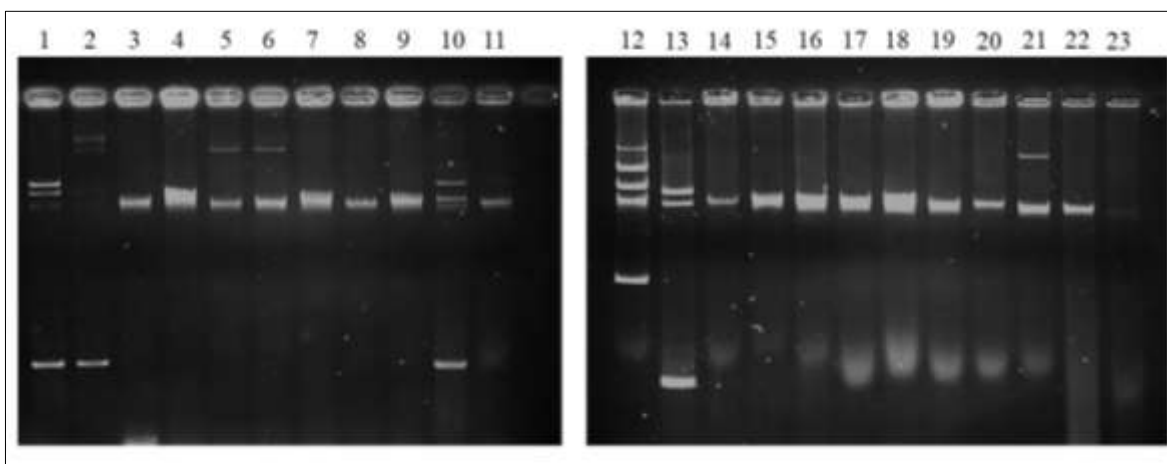


Figura 6. Electroforesis de los plásmidos obtenidos por el método de Kieser de las cepas de *P. aeruginosa* portadoras de carbapenemasas provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla. 1, PE112; 2, PE118; 3, PE119; 4, PE139; 5, PE151; 6, PE152; 7, PE177; 8, PE137; 9, PE184; 10, PE197; 11, PE231; 12, cepa control *E. Coli* NCTC 50192; 13, PE115; 14, PE201; 15, PE105; 16, PE107; 17, PE109; 18, PE125; 19, PE128, 20, PE193; 21, PE224; 22, PE228; 23, PE238.

Caracterización parcial de plásmidos mediante MOB

Para la determinación de MOB se incluyeron 8 cepas que presentaron plásmidos y de las 27 cepas que no portaron plásmidos, sólo se eligieron 11 cepas que portaban ambos genes *bla_{IMP}* y *bla_{GES}* ó aquellas que portaban solo *bla_{IMP}* ó *bla_{VIM}* (debido a que algunos plásmidos pueden estar integrados y no se observan mediante lisis alcalina), teniendo un total de 19 cepas.

Observamos que de las 11 cepas (PE119, PE137, PE139, PE177, PE184, PE228, PE231, PE238 PE239, PE201 y PE193) que no portaron plásmidos: una cepa no tuvo MOB (PE119), 6 cepas portaron solamente MOB_{H2} (PE137, PE139, PE177, PE184, PE228, PE231), 2 cepas portaron MOB_{P11} y MOB_{H2} (PE238 y PE239) y 2 cepas portaron MOB_{P14} y MOB_{H2} (PE193 y PE201) (Tabla 10). En las 8 cepas restantes portadoras de plásmidos (PE112, PE115, PE118, PE151, PE152, PE224, PE197 y PE175) se detectaron las relaxasas MOB_{P11} y MOB_{H2} (Tabla 10).

Tabla 10. Tipo de relaxasas MOB encontradas en las cepas portadoras y no portadoras de plásmidos del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla.

Cepa	Servicio	Origen de aislamiento	MOB
PE119	UCI	Urocultivo	-
PE137	Cirugía H	Expectoración	H2
PE139	Urología	Urocultivo	H2
PE177	MI	Hemocultivo	H2
PE184	MI	CLB	H2
PE193	Urología (CE)	Urocultivo	P14, H2
PE201	Cardiología H	Urocultivo	P14, H2
PE228	MI	Urocultivo	H2
PE231	MI	Exudado faríngeo	H2
PE238	MI	Urocultivo	P11, H2
PE239	MI	Urocultivo	P11, H2
PE112	MI	Urocultivo	P11, H2
PE115	MI	Urocultivo	P11, H2
PE118	MI	Urocultivo	P11, H2
PE151	MI	Urocultivo	P11, H2
PE152	MI	CCVC	P11, H2
PE224	MI	Urocultivo	P11, H2
PE197	Urología	Urocultivo	P11, H2
PE175	Ginecología	Urocultivo	P11, H2

UCI: Unidad de cuidados intensivos, MI: Medicina interna, CLB: Cultivo de lavado bronquial, CCVC: Cultivo de catéter venoso central

Determinación del número de plásmidos y su peso molecular por PFGE-S1

Utilizamos PFGE-S1 para conocer la cantidad y el peso molecular de los plásmidos, ya que la técnica de Kieser favorece la formación de isoformas de plásmidos y no es ideal para la visualización de plásmidos de bajo número de copias. Incluimos a las 8 cepas que presentaron bandas plasmídicas por el método de Kieser (PE112, PE115, PE118, PE151, PE152, PE224, PE197, PE175) y también se incluyeron las cepas PE193, PE201, PE238 y PE239 portadoras de relaxasas de plásmidos (MOB_{P11} y MOB_{P14}). Un total de 10 cepas portadoras de *bla*_{IMP} y/o *bla*_{GES} presentaron de 1 a 2 plásmidos con tamaños que van desde 27 hasta 126 kb aproximadamente (Figura 7 y Tabla 11). Asimismo, esta técnica nos permitió visualizar plásmidos en las cepas PE201 y PE239, que no pudimos visualizar con la técnica de Kieser.

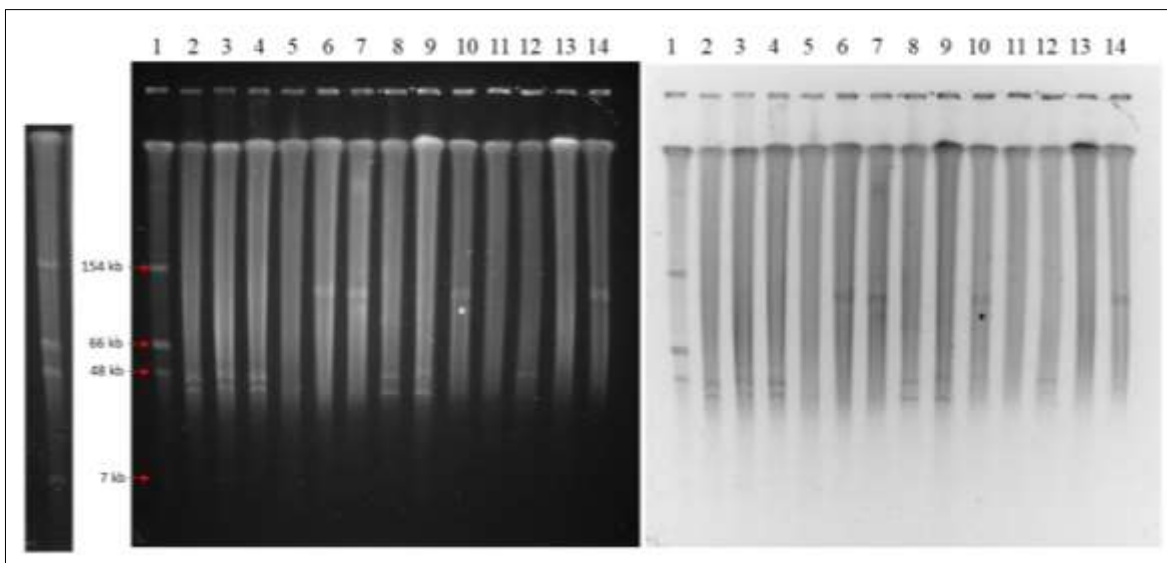


Figura 7. PFGE-S1 de las cepas provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla. 1, Cepa control *E. coli* NCTC 50192; 2, PE112; 3, PE115; 4, PE118; 5, PE146; 6, PE151; 7, PE152; 8, PE175; 9, PE197; 10, PE224; 11, PE193; 12, PE201; 13, PE238; 14, PE239.

Tabla 11. Características de cepas de *P. aeruginosa* portadoras de plásmidos del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla.

Cepa	Servicio	Origen de aislamiento	Genotipo de resistencia	No. plásmidos	Tamaño (kb)	MOB
PE112	MI	Urocultivo	<i>bla</i> _{IMP-83} , <i>bla</i> _{IMP-18} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aac</i> -(6')- <i>lb</i>	2	34, 29	<i>MOB</i> _{P111} , <i>MOB</i> _{H2}
PE115	MI	Urocultivo	<i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aac</i> -(6')- <i>lb</i>	2	34, 29	<i>MOB</i> _{P111} , <i>MOB</i> _{H2}
PE118	MI	Urocultivo	<i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aac</i> -(6')- <i>lb</i>	2	34, 29	<i>MOB</i> _{P111} , <i>MOB</i> _{H2}
PE151	MI	Urocultivo	<i>bla</i> _{IMP-99} , <i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aac</i> -(6')- <i>lb</i>	1	126	<i>MOB</i> _{P111} , <i>MOB</i> _{H2}
PE152	MI	CCVC	<i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aac</i> -(6')- <i>lb</i>	1	126	<i>MOB</i> _{P111} , <i>MOB</i> _{H2}
PE224	MI	Urocultivo	<i>bla</i> _{IMP-99} , <i>bla</i> _{GES-9} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aac</i> -(6')- <i>lb</i>	1	126	<i>MOB</i> _{P111} , <i>MOB</i> _{H2}
PE197	Urología	Urocultivo	<i>bla</i> _{IMP-18} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aac</i> -(6')- <i>lb</i>	2	37, 27	<i>MOB</i> _{P111} , <i>MOB</i> _{H2}
PE175	Ginecología	Urocultivo	<i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-50}	2	37, 27	<i>MOB</i> _{P111} , <i>MOB</i> _{H2}
PE201	Cardiología H	Urocultivo	<i>bla</i> _{IMP?} , <i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aac</i> -(6')- <i>lb</i>	1	35	<i>MOB</i> _{P14} , <i>MOB</i> _{H2}
PE239	MI	Urocultivo	<i>bla</i> _{IMP} , <i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>aac</i> -(6')- <i>lb</i>	1	126	<i>MOB</i> _{P111} , <i>MOB</i> _{H2}

MI: Medicina interna, CCVC: Cultivo de catéter venoso central. Las cepas marcadas con el mismo color, ya sea verde, azul o amarillo, fueron aisladas del mismo paciente. Los alelos de *bla*_{IMP} de color rojo fueron determinados mediante secuenciación Sanger y los alelos de color azul se determinaron con secuenciación Illumina y minION.

Posteriormente, las cepas PE112, PE151 y PE201 se eligieron para determinar el alelo de su *bla*_{IMP} por la tecnología de secuenciación de Sanger, ya que cuentan con diferentes características y fueron aisladas de diferentes pacientes (Tabla 11). Como se puede observar en la Tabla 10, la cepa PE112 portó la variante *bla*_{IMP-83} (Anexo figura I). Sin embargo, en la cepa PE201 no se pudo diferenciar si portaba la variante *bla*_{IMP-18} o *bla*_{IMP-56}, debido a que el cambio aminoacídico que las diferencia está posicionado 24 aminoácidos río abajo de la secuencia obtenida por Sanger (Anexo figura II). Por último, en la cepa PE151 identificamos la nueva variante *bla*_{IMP-99}, que difiere de *bla*_{IMP-83} por una sustitución del aminoácido Valina por Serina en la posición 69 (V69S) (Anexo figura III). La secuencia de nucleótidos de *bla*_{IMP-99} fue depositada en la base de datos del GenBank bajo el número de acceso **OQ533023**.

Relación clonal de las cepas de *P. aeruginosa*

La relación clonal por PFGE se estudió en las 13 cepas portadoras de plásmidos y/o MOB_P (PE238, PE197, PE112, PE115, PE118, PE176, PE146, PE151, PE224, PE239, PE152, PE193, PE201), y se incluyó la cepa de referencia PAO1. Se consideraron genéticamente relacionados los aislamientos que mostraron un coeficiente de Dice $\geq 80\%$. Detectamos un total de 12 patrones diferentes, siendo las cepas PE112 y PE115 provenientes del mismo paciente, las únicas que tuvieron relación clonal (Figura 8). Además, observamos que las 13 cepas se agruparon en 4 principales clados (encerrados en color azul, verde, naranja y turquesa en la figura 8), lo cual nos sirvió para seleccionar 4 cepas representativas (PE112, PE151, PE197 y PE224) con la finalidad de secuenciar su genoma completo. Cabe destacar que no se seleccionaron cepas del clado 4 (marcado en color azul) porque la cepa PE193 no portaba plásmidos y el alelo de *bla*_{IMP} de la cepa PE201 podría ser *bla*_{IMP-18} o *bla*_{IMP-56} y ya habíamos seleccionado cepas portadoras de dichos alelos.

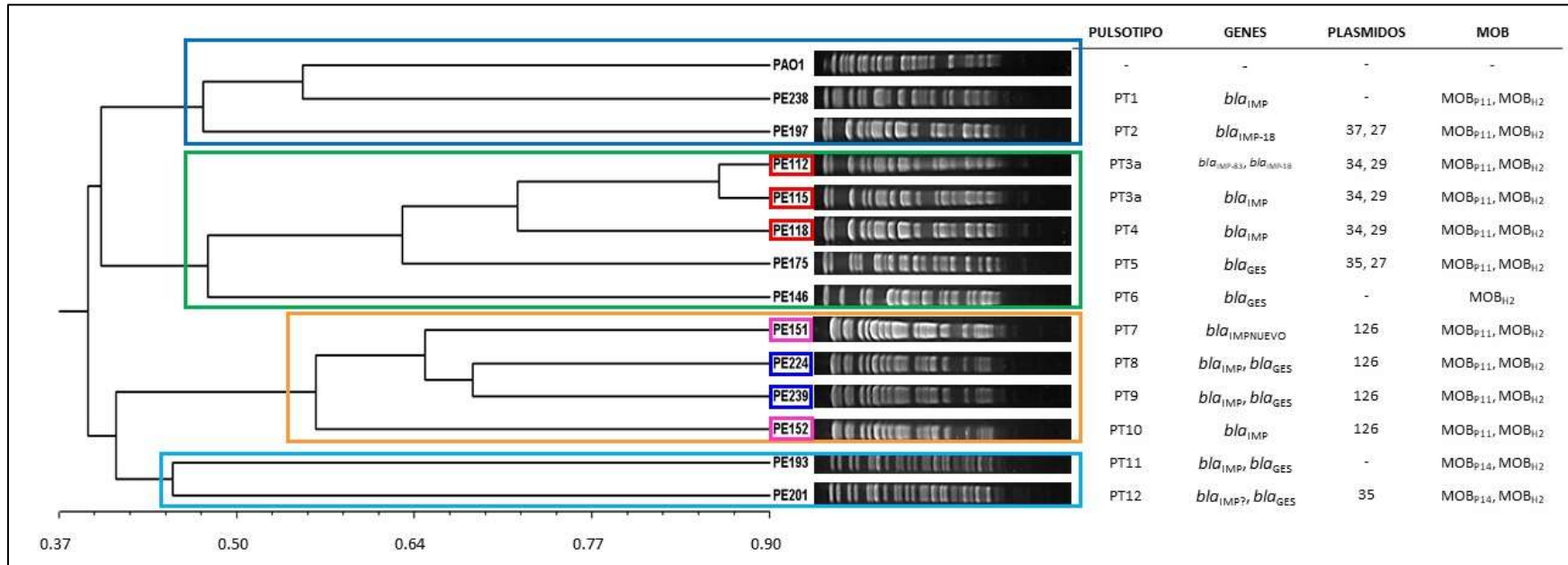


Figura 8. Determinación de la relación clonal de las cepas portadoras de plásmidos y/o MOB_p del Hospital Regional I.S.S.T.E de Puebla. Los aislados que mostraron un coeficiente de Dice $\geq 80\%$ fueron considerados como clonalmente relacionados. Las cepas aisladas del mismo paciente se encuentran encerradas en rectángulos del mismo color (rojo, azul y rosa). Las cepas PE112, PE115, PE118 son del mismo paciente y están en el clado 2 (verde); las cepas PE151 y PE152 del mismo paciente y las cepas PE224, PE239 del mismo paciente se encuentran en el clado 3 (naranja).

Genómica comparativa de *P. aeruginosa* aisladas de diferentes nichos

Para realizar el estudio de genómica comparativa se incluyeron genomas de solamente cuatro cepas (PE21, PE52, PE63 y PE83) parcialmente estudiadas por López-García *et al.*, 2019, ya que teníamos más información de estas cuando iniciamos el estudio. Las cepas PE52, PE63 y PE83 fueron aisladas de muestras de orina, y la cepa PE21 se aisló a partir de esputo. Todas fueron multidrogorresistentes y resistentes a carbapenémicos y provenían del Hospital Regional ISSSTE de Puebla. Se compararon con genomas de aislados en otros países y provenientes de tres fuentes de aislamiento (orina, esputo y ambiental). La finalidad de este análisis fue conocer si hay variaciones en los genes de resistencia, elementos genéticos móviles y genes de virulencia según el nicho ecológico.

La calidad de las lecturas se analizó con FastQC y se realizaron múltiples ensamblajes *de novo* con SPAdes, Velvet, platanus y Abbys. Todos los ensamblajes *de novo* obtenidos con los programas antes mencionados, se evaluaron con QUAST y elegimos los que tuvieron mejor calidad para posteriormente realizar un ensamblaje final de mejor calidad con Metassembler. Las características de los ensamblajes finales se muestran en la tabla 12 y Anexo figura IV.

Las secuencias de los ensamblajes fueron depositadas en la base de datos del GenBank bajo los números de acceso JARDUV000000000 (PE21), JARDUU000000000 (PE52), JARDUW000000000 (PE63) y JARDUX000000000 (PE83).

Tabla 12. Características generales de los ensamblajes *de novo* de las cepas de *P. aeruginosa* PE21, PE52, PE63 y PE83.

Características de los genomas	PE21	PE52	PE63	PE83
Total de contigs	101	47	26	103
N50	199,338	668,905	480,098	197,737
Contenido de G+C (pb)	65.47	66.14	66.57	65.51
Tamaño del genoma (pb)	7,388,095	6,786,596	6,235,658	7,342,540
Numero de genes	6,961	6,348	5,735	6,924
Numero de secuencias codificantes (CDS)	6,884	6,274	5,662	6,847

El número de genes y CDS se determinó a partir de los resultados de las anotaciones de Prokka

Adicionalmente, se incluyeron 59 genomas completos de la base de datos del GenBank que se descargaron en orden de aparición y que estaban disponibles hasta junio del 2021 (Tabla 13). Diecinueve genomas fueron de cepas aisladas de muestras urinarias, 20 de muestras de esputo (pacientes sin fibrosis quística) y 20 genomas de cepas aisladas del medio ambiente. Además, se incluyeron los genomas de las cepas de referencia *P. aeruginosa* PAO1 y PA14 (Tabla 13).

Características generales de los genomas de *P. aeruginosa*

Los genomas de las cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla tuvieron un promedio de contenido de G+C del 65.9% y los tamaños oscilaban entre 6,235,658 y 7,388,095 pb. En cambio, el promedio del tamaño de los genomas de las cepas urinarias, de esputo y ambientales de la base de datos del GenBank fueron de 6,831,303 pb, 7,013,391 pb y 6,627,270 pb, respectivamente. Es importante destacar que el tamaño de los genomas de las cepas PE21 y PE83 fueron mayor que el de los genomas del GenBank.

Tabla 13. Características generales de los genomas de *P. aeruginosa* incluidos en este estudio.

Cepa	No. acceso	ST	Origen de aislamiento	País de origen	Tamaño (pb)	Genotipo de resistencia
UCBPP-PA14	CP000438.1	253	-	-	6,537,648	<i>crpP</i> , <i>fosA</i> , <i>catB7</i> , <i>bla</i> _{OXA-488} , <i>bla</i> _{PAO} , <i>aph</i> (3')-I lb
PAO1	NC_002516.2	549	Burn wound isolate	-	6,264,404	<i>aph</i> (3')-I lb , <i>catB7</i> , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>bla</i> _{PAO} , <i>fosA</i>
PE21	JARDUV000000000	167	Sputum	Mexico	7,388,095	<i>aph</i> (3')-I lb , <i>aac</i> (6')-I l , <i>aadA1b</i> , <i>aph</i> (3')-V ia , <i>aph</i> (3')-I lb , <i>aadA6</i> , <i>aac</i> (6')-33, <i>sul1</i> , <i>catB7</i> , <i>catA1</i> , <i>bla</i> _{GES-32} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{IMP-62} , <i>bla</i> _{OXA-494} , <i>bla</i> _{PAO} , <i>fosA</i>
PE52	JARDUU000000000	2731	Urine	Mexico	6,786,596	<i>aph</i> (3')-I lb , <i>aadA1b</i> , <i>fosA</i> , <i>sul1</i> , <i>catB7</i> , <i>bla</i> _{PAO} , <i>bla</i> _{IMP-56} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-396}
PE63	JARDUW000000000	549	Urine	Mexico	6,235,658	<i>aph</i> (3')-I lb , <i>catB7</i> , <i>bla</i> _{OXA-50} , <i>bla</i> _{PAO} , <i>fosA</i>
PE83	JARDUX000000000	167	Urine	Mexico	7,342,540	<i>qnrVC1</i> , <i>aac</i> (6')-I l , <i>aph</i> (3')-V ia , <i>aadA1b</i> , <i>aadA6</i> , <i>aph</i> (3')-I lb , <i>fosA</i> , <i>sul1</i> , <i>dfrA15</i> , <i>catB7</i> , <i>catA1</i> , <i>bla</i> _{PAO} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{OXA-494} , <i>bla</i> _{IMP-62}
97	NZ_CP031449.2	234	Urine	Ghana: Kumasi	6,925,889	<i>crpP</i> , <i>qnrVC1</i> , <i>aadA1</i> , <i>aac</i> (6')-I b3, <i>aac</i>(6')-Ila, <i>aph</i>(3')-Il, <i>aadA10</i>, <i>fosA</i>, <i>dfrB5</i>, <i>sul1</i>, <i>catB7</i>, <i>arr-2</i>, <i>bla</i>_{IMP-1}, <i>bla</i>_{OXA-486}, <i>bla</i>_{DIM-1}, <i>bla</i>_{OXA-10}, <i>bla</i>_{PAO}, <i>bla</i>_{OXA-129}
A-I-1	NZ_CP060243.1	111	Urine	Francia: Rouen	7,087,087	<i>crpP</i> , <i>aph</i> (3')-I lb , <i>aac</i> (6')-I b3, <i>aadA2b</i>, <i>fosA</i>, <i>sul1</i>, <i>catB7</i>, <i>bla</i>_{PAO}, <i>cmiA2</i>, <i>bla</i>_{OXA-9}, <i>bla</i>_{OXA-395}, <i>bla</i>_{CARB-2}, <i>aacA</i>(6')-Ilb
B-I-1	NZ_CP060242.1	235	Urine	France: Rouen	6,935,851	<i>aadA11</i> , <i>aph</i> (3')-I lb , <i>aac</i> (6')-I b3, <i>ant</i>(2'')-Ia, <i>fosA</i>, <i>sul1</i>, <i>dfrB1</i>, <i>bla</i>_{OXA-488}, <i>bla</i>_{PAO}, <i>bla</i>_{OXA-35}
CCUG 51971	NZ_CP043328.1	235	Urine	Sweden: Solna	7,012,798	<i>crpP</i> , <i>fosA</i> , <i>aph</i> (3')-I lb , <i>aac</i> (6')-I b3, <i>sul1</i>, <i>catB7</i>, <i>arr-7</i>, <i>bla</i>_{PAO}, <i>bla</i>_{OXA-35}, <i>bla</i>_{VIM-4}, <i>bla</i>_{OXA-488}

C-I-1	NZ_CP060241.1	3227	Urine	France: Rouen	6,325,392	<i>aph(3')-II, catB7, bla_{PAO}, bla_{OXA-50}, fosA</i>
F5677	NZ_CP026680.1	111	Urine	USA: New York	6,645,227	<i>crpP, aph(3')-Ib, aph(3')-II, aph(6')-Id, catB7, bla_{OXA-395}, bla_{PAO}, fosA</i>
G-I-1	NZ_CP060240.1	232	Urine	France: Rouen	6,480,192	<i>crpP, aph(3')-Ib, catB7, bla_{PAO}, bla_{OXA-396}, fosA</i>
IMP-13	C: NZ_CP034354.1 P: NZ_CP034355.1	621	Urine	Belgium	C: 7,047,704 P: 130,306	<i>crpP, fosA, aph(3')-Ib, aac(6')-Ib4, aph(3')-VI, sul1, catB7, bla_{OXA-914}, bla_{IMP-13}, bla_{PAO}</i>
NCGM257	NZ_AP014651.1	357	Urine	Japan	7,090,694	<i>crpP, aadA2, ant(2'')-Ia, aph(3')-Ib, fosA, sul1, tet(G), catB7, bla_{IMP-1}, bla_{OXA-4}, bla_{OXA-846}, bla_{PAO}, floR2</i>
PA1088	NZ_CP015001.1	277	Urine	Brazil: Sao Paulo, SP	6,721,480	<i>crpP, fosA, aadA7, aph(3')-Ib, aac(6')-Ib, rmtD1, sul1, cmx, catB7, bla_{OXA-56}, bla_{PAO}, bla_{OXA-494}, bla_{SPM-1}</i>
PB353	C: NZ_CP025051.1 P: NZ_CP025052.1	Unknown	Urine	USA: New York	C: 6,437,515 P: 59,923	<i>aph(3')-Ib, catB7, bla_{PAO}, bla_{OXA-50}, fosA, aac(6')-Ib, aac(6')-Ib4, sul1, bla_{TEM-1B}, bla_{OXA-101}, bla_{CTX-M-30}</i>
PSE6684	NZ_CP053917.1	773	Urine	South Korea	6,924,367	<i>qnrVC1, aac(6')-Ib, fosA, tet(G), aadA, sul1, aph(3')-Ib, rmtB4, catB7, arr-2, bla_{NDM-1}, bla_{PAO}, bla_{OXA-796}, bla_{OXA-395}</i>
ST773	NZ_CP041945.1	773	Urine	USA: Houston	6,835,731	<i>qnrVC1, rmtB4, aph(3')-Ib, aadA, fosA, sul1, tet(G), catB7, bla_{NDM-1}, bla_{OXA-395}, bla_{PAO}</i>
PA790	CP075176.1	773	Urine	India: Lucknow	6,932,250	<i>qnrVC1, rmtB, aph(3')-Ib, fosA, sul1, tet(G), catB7, aadA, bla_{OXA-395}, bla_{NDM-1}, bla_{PAO}</i>
ZBX-P12	CP061779.1	233	Urine	Lebanon:Beirut	7,080,089	<i>crpP, aac(6')-Ib, fosA, aac(6')-Ic, aph(3')-Ib, aadA2, sul1, cmlA1, catB7, bla_{OXA-4}, bla_{IMP-15}, bla_{OXA-486}, bla_{PAO}</i>
PAM68	CP065948.1	1639	Urine	China: Shaanxi	6,560,248	<i>crpP, aph(3')-Ib, catB7, bla_{OXA-486}, bla_{PAO}, fosA</i>
PAS6	CP065947.1	1639	Urine	China: Shaanxi	6,742,928	<i>crpP, aph(3')-Ib, catB7, bla_{OXA-50}, bla_{PAO}, fosA</i>
PAG7	CP065374.1	1639	Urine	China: Shaanxi	6,715,242	<i>crpP, fosA, catB7, bla_{OXA-50}, bla_{PAO}, aph(3')-Ib</i>
SE5429	CP054845.1	235	Urine	China: Jiangsu	7,103,853	<i>crpP, fosA, aadA1, aac(3)-Iid, aph(3')-VI, aph(3')-Ib, sul1, cml, catB7, bla_{PAO}, bla_{VEB-3}, bla_{OXA-488}, bla_{OXA-10}</i>
1811-13R031	NZ_CP046061.1	395	Sputum (lung infection)	China	7,344,079	<i>crpP, aph(3')-Ib, catB7, bla_{OXA-905}, bla_{PAO}, fosA</i>
1811-18R001	NZ_CP046060.1	395	Sputum (lung infection)	China	7,343,000	<i>crpP, fosA, catB7, bla_{PAO}, bla_{OXA-905}, aph(3')-Ib</i>
60503	C: NZ_CP041774.1 P: NZ_MN208063.1	773	Sputum (pneumonia)	China: Beijing	C: 6,809,062 P: 407,628	<i>crpP, aph(3')-Ib, bla_{OXA-395}, bla_{PAO}, fosA, aph(6)-Id, aadA1, qnrVC6, sul1, dfrA1, dfrB2c, bla_{OXA-4}, bla_{NDM-1}, catB3, aph(3')-Ib, aac(6')-Ib</i>
1903031130	CP060392.1	235	Sputum (pneumonia)	China: Henan	6,905,506	<i>fosA, aph(3')-Ib, aph(3')-XV, sul1, aadA6, tet(G), catB7, bla_{GES-15}, bla_{PAO}, bla_{OXA-488}, aac(6')-Ib4</i>
AG1	NZ_CP045739.1	111	Sputum-lungs (Pneumonia)	Costa Rica	7,190,208	<i>crpP, fosA, aph(3')-Ib, aac(6')-29a, aac(6')-29b, sul1, catB7, bla_{OXA-2}, bla_{IMP-18}, bla_{PAO}, bla_{VIM-2}, bla_{OXA-395}</i>
LW	NZ_CP022478.1	1182	Sputum (infection)	China: Beijing	6,824,837	<i>crpP, aph(3')-Ib, catB7, bla_{OXA-851}, bla_{PAO}, fosA</i>
PA19-3047	CP068239.1	235	Sputum (bronchiectasis)	China	6,857,397	<i>crpP, ant(2'')-Ia, aac(6')-Ib, aadA6, aph(3')-Ib, fosA, sul1, dfrA5, cmx, catB3, catB7, bla_{PER-4}, bla_{PAO}, bla_{OXA-488}, bla_{OXA-17}, bla_{OXA-129}, aac(6')-Ib'</i>
PASGNDM345	NZ_CP020703.1	308	Sputum	Singapore	6,893,164	<i>aadA, aph(3')-Ib, aph(3')-Ib, aac(6')-II, aph(6)-Id, aac(3)-Id, fosA, msr(E), sul2, dfrB5, floR, catB7, bla_{OXA-488}, bla_{PAO}, bla_{NDM-1}, qnrVC1, crpP</i>
PASGNDM699	NZ_CP020704.1	308	Sputum	Singapore	6,985,102	<i>qnrVC1, crpP, fosA, aadA, aac(3)-Id, aph(3')-Ib, aph(3')-Ib, aph(6)-Id, aac(6')-II, msr(E), dfrB5, sul2, floR, catB7, bla_{PAO}, bla_{NDM-1}, bla_{OXA-488}</i>
PB350	NZ_CP025055.2	235	Sputum	USA: New York	6,752,906	<i>sul1, dfrA10, fosA, catB7, bla_{PAO}, bla_{OXA-488}, ant(2'')-Ia, aph(3')-Ib</i>

R31	C: NZ_CP061850.1; P: NZ_CP061851.1	Unknown	Sputum	China: chongqing	C: 6,893,878 P: 29,402	<i>crpP</i> , <i>aph(3')-lib</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>bla_{OXA-486}</i> , <i>fosA</i> , <i>bla_{KPC-2}</i>
SE5352	CP054843.1	235	Sputum	China: Jiangsu	6,904,218	<i>fosA</i> , <i>aadA6</i> , <i>sul1</i> , <i>aac(6')-Ib4</i> , <i>aph(3')-XV</i> , <i>aph(3')-Iib</i> , <i>tet(G)</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>bla_{GES-1}</i> , <i>bla_{OXA-488}</i>
SE5357	CP054844.1	244	Sputum	China: Jiangsu	7,043,467	<i>crpP</i> , <i>aph(3')-Ib</i> , <i>aph(3')-Iib</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>aadA5</i> , <i>fosA</i> , <i>sul1</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{PER-1}</i> , <i>bla_{OXA-101}</i> , <i>bla_{OXA-847}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>aph(6)-IId</i>
SE5416	C: NZ_CP046404.1 P: NZ_MN894887.1	697	Sputum (Infection caused by fracture)	China: Suzhou	C: 6,874,270 P: 510,711	<i>crpP</i> , <i>aph(3')-Iib</i> , <i>aadA1</i> , <i>fosA</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(G)</i> , <i>catB7</i> , <i>cmlA1</i> , <i>bla_{OXA-494}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>mph(A)</i> , <i>qnrS2</i> , <i>tet(G)</i> , <i>bla_{TEM-1}</i> , <i>bla_{KPC-2}</i> , <i>qacE</i> , <i>aac(3)-IIIId</i>
SP4371	NZ_CP034369.1	357	Sputum (Bacteraemia)	India	6,937,609	<i>msr(E)</i> , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aadA1</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aac(6')-II</i> , <i>aph(3')-lib</i> , <i>fosA</i> , <i>sul1</i> , <i>dfrB2</i> , <i>tet(A)</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{OXA-10}</i> , <i>bla_{NDM-1}</i> , <i>bla_{EB-1}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>bla_{PME-1}</i> , <i>bla_{OXA-846}</i> , <i>crpP</i>
SP4527	NZ_CP034409.1	357	Sputum (Bacteraemia)	India	7,005,215	<i>msr(E)</i> , <i>fosA</i> , <i>aac(6')-II</i> , <i>aadA1</i> , <i>aph(3')-VI</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aph(3')-lib</i> , <i>sul1</i> , <i>dfrB2</i> , <i>tet(A)</i> , <i>catB7</i> , <i>cmlA1</i> , <i>arr-3</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>bla_{OXA-846}</i> , <i>bla_{OXA-10}</i> , <i>bla_{NDM-1}</i> , <i>bla_{PME-1}</i> , <i>bla_{EB-1}</i> , <i>msr(E)</i> , <i>crpP</i>
SP4528	NZ_CP033439.1	357	Sputum (Respiratory tract infection)	India	6,877,287	<i>crpP</i> , <i>fosA</i> , <i>sul1</i> , <i>dfrB2</i> , <i>aac(6')-II</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadA1</i> , <i>aph(3')-lib</i> , <i>msr(E)</i> , <i>tet(A)</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{NDM-1}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>bla_{OXA-846}</i> , <i>bla_{OXA-10}</i> , <i>bla_{EB-1}</i> , <i>bla_{PME-1}</i>
Y31	NZ_CP030910.1	Unknown	Sputum (Pneumonia)	South Korea: Seoul	6,831,076	<i>crpP</i> , <i>fosA</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>bla_{OXA-486}</i> , <i>aph(6)- IId</i> , <i>aph(3')-lib</i> , <i>aac(2'')-IIa</i> , <i>aph(3'')-Ib</i>
Y71	NZ_CP030911.1	245	Sputum (Pneumonia)	South Korea: Seoul	6,940,949	<i>crpP</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aph(3')-lib</i> , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-31</i> , <i>fosA</i> , <i>sul1</i> , <i>catB7</i> , <i>cmx</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>bla_{OXA-494}</i> , <i>bla_{OXA-1}</i>
Y82	NZ_CP030912.1	111	Sputum (Pneumonia)	South Korea: Seoul	7,106,857	<i>crpP</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aph(3')-lib</i> , <i>aac(6')-31</i> , <i>fosA</i> , <i>sul1</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>bla_{OXA-395}</i> , <i>bla_{OXA-1}</i>
ACR22	NZ_CP058331.1	Unknown	Sugarcane	China: Nanning	6,490,021	<i>fosA</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>bla_{OXA-486}</i> , <i>aph(3')-lib</i>
AJ D 2	NZ_CP038661.1	234	Rhizosphere	India	6,281,520	<i>fosA</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>bla_{OXA-486}</i> , <i>aph(3')-lib</i>
B10W	NZ_CP017969.1	308	wastewater	USA: Honolulu	6,723,378	<i>crpP</i> , <i>aph(3')-lib</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>bla_{OXA-488}</i> , <i>fosA</i>
CFSAN084950	NZ_CP045768.1	Unknown	Arugula	USA:GA	6,441,924	<i>fosA</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>bla_{OXA-494}</i> , <i>aph(3')-lib</i>
DN1	C: NZ_CP017099.1; P: NZ_CP018048.1	316	Soil	China	C: 6,641,902 P: 317,349	<i>crpP</i> , <i>aph(3')-lib</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>bla_{OXA-395}</i> , <i>fosA</i>
FA-HZ1	NZ_CP017353.1	27	wastewater	China	6,866,790	<i>crpP</i> , <i>fosA</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>bla_{OXA-494}</i> , <i>aph(3')- lib</i>
HS9	NZ_CP030861.1	27	Soil	China: Shanghai	6,876,988	<i>crpP</i> , <i>fosA</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{OXA-494}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>aph(3')- lib</i>
JB2	NZ_CP028917.1	296	Soil	USA: Madison, WI	6,867,314	<i>crpP</i> , <i>fosA</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{OXA-488}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>aph(3')- lib</i>
JT86	NZ_CP062219.1	970	Soil	China: Guangzhou	6,520,277	<i>fosA</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{OXA-50}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>aph(3')-lib</i>
KRP1	NZ_CP046069.1	27	Methanogenic sludge from a potato processing plant	Belgium: Primeur, Waregem	6,737,396	<i>crpP</i> , <i>fosA</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{OXA-494}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>aph(3')- lib</i>
L10	NZ_CP019338.1	253	halobiotic reed	China: Binzhou	6,661,962	<i>fosA</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{OXA-488}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>aph(3')-lib</i>
M8A1	NZ_CP015647.1	1054	crude oil wastewater	Colombia: Arauca	6,368,297	<i>fosA</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{OXA-396}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>aph(3')-lib</i>
N17-1	NZ_CP014948.1	2362	Soil	China: Haidian, Beijing	6,370,730	<i>crpP</i> , <i>fosA</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{OXA-494}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>aph(3')- lib</i>
Ocean-1155	NZ_CP022526.1	316	Open sea	Pacific Ocean	6,952,237	<i>crpP</i> , <i>fosA</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{OXA-395}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>aph(3')- lib</i>
Ocean-1175	NZ_CP022525.1	316	Open sea	Pacific Ocean	6,943,220	<i>crpP</i> , <i>fosA</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{OXA-395}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>aph(3')- lib</i>
PPF-1	NZ_CP023316.1	Unknown	Dental Unit Water Line	Canada: Montreal	6,930,893	<i>crpP</i> , <i>fosA</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{OXA-908}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>aph(3')- lib</i>
RD1-3	NZ_CP047697.1	257	landfill	China: Yangling	6,397,159	<i>fosA</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{OXA-1026}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>aph(3')-lib</i>
SJTD-1	NZ_CP015877.1	2619	Soil	China: Shanghai	6,243,825	<i>fosA</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{OXA-486}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>aph(3')-lib</i>

TJ2019-017	NZ_CP065866.1	241	Water	China: Tianjin	6,478,778	<i>crpP</i> , <i>fosA</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{OXA-1127}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>aph(3)-Ib</i>
YL84	NZ_CP007147.1	169	compost	Malaysia	6,433,441	<i>crpP</i> , <i>fosA</i> , <i>catB7</i> , <i>bla_{OXA-396}</i> , <i>bla_{PAO}</i> , <i>aph(3)-Ib</i>

La letra "C" significa Cromosoma y la "P", Plásmido

Tipificación de secuencias multilocus (MLST)

Posteriormente, se realizó la búsqueda del ST y se encontró que las cepas aisladas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla tuvieron los siguientes ST: PE21 y PE83 pertenecían al ST167, mientras que PE52 y PE63 pertenecían al ST2731 y ST549, respectivamente (Tabla 13). A continuación, buscamos si estos ST estaban relacionados con ST de clonas epidémicas de alto riesgo, encontrando que el ST167 estaba en el mismo grupo que el ST111, pero no pertenecían al mismo complejo clonal. Mientras que el ST de las cepas PE52 y PE63 no estaban asociadas a complejos clonales de ST de alto riesgo.

En el caso de los genomas descargados del GenBank, se observaron diferentes distribuciones de ST entre los genomas clínicos (orina y esputo) y los genomas ambientales. Los ST235 y ST773 de clones de alto riesgo (3 genomas de cada uno) fueron más prevalentes en los genomas de cepas de orina. Sin embargo, en los genomas de esputo, fueron mayormente encontrados los ST235 y ST357 (4 y 3, respectivamente) y el ST27 y ST316 (3 genomas cada uno) fueron más prevalentes en genomas de cepas ambientales. Es importante destacar que los ST235 y ST773 se encontraron exclusivamente en genomas clínicos, mientras que el ST27 sólo se encontró en genomas de cepas ambientales (Figura 9). Por último, un genoma ambiental (L10) pertenecía a ST253, que es el mismo ST que la cepa de referencia y altamente virulenta PA14 (Figura 9).

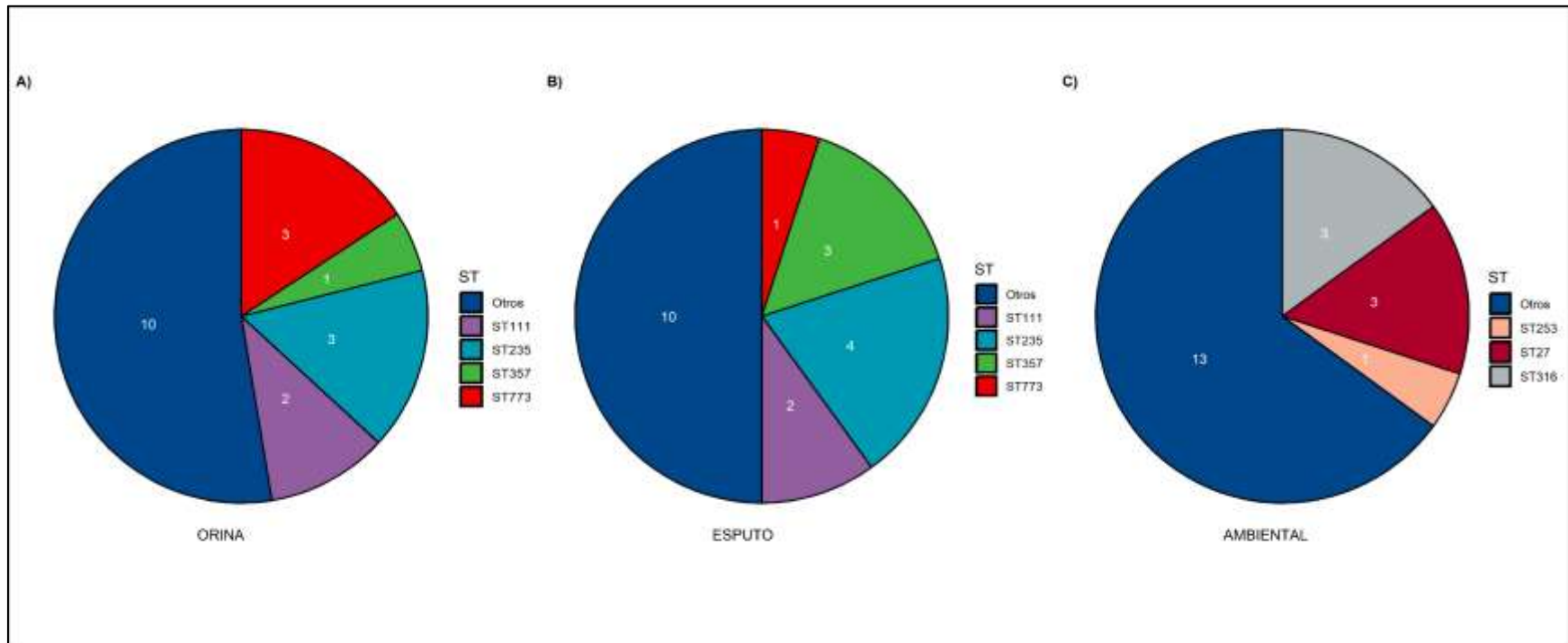


Figura 9. ST de los genomas de cepas de *P. aeruginosa* orina (A), de esputo (B) y ambientales (C). Se detectaron ST de clones de alto riesgo en los tres grupos: siendo más predominantes en las cepas de esputo (75%). Los ST235, ST111, ST773 y ST27 son de clones de alto riesgo.

Comparación genómica de las cepas del Hospital Regional I.S.S.T.E de Puebla

El análisis del pangenoma con Roary de las cepas PE21 aislada de esputo y PE52, PE63 y PE83 aisladas de orina identificó un total de 7,793 genes, de los cuales 5,327 genes pertenecen al *core*, 0 al *soft-core*, 2,466 genes al *shell* y 0 genes *cloud*. Por otro lado, también identificamos el número de genes compartidos y únicos entre los genomas, utilizando un diagrama de Venn (Figura 10). Se observó que la cepa PE83 compartía 1,068 genes con la cepa PE21, mientras que la cepa PE63 compartía 141 genes con la cepa de referencia PAO1. En cambio, PE21, PE52 y PE83 compartían uno, cuatro y cero genes, respectivamente, con la cepa PAO1 (Figura 10).

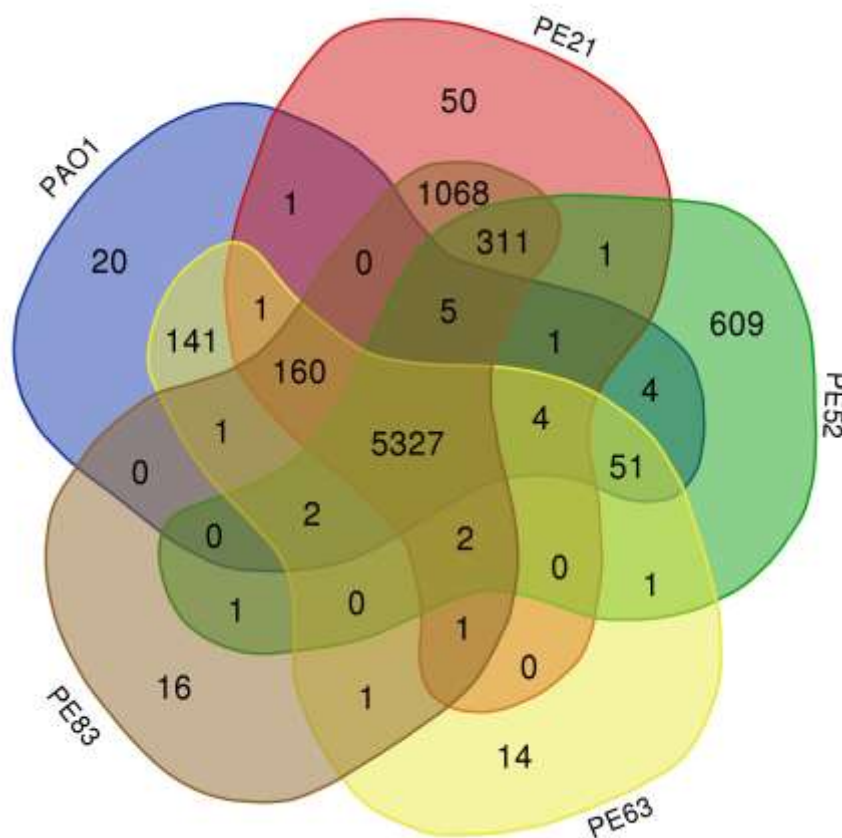


Figura 10. Comparación genómica de cepas de *P. aeruginosa* del Hospital Regional I.S.S.T.E de Puebla. El análisis pangenómico de Roary predijo el número de genes. La figura se creó utilizando Calculate and Draw Custom Venn Diagrams. El diagrama de Venn muestra el número de genes únicos y compartidos entre los genomas de las cepas PAO1, PE21, PE52, PE63 y PE83.

La cepa PE52 fue la que portó el mayor número de genes únicos (609 genes), seguida de las cepas PE21 (50 genes), PE83 (16 genes) y PE63 (14 genes). Entre los genes únicos de la cepa PE52, se observaron algunos que conforman la maquinaria de conjugación (*traG*, *viB11*, *virB4*, *virB10*, *mobA*), genes de resistencia a compuestos de amonio cuaternario (*sugE*), genes de resistencia al níquel y al cobalto (*cnrA*), genes de resistencia a la bleomicina (*ble*), genes de toxinas y antitoxinas (*colM*, *parD1*, *yhaV*), genes necesarios para la utilización de la vibriobactina (*viuB*), gen de la ADN helicasa dependiente de ATP (*pcrA*), y un gran número de proteínas hipotéticas (n= 491 (80.6%)).

Análisis del pangenoma de las cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla y del GenBank

Igualmente realizamos el análisis del pangenoma de los 59 genomas de cepas de *P. aeruginosa* descargados del GenBank (19 genomas de cepas urinarias, 20 genomas de cepas de esputo, 20 genomas de ambientales), los 4 genomas de las cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla y las 2 cepas de referencia PAO1 y PA14. El análisis mostró un total de 20,911 pan-genes, de los cuales 4,246 eran genes *core* (genes presentes en el 99-100% de los genomas), 898 eran genes del *soft-core* (genes presentes en el 95-99% de los genomas), 1,709 eran genes *shell* (genes presentes en el 15-95% de los genomas) y 14,058 eran genes *cloud* (genes presentes en el 0-15% de los genomas) (Figura 11).

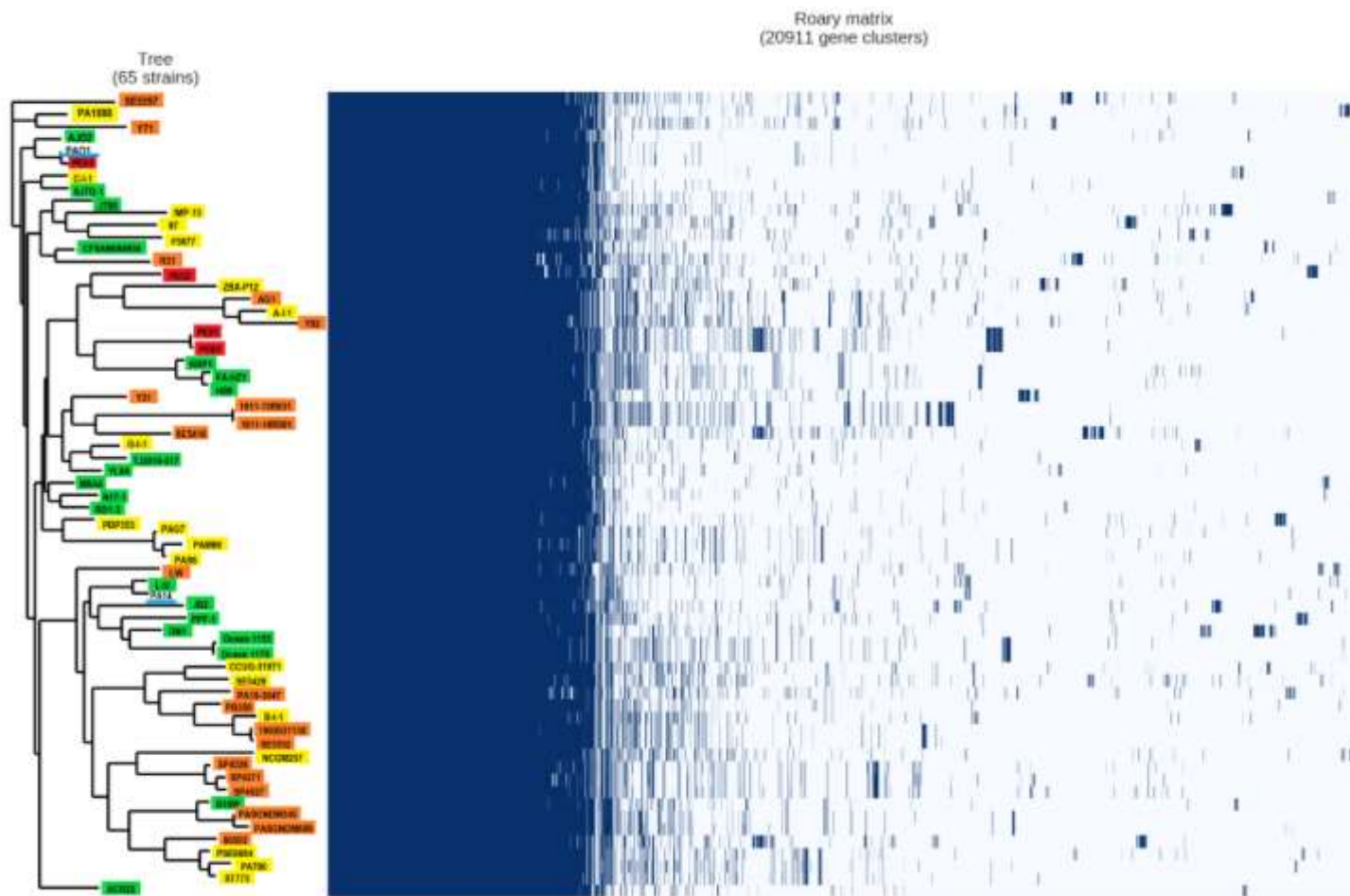


Figura 11. Representación gráfica del análisis del pangenoma de las 65 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. El árbol filogenético se construyó a partir del genoma accesorios de las 65 cepas. El análisis mostró un total de 20,911 pan-genes, de los cuales 4,246 eran genes *core*, 898 eran genes del *soft-core*, 1,709 eran genes *shell* y 14,058 eran genes *cloud*. Los nombres de las cepas se colorearon según la fuente de aislamiento. Amarillo: genomas urinarios; naranja: genomas de esputo; verde: genomas ambientales; rojo: genomas mexicanos; los genomas de referencia están subrayados en azul turquesa. El gráfico se realizó con Rstudio.

Es importante destacar que los genomas de las cepas ambientales (HS9, DN1, JB2, JT86, N17-1 y SJTD-1) tenían genes en el *soft-core* que algunas cepas clínicas no tenían. Estos genes podrían estar relacionados con la supervivencia de *P. aeruginosa* en el medio ambiente, como los genes de la bomba de eflujo de ácido p-hidroxibenzoico, la proteína quimiotaxis aceptora de metilo (*pctB*), la proteína cinasa serina/treonina (*rdoA*), la nitrito reductasa, la alcanosulfonato monooxigenasa, la proteína de membrana externa de la bomba de eflujo multidroga/disolvente (*mepC*), la proteína permeasa del sistema de transporte de lactosa (*lacF*) y la glucógeno sintasa (Figura 11).

Posteriormente, construimos un dendrograma basado en el genoma accesorio, en el cual observamos que los genomas se agrupaban con respecto al ST pero no con respecto a sus nichos (Figura 12). Con excepción de dos genomas: un genoma perteneciente a ST111 (F5677) que se agrupó en un clado con cepas de diferentes ST, y los genomas con ST234 (97 y AJD2) que no se agruparon en el mismo clado (Figura 12). La agrupación de los genomas con respecto al ST también fue observado en los árboles filogenéticos basados en el *core*, SNPs y MLST (Figura 13; Anexo figura V y VI).

En el caso del genoma PPF-1, el cual tiene ST desconocido, se agrupó con los genomas pertenecientes al ST316 (Figura 12), y analizando los alelos encontramos que el ST de PPF-1 sólo variaba en un alelo en comparación con el ST316 (*aroE_13* y *aroE_8*, respectivamente).

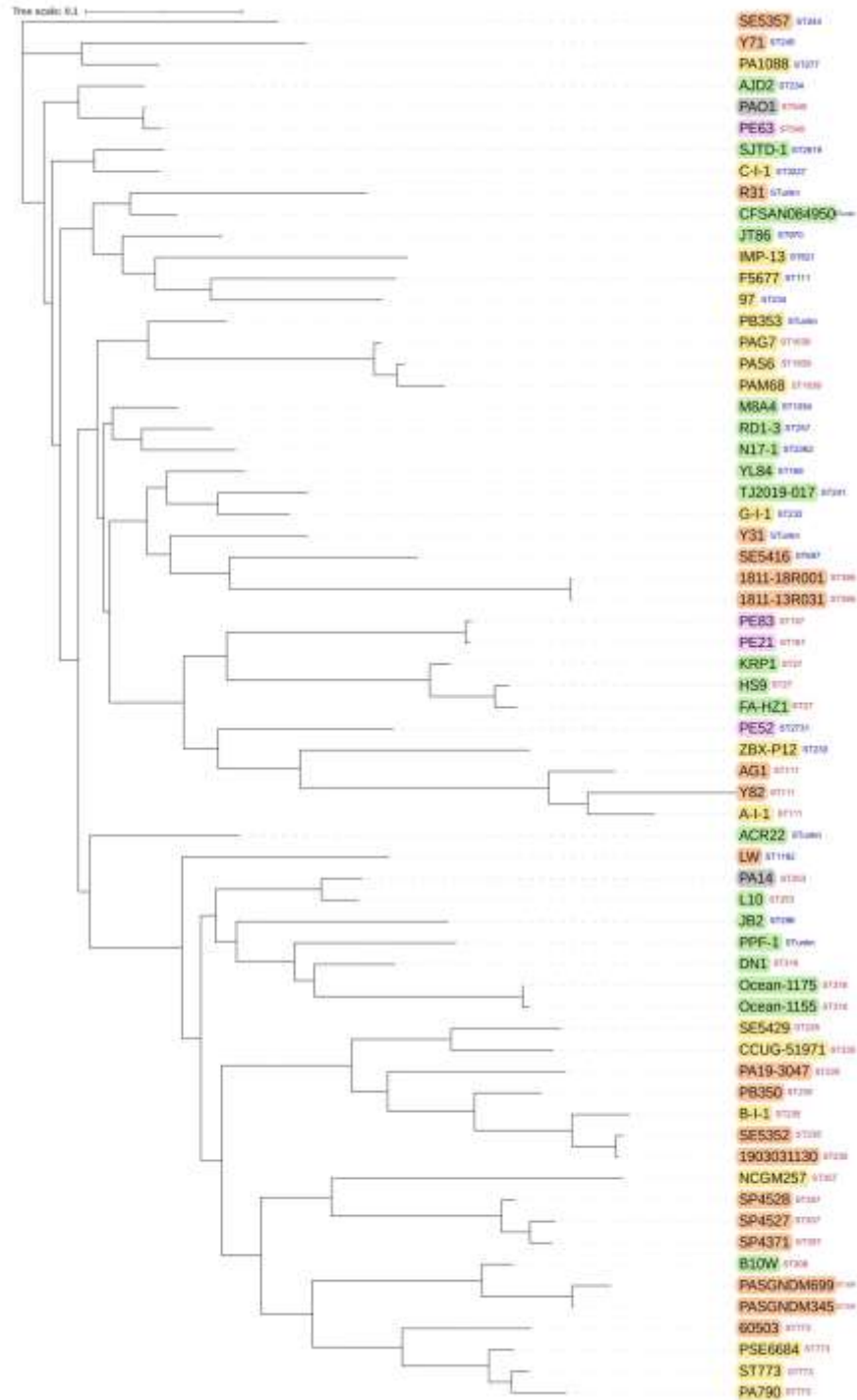


Figura 12. Dendrograma basado en la presencia y ausencia del genoma accesorio de las 65 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Los nombres de las cepas se colorearon según la fuente de aislamiento. Amarillo: cepas urinarias; Naranja: cepas de esputo; Verde: cepas ambientales; Rosa: Cepas mexicanas; Gris: Cepas de referencia. Los ST en color rojo indica las cepas con el mismo ST y en azul son los restantes. El archivo newick de Roary fue visualizado con iTOL.

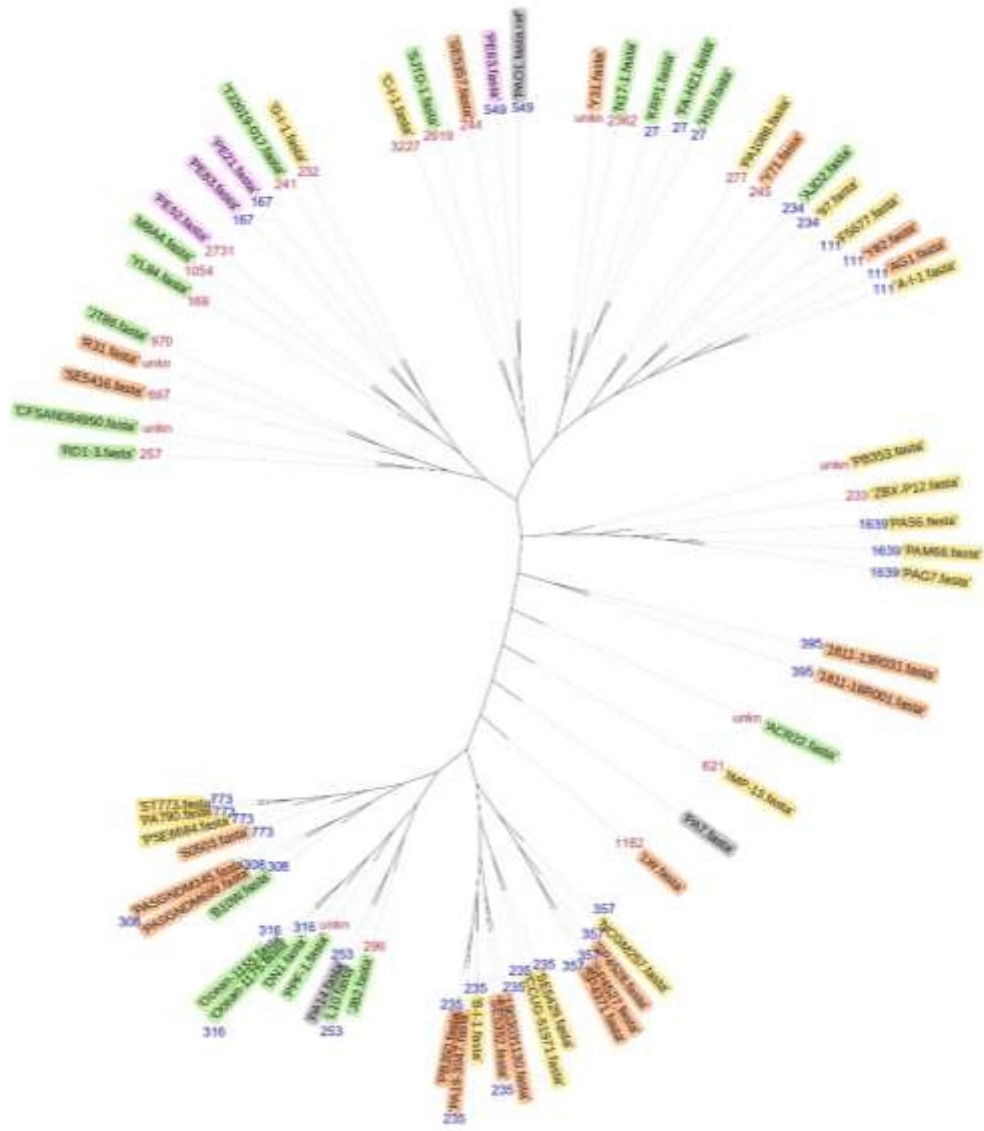


Figura 13. Árbol filogenético generado a partir de SNPs de genomas de *Pseudomonas aeruginosa*. Los nombres de las cepas se colorearon según la fuente de aislamiento. Amarillo: cepas urinarias; Naranja: cepas de esputo; Verde: cepas ambientales; Rosa: Cepas mexicanas; Gris: Cepas de referencia. Los números en color rojo indica las cepas con el mismo ST y en azul son los restantes. El archivo newick de Roary fue visualizado con iTOL.

Genes de resistencia a antibióticos

Se examinaron todos los genomas de las cepas para buscar genes de resistencia a los antibióticos usando ResFinder (Tabla 13). Los genes *bla*_{OXA-50-like} y *bla*_{PAO}, que confieren resistencia a beta-lactámicos, *fosA* a fosfomicina, y *aph(3')-lib* a aminoglucósidos, se identificaron en todos los genomas estudiados, incluidas las cepas de referencia PAO1, PA14 (Figura 14). Sin embargo, el gen *catB7* que confiere resistencia al cloranfenicol se encontró en todos los genomas, con excepción de B-I-1 y 60503 (Figura 14).

Dado que *bla*_{OXA-50-like} estaba presente en todos los genomas, se analizaron las variantes de esta familia para conocer si había diferente distribución entre los nichos estudiados. Se encontró que las variantes más comunes en las cepas urinarias y ambientales eran *bla*_{OXA-50} y *bla*_{OXA-494}, respectivamente, y *bla*_{OXA-488} era la más común en los genomas de cepas de esputo (Figura 15).

Los genomas urinarios presentaron genes de resistencia que no se encontraron en los otros nichos, como *bla*_{SPM-1}, *bla*_{CARB-2} y *bla*_{CTX-M-30}, que confieren resistencia a beta-lactámicos, y *arr2* y *arr7*, que confieren resistencia a rifampicina y variantes de *aadA2* y *rmt* (*rmtB4*, *rmtB4*, *rmtB4*, *rmtD1*) que confieren resistencia a los aminoglucósidos (Figura 14). Igualmente, se encontraron genes únicos en los genomas de esputo, como *bla*_{KPC-2}, variantes de *bla*_{GES}, *bla*_{PME} y *bla*_{PER}, que confieren resistencia a beta-lactámicos, *catB3*, que confiere resistencia al cloranfenicol; *arr3* (resistencia a la rifampicina), *msrE* (resistencia a la eritromicina), *qnrVC6*, *qnrS2* (resistencia a las quinolonas), *aac(2')-lia* (resistencia a los aminoglucósidos); y *tet(A)* (bomba de eflujo que confiere resistencia a las tetraciclinas) (Figura 14).

Algunos de los genes de resistencia se encontraron en diferente proporción en genomas de cepas aisladas de orina y esputo, tales como *qnrVC1*, *tet(G)*, *cmlA* y las variantes de los genes *bla*_{IMP} y *bla*_{OXA} que fueron más prevalentes en los genomas urinarios en comparación con los genomas de esputo, destacando las cepas del Hospital de Puebla que portaron *bla*_{IMP}. En cambio, *ant2*, *aadA1*, *crpP*, *dfrB*, *dfrA*, *floR*, *cmx* y las variantes de los genes *bla*_{NDM} y *bla*_{VEB} predominaron en

los genomas de esputo. *crpP* fue el único gen de resistencia adquirida presente en algunos genomas ambientales (Figura 14).

Por último, todos los genes de resistencia encontrados en los genomas de las cepas aisladas del hospital de Puebla se muestran en la tabla 13. Sin embargo, es importante señalar que PE21 y PE83 fueron los únicos genomas portadores de *catA1* que confiere resistencia al cloranfenicol (Figura 14).

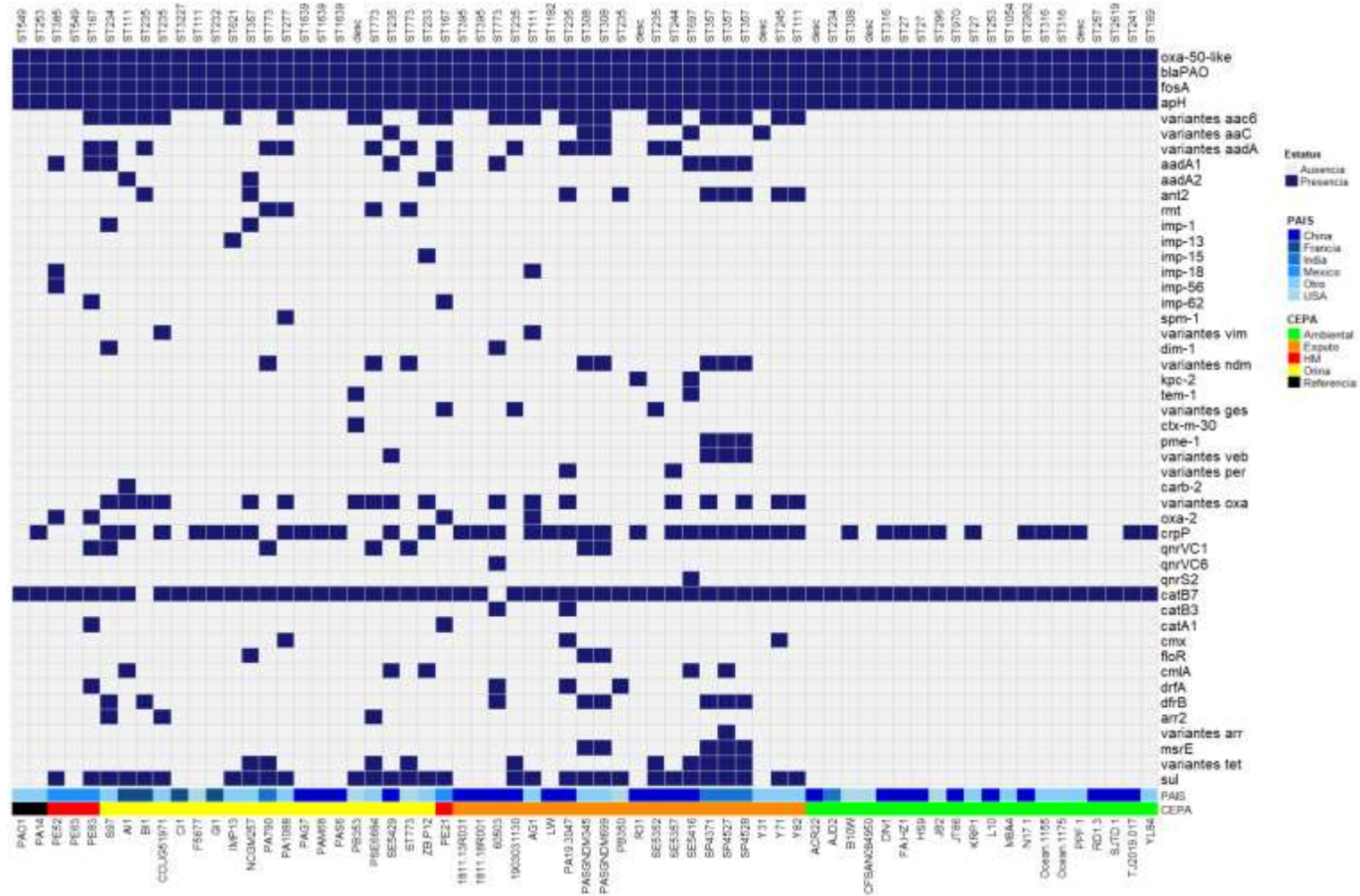


Figura 14. Presencia y ausencia de genes de resistencia en genomas de *Pseudomonas aeruginosa* urinarios, de esputo y ambientales. Representación de los genes de resistencia presentes y ausentes en los 65 genomas de orina, esputo y medio ambiente. Se utilizaron *P. aeruginosa* PAO1 y PA14 para la comparación. Los genes se detectaron mediante ResFinder. El heatmap se construyó con el paquete Bioconductor en Rstudio. HM son las cepas del Hospital Regional I.S.S.T.E de Puebla.

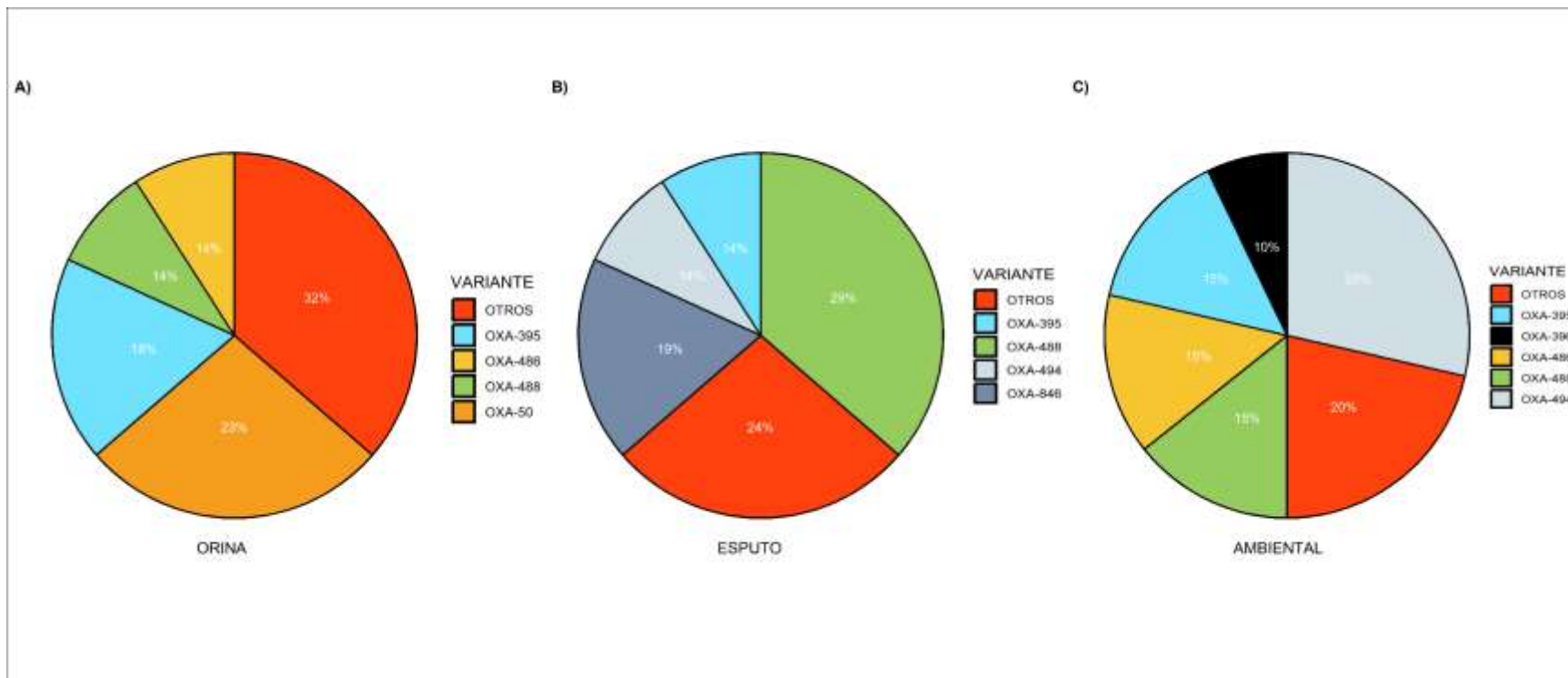


Figura 15. Variantes de la familia bla_{OXA-50} de genomas de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de A) Orina, B) Espudo y C) Ambientales. Se utilizó la base de datos de beta-lactamasas para determinar todas las variantes de bla_{OXA-50} . Las gráficas se construyeron en Rstudio.

Mutaciones en genes asociados con la resistencia a antibióticos

Se buscaron mutaciones cromosómicas asociadas a la resistencia a los antibióticos en 81 genes. El análisis mostró que, de los 81 genes analizados, solamente nueve mostraron mutaciones relacionadas con la resistencia a los antibióticos. Todos los genomas mostraron polimorfismos en el gen *ampC*. Por otro lado, 7 genomas urinarios, 3 de esputo y 5 ambientales mostraron mutaciones en el gen *ampD* y un genoma urinario presentó una mutación en el gen regulador *ampR* relacionadas con la sobreproducción de la beta-lactamasa AmpC cromosómica (Derrepresión de Ampc) (Figura 16). El gen *oprD* presentó mutaciones relacionadas al cambio de marco de lectura o la generación de codones de paro prematuros en 11 genomas urinarios, 15 de esputo y 2 genomas ambientales. Por otro lado, 6 genomas de esputo, 7 de orina y 12 de cepas ambientales tenían un loop L7-corto que causa una mayor susceptibilidad al meropenem (Figura 16).

Los resultados también mostraron que los genomas urinarios y de esputo tuvieron mutaciones en los genes de la ADN girasa y la topoisomerasa IV (*gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*), las cuales están asociadas a una menor susceptibilidad a las quinolonas (Figura 15). Igualmente, se analizaron los reguladores de las bombas de eflujo (MexR, MexT, MexZ, NalC, NfxB), y sólo se encontraron mutaciones con efectos desconocidos sobre la resistencia a los antibióticos. Por último, mutaciones en el gen *parS* fueron observadas solamente en un genoma urinario y tres genomas de esputo (Figura 16).

Por último, en el caso de las cepas aisladas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla se encontraron mutaciones relacionadas con la resistencia solamente en 3 de las cepas. PE21, PE52 y PE83 presentaron mutaciones en los genes *oprD* y *gyrA*. Además, PE52 mostró mutaciones en el gen *gyrB* y los genomas de PE21 y PE83 en el gen *parC* (Figura 16).

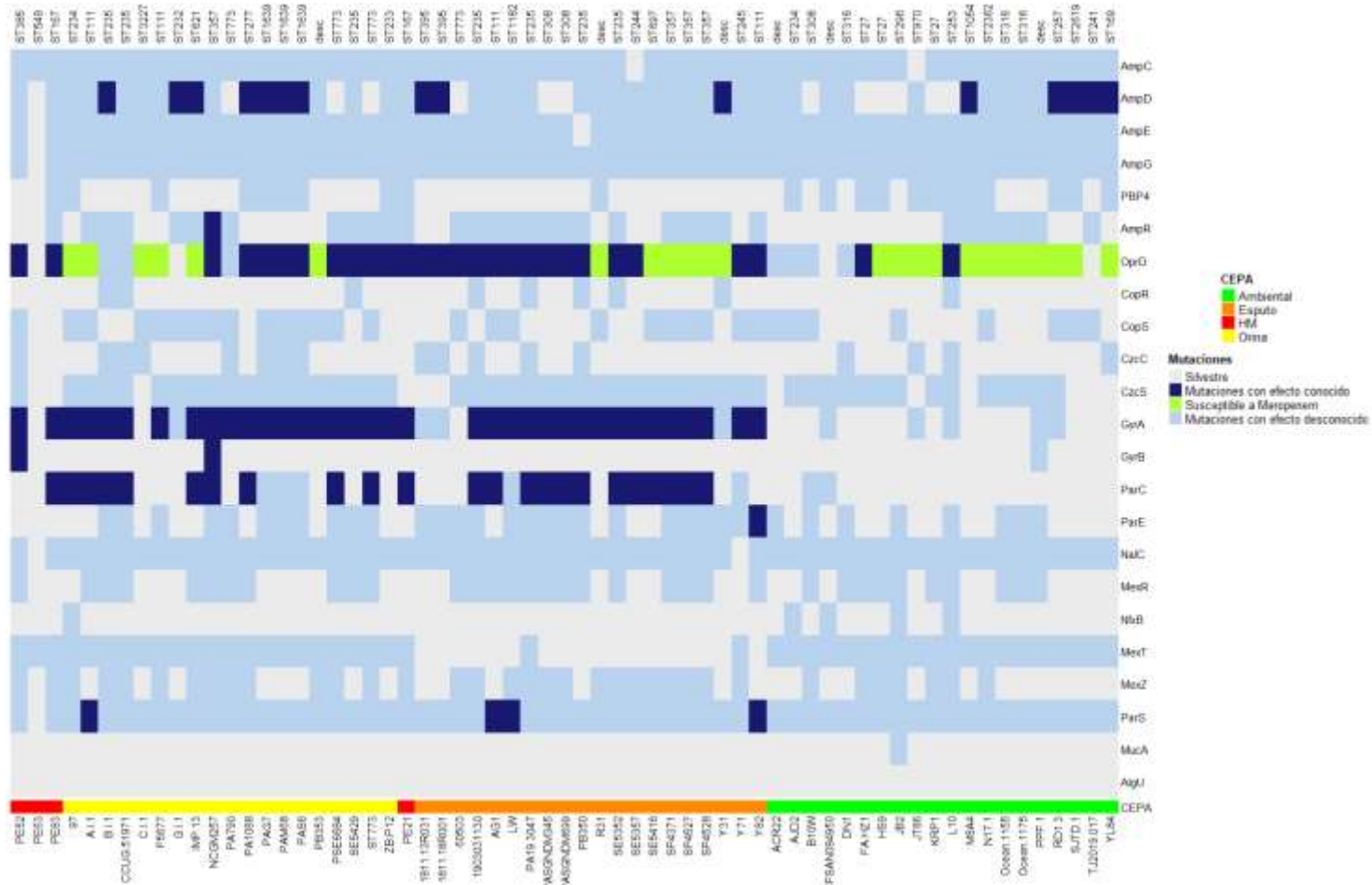


Figura 16. Resistencia mutacional de los 65 genomas de *P. aeruginosa* urinarios, de esputo y ambientales. Representación gráfica de las mutaciones asociadas con la resistencia a los antibióticos (color azul marino), mutaciones con un efecto desconocido sobre la resistencia a los antibióticos (luz azul) y mutaciones en *oprD* asociadas con la susceptibilidad a meropenem (verde) y genes de tipo silvestre (gris). Se utilizaron a *P. aeruginosa* PAO1 y PA14 como genomas de referencia. El mapa heatmap se construyó con el paquete Bioconductor en Rstudio. HM son las cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla.

Factores de virulencia

Se analizaron 116 genes de virulencia asociados a la biosíntesis y regulación del alginato, la biosíntesis de ramnolípidos, la captación de hierro, la detección de quórum, proteasas y toxinas mediante *Virulence Factor Database* (VFDB). Sin embargo, en el *heatmap* sólo se incluyeron 13 factores de virulencia asociados a infecciones del tracto urinario y pulmones, según la literatura consultada. Utilizamos como referencia los genes de virulencia de las cepas PAO1 y PA14.

Los genes de las proteínas efectoras del sistema de secreción de tipo 3 que analizamos fueron *exoS*, *exoT*, *exoU* y *exoY*. Los resultados mostraron que el gen *exoS* era más prevalente en los genomas urinarios, mientras que *exoU* se encontraba principalmente en los genomas de esputo, y *exoY* predominaba tanto en los genomas urinarios como en los ambientales. Por otro lado, el gen *exoT* estaba presente en todos los genomas. Los genes *exoS* y *exoU* casi siempre se excluyen mutuamente; sin embargo, en este estudio, ambos genes se encontraron presentes en un genoma de esputo y un genoma ambiental (R31 y JT86). El gen *pvdE* (implicado en la síntesis de la pioverdina), el gen de la exotoxina A (*toxA*), el gen de la elastasa A (*lasA*) y el gen de la elastasa B (*lasB*) se encontraron en todos los genomas. El gen *aprA*, que codifica una proteasa alcalina, estaba presente en todos los genomas excepto en PE52 y JB2 (urinario y ambiental, respectivamente). Los genes de las fosfolipasas *plcB* y *plcH* se encontraban en todos los genomas, y el gen *plcN* sólo estaba ausente en una cepa urinaria. Por el contrario, el gen *pldA* (fosfolipasa A) se observó con mayor frecuencia en genomas de cepas de esputo (Figura 17).

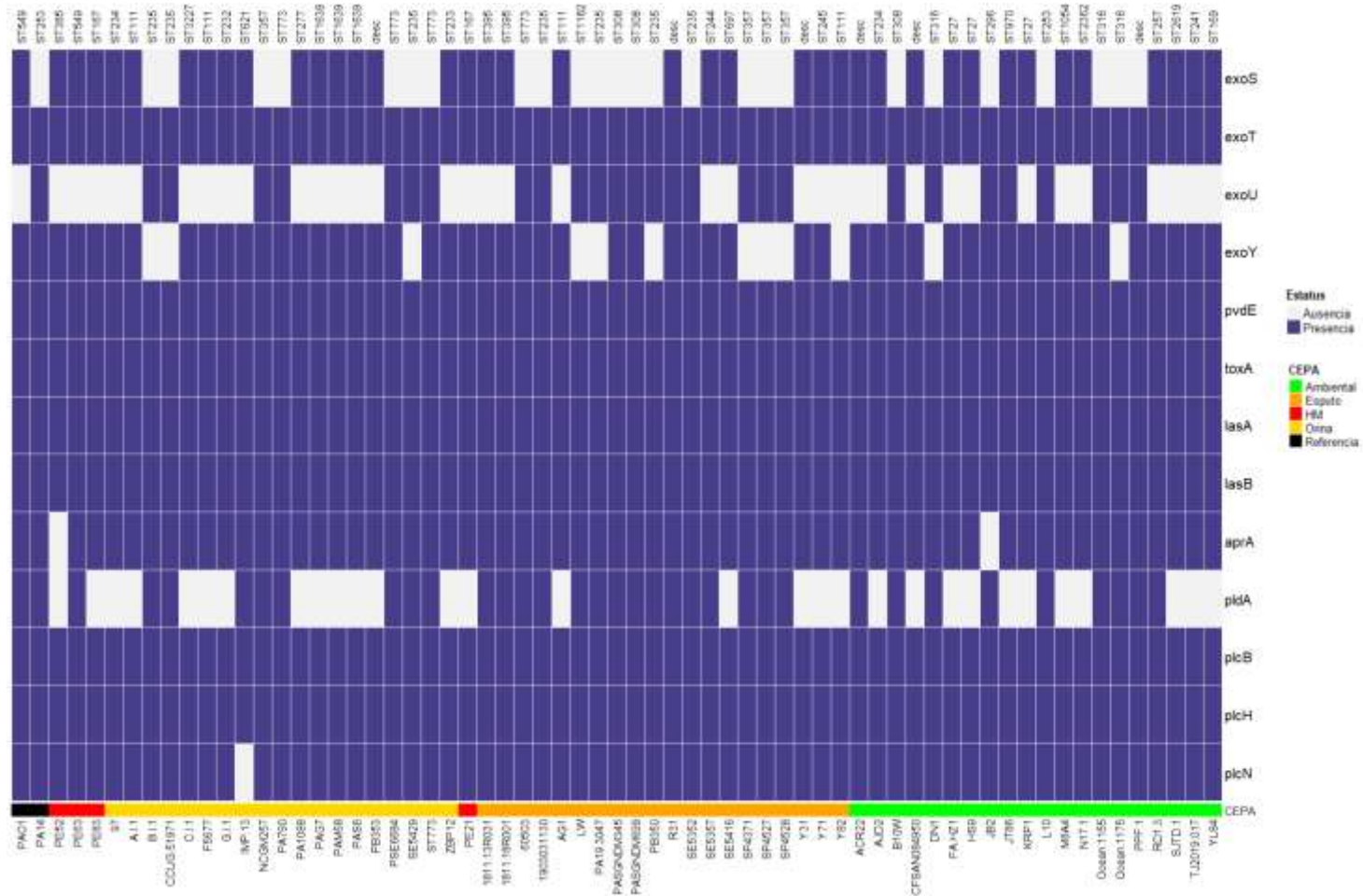


Figura 17. Presencia y ausencia de genes de virulencia en genomas de *Pseudomonas aeruginosa*. El *heatmap* representa los genes de virulencia asociados a infecciones urinarias y pulmonares. El color morado representa la presencia y el gris la ausencia. Los genes se identificaron con VFDB, y el *heatmap* se construyó con el paquete Bioconductor en Rstudio. HM son las cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla. Exotoxinas (*exoS*, *exoT*, *exoU* y *exoY*), pioverdina (*pvdE*), exotoxina A (*toxA*), elastasas A y B (*lasA* y *lasB*), fosfolipasas (*plcB*, *plcH*, *plcN* y *pldA*), proteasa alcalina (*aprA*).

Moviloma y genes de resistencia asociados a elementos genéticos móviles

El genoma accesorio comprende elementos genéticos móviles asociados a la adaptación ambiental bacteriana. Se analizaron todos los genomas para detectar la presencia de secuencias de inserción (SI), transposones simples (Tn), transposones compuestos (TnC), elementos conjugativos integrativos (ICE), elementos integrativos movilizables (IME) y plásmidos. Se encontró que los genomas urinarios tenían un mayor número de SI, IMEs y plásmidos (216, 11 y 5), mientras que los genomas de esputo tenían un mayor número de Tn, CTn e ICEs (13, 49 y 56, respectivamente). Los genomas ambientales por otro lado mostraron menor cantidad de elementos genéticos móviles en comparación a los genomas urinarios y de esputo (Figura 18).

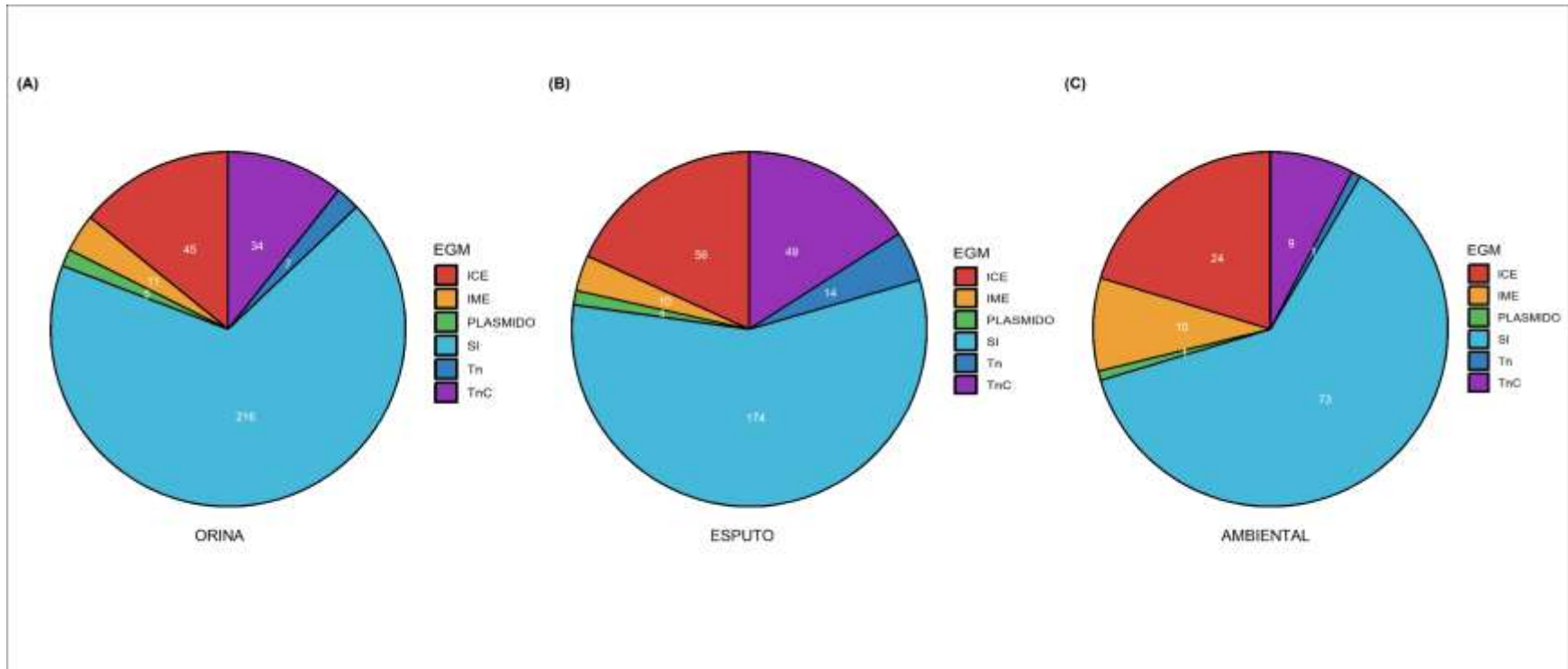


Figura 18. Elementos genéticos móviles (EGM) que están distribuidos en los 65 genomas de cepas de *P. aeruginosa* urinarias (A), de esputo (B) y ambientales (C). Cada gráfico circular representa la distribución de elementos genéticos móviles en cada grupo de cepas, y los números dentro del gráfico circular representan el número de EGMs encontrados. Tn (transposones), TnC (transposones compuestos), SI (secuencia de inserción), IME (elementos movilizables integrativos), ICE (elementos conjugativos integrativos) y plásmidos.

Igualmente, buscamos si algunos genes de resistencia a antibióticos betalactámicos y carbapenémicos eran acarreados por elementos genéticos móviles. Se encontró que los genes *bla_{IMP}*, *bla_{DIM}*, *bla_{OXA}*, *bla_{GES}* y *bla_{VIM}* se asociaron con integrones clásicos y parciales de clase 1, mientras que los genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* y *bla_{SPM}* se asociaron con transposones. Además, se encontró que los transposones portadores de *bla_{KPC-2}* estaban insertados en plásmidos de 2 genomas de esputo (R31 y SE5416) (Figura 19). Los transposones e integrones portadores de *bla_{OXA-101}*, *bla_{CTX-M-30}* y *bla_{TEM-1b}* se encontraron acarreados por un plásmido de un genoma urinario (PB353), y *bla_{DIM-1}* y *bla_{OXA-4}* se encontraron en un plásmido de una cepa de esputo (60503) (Figura 19).

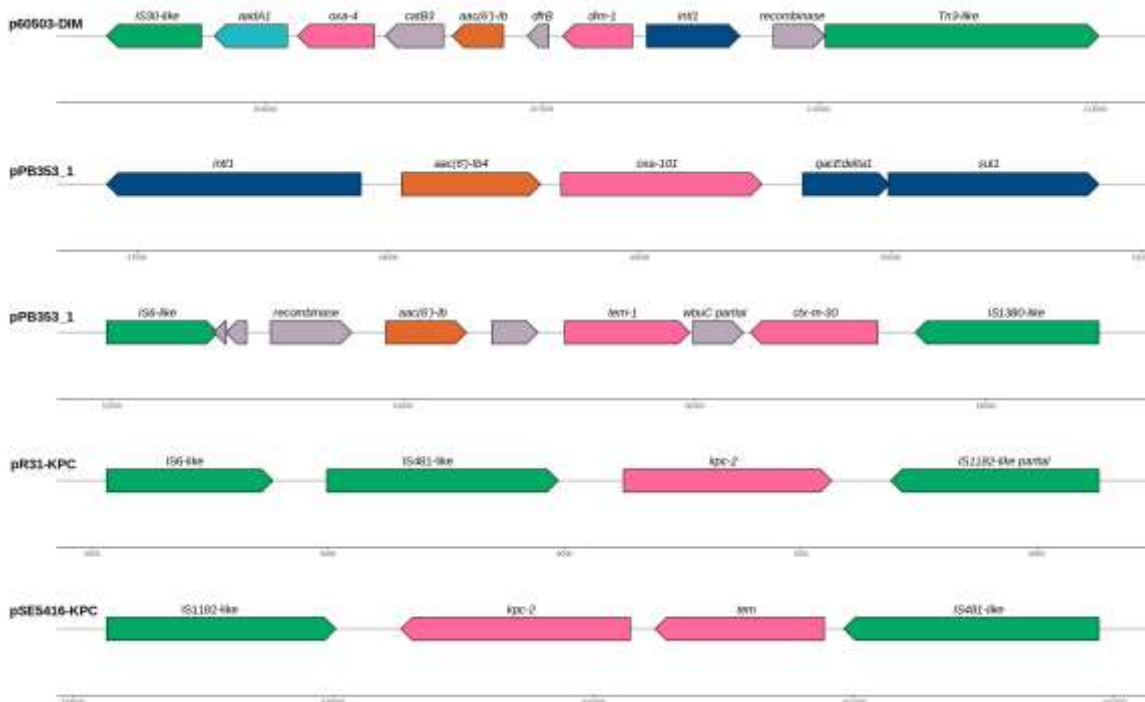


Figura 19. Elementos genéticos móviles portadores de genes de resistencia a beta-lactámicos encontrados en plásmidos de los genomas de *P. aeruginosa*. Las flechas azules representan genes de integrones y las verdes secuencias de inserción. Las flechas rosas son las beta-lactamasas y los genes de las acetilasas están representados con flechas naranjas. Otros genes están en color gris.

Por el contrario, los transposones y/o integrones portadores de *bla*_{GES-15}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{GES-1}, *bla*_{PME-1}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-50}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{CARB-2}, *bla*_{OXA-35}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-4}, *bla*_{OXA-56} y *bla*_{IMP-13} se encontraron en ICEs con sistema de secreción de tipo 4 (T4SS) completo en genomas urinarios y de esputo (Figura 20). Por último, el gen *catB7* se encontró en ICEs con T4SS de genomas urinarios y de esputo, mientras que *crpP* fue acarreado por ICEs en todos los genomas.

En el caso de las cepas del Hospital de Puebla, los genes *bla*_{IMP-56} (PE52), *bla*_{IMP-62} (PE21 y PE83) y *bla*_{GES-32} (PE21) se encontraron asociados a integrones clase 1, acarreados por plásmidos.

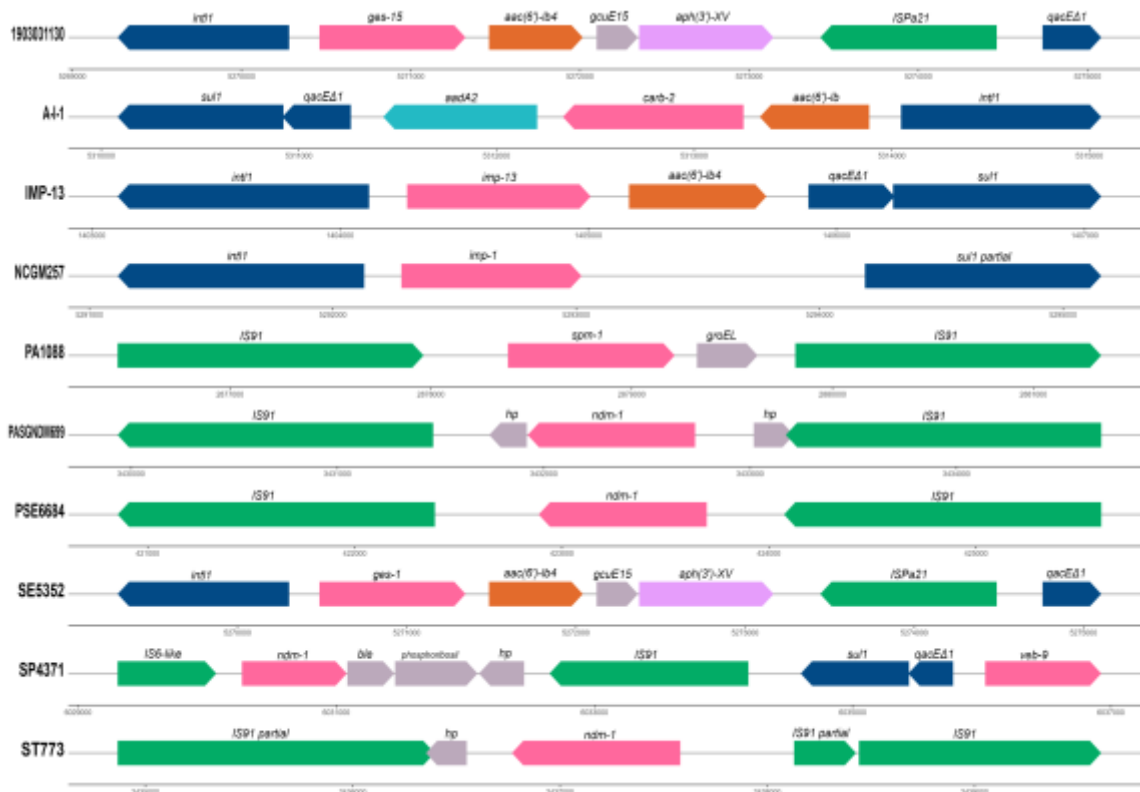


Figura 20. Elementos genéticos móviles portadores de genes de resistencia a beta-lactámicos encontrados en elementos conjugativos integrativos con sistema de secreción de tipo 4 completo en genomas de *P. aeruginosa*. Las flechas azules representan genes de integrones y las verdes secuencias de inserción. Las flechas rosa, amarilla, naranja y rosa oscuro representan los genes de beta-lactamasas, fosfotransferasas, acetilasas y adenilasas, respectivamente. Otros genes están en color gris. Esta es una figura representativa de algunos EGMs encontrados en los genomas incluidos en este estudio.

Presencia de plásmidos, relaxasas MOB, CRISPR-Cas y proteínas Anti-CRISPR

Para determinar el tipo de relaxasa en los genomas de las cepas provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla y los genomas del GenBank utilizamos MOBScan observando que MOB_P y MOB_H se encontraron en genomas de cepas clínicas (orina y esputo) y ambientales. Por otro lado, MOB_Q sólo se encontró en los genomas clínicos y MOB_C en un genoma urinario (Figura 21). En los genomas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, encontramos MOB_{H2} en todos los genomas, MOB_{P11} en los genomas de las cepas PE21, PE52 y PE83, y MOB_{P14} en PE63 (Figura 21).

Adicionalmente, los sistemas CRISPR-Cas fueron encontrados en 18 genomas urinarios, 9 de esputo y 8 ambientales, incluidos los genomas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla. Sin embargo, también observamos que tanto sistemas CRISPR-Cas como plásmidos estaban presentes en 7 genomas (PE21, PE52, PE63, PE83, IMP-13, 60503 y SE5416) (Figura 21). Por otro lado, se identificaron tanto anti-CRISPR como sistemas CRISPR-Cas y plásmidos en tres genomas (uno de orina y dos de esputo) (Figura 21).

La búsqueda de sistemas CRISPR-Cas en plásmidos reveló su presencia en el plásmido pPYO_TB (del genoma urinario IMP-13) y en el plásmido unnamed1 (del genoma ambiental DN1) (Figura 21). Sin embargo, no se encontraron tales sistemas en los genomas de las cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla (PE21, PE52, PE63 y PE83).

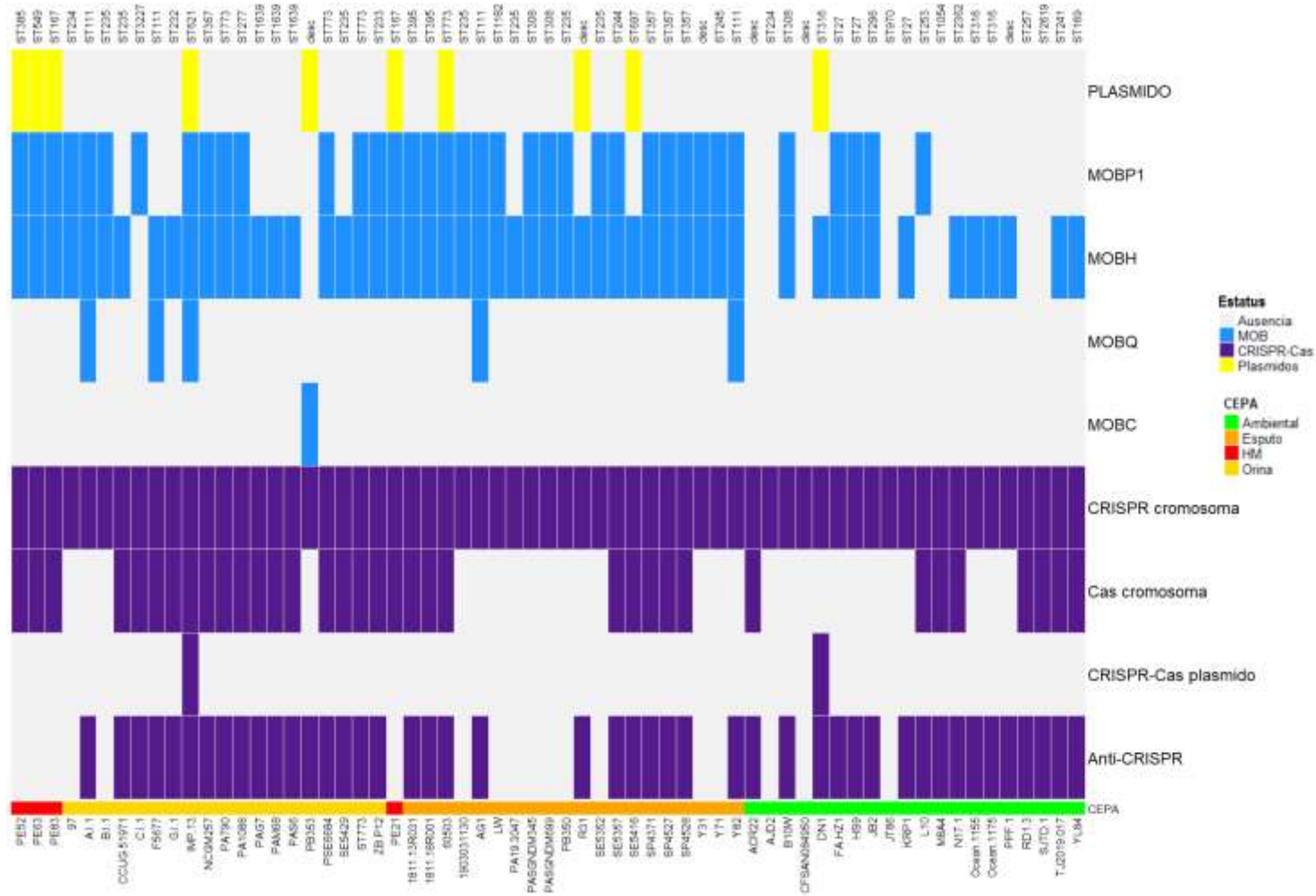


Figura 21. Presencia y ausencia de relaxasas MOB, sistemas CRISPR-Cas cromosómicos, sistemas CRISPR-Cas plasmídicos y anti-CRISPR en genomas de *P. aeruginosa*. El heatmap representa en amarillo la presencia de plásmidos, en azul la presencia de relaxasas MOB y en morado la presencia de los diferentes sistemas CRISPR-Cas y anti-CRISPR. MH son las cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla.

Debido a que las cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla en el estudio del moviloma presentaron plásmidos acarreado *bla*_{IMP}, llevamos a cabo un análisis más exhaustivo de los plásmidos y otros elementos genéticos móviles/movilizables de las cepas PE52, PE21 y PE83. Además, incluimos 4 cepas (PE112, PE151, PE197 y PE224) aisladas del mismo hospital, las cuales portaban *bla*_{IMP}, plásmidos, relaxasa MOB y no presentaban relación filogenética con las cepas anteriores. El análisis de plásmidos en *P. aeruginosa* resulta de gran interés debido a la limitada información que existe al respecto, en comparación con otros géneros bacterianos.

Análisis del plásmido pPE52IMP de la cepa PE52

La cepa *P. aeruginosa* PE52 se aisló de urocultivo de un paciente internado en el Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla, México. López-García *et al.*, 2018 describió los mecanismos de resistencia de esta cepa e identificó la presencia de dos plásmidos; posteriormente mediante Southern blot detectó dos bandas de hibridación con la sonda *bla*_{IMP}. Lo anterior hizo suponer que los genes *bla*_{IMP-18} y *bla*_{IMP-56} se encontraban en plásmidos.

Posteriormente, esta cepa fue secuenciada con la tecnología de Illumina y se revisó la calidad de las lecturas con FastQC. Se utilizó BLASTn, PLACNETw y la opción -plasmid de SPAdes 3.9.0 para diferenciar los nodos de plásmidos. Con lo anterior, pudimos detectar la presencia de un sólo plásmido pPE52IMP portador de la variante *bla*_{IMP-56}, cuya secuencia fue depositada en el GenBank bajo el número de acceso **CP102481.1**. El plásmido pPE52IMP tenía un tamaño de 27,635 pb, 39 marcos de lectura abiertos (ORF) y un contenido de guanina-citosina (G+C) del 62,2%. Además, 32 de los 39 ORFs tenían una función predicha: 1 de replicación, 6 de estabilidad, 7 de transferencia, 13 de adaptación y 5 genes relacionados con transposones. Los 7 restantes fueron proteínas hipotéticas sin dominio funcional conocido (Figura 22).

El módulo de transferencia estaba formado por los genes *traJ*, *traK*, *trbL*, *trbK*, *trbJ*, *virB4* y una relaxasa *traI* perteneciente a la subfamilia MOB_{P11}. El *oriT* se detectó situado río arriba de *traK* y su tamaño fue de 113 pb. Por otro lado, el módulo de

estabilidad incluyó los genes de partición *parA* y *parC*, pero no se encontró el gen *parB*. Además, se identificaron los genes de toxina-antitoxina *phd/doc* y el gen *krfA*. El módulo de replicación sólo estaba conformado por *repA* pero no se encontraron *iterones* ni orígenes de replicación próximos a este gen (Figura 22). Finalmente, el módulo de adaptación estuvo conformado por un integrón de clase 1 portador de los genes *bla*_{IMP-56}, *aadA1* y *bla*_{OXA-2}. Además, se localizó el transposón de la familia Tn3 portador de un operón de resistencia a mercurio (*merR*, *merT*, *merP*, *merA*, *merD* y *merE*) (Figura 22).

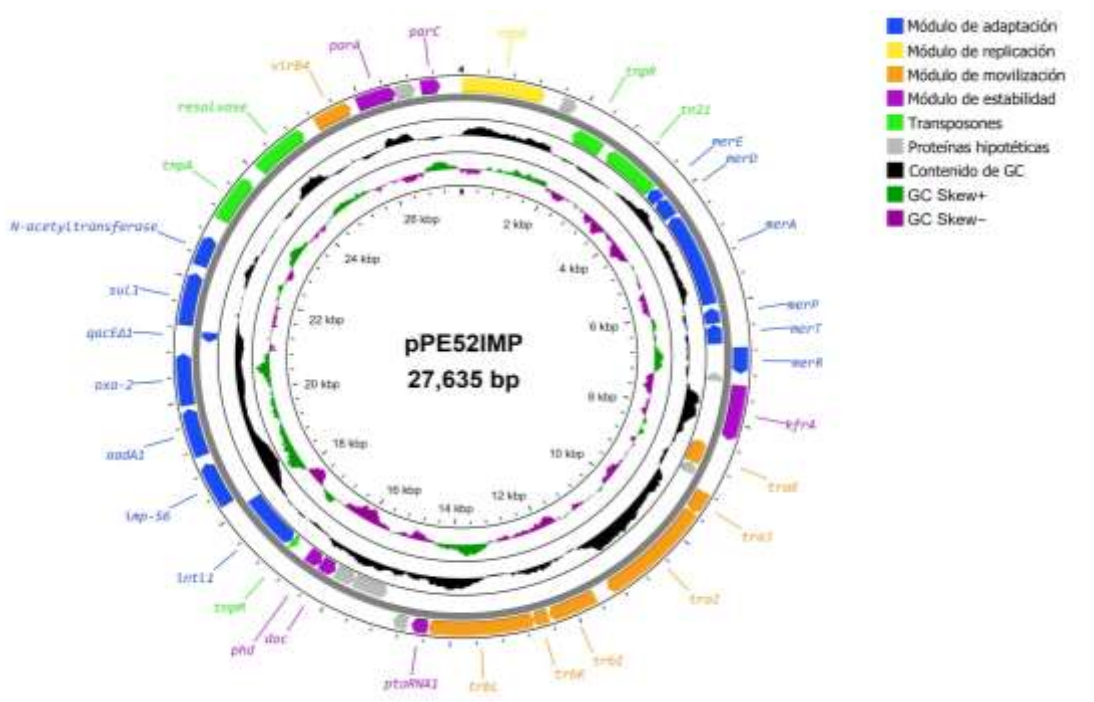


Figura 22. Estructura del plásmido pPE52IMP de la cepa de *P. aeruginosa* PE52. Los módulos del plásmido están representados con diferentes colores. Azul: adaptación; amarillo: replicación; naranja: movilización; morado: estabilidad; verde: transposones; gris: proteínas hipotéticas. El contenido de GC, GC skew+ y GC skew- están representados en colores negro, morado y verde, respectivamente, en el interior del mapa. La figura fue dibujada con Proksee.

Análisis comparativo de pPE52IMP y plásmidos con estructura similares

Buscamos en el GenBank si el plásmido pPE52IMP presentaba similitudes a plásmidos ya reportados. La búsqueda nos arrojó que los plásmidos pMATVIM-7, plásmido unnamed, pD5170990, pMRVIM0713 y p4130-KPC eran similares a pPE52IMP. El tamaño de estos plásmidos oscilaba entre 24 kb y 58 kb aproximadamente, y se aislaron en EE.UU., Brasil y Francia. Sus características se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Características de los plásmidos de *P. aeruginosa* del GenBank con estructura similar a pPE52IMP.

Cepa	Plásmido	No. de acceso	País	Origen de aislamiento	Tamaño (pb)	Genotipo de resistencia
PE52	pPE52IMP	CP102481.1	México	Orina	27,635	<i>bla</i> _{IMP-56} , <i>aadA1</i> , <i>bla</i> _{OXA-2}
FDAARGOS_570	unnamed	CP033834.1	USA	Colección	36,032	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>aac(6)-Ib3</i> , <i>sul1</i> , <i>bla</i> _{VIM-6} , <i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{OXA-10} , <i>qacEΔ1</i> , <i>cmx</i>
D5170990	pD5170990	KX169264.1	Brazil	Sangre	32,424	<i>cmx</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i> , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>aph(6)-Id</i> , <i>aac(6)-II</i> , <i>aph(3'')-Ib</i>
MRSN17623	pMRVIM0713	KP975076.1	USA	Desconocido	36,032	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aac(6)-Ib3</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>sul1</i> , <i>bla</i> _{VIM-6} , <i>bla</i> _{OXA-10} , <i>bla</i> _{OXA-10} , <i>qacEΔ1</i> , <i>cmx</i>
P07-406	pMATVIM-7	AM778842.1	USA: Texas	Aislamiento clínico	24,179	<i>bla</i> _{VIM-7}
164130	p4130-KPC	MN336501.1	Francia	Orina	58,104	<i>aac(6)-Ib4</i> , <i>sul1</i> , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>qacEΔ1</i> , <i>catB3</i> , <i>bla</i> _{OXA-732} , <i>bla</i> _{OXA-779}

Comparamos estos 5 plásmidos con pPE52IMP y el análisis mostró que comparten un *backbone* similar, que incluyen los genes de replicación (*repA*), partición (*parA*, *parC*) y transferencia (*tra* y *virB4*); sin embargo, encontramos algunas diferencias. Los genes *traJ*, *traK* y *kfrA* estaban ausentes de pD517099. El gen *trbJ* de p4130-

KPC está interrumpido por un transposón, el N-terminal de TraK en pMATVIM-7 está ausente y el RepA de p4130-KPC carece del C-terminal (Figura 23).

Por otro lado, observamos que estos plásmidos tienen una región variable río abajo del gen *phd* y río arriba del gen *resolvasa*. Esta consiste en genes de adaptación como carbapenemasas tipo *bla*_{IMP-56} (pPE52IMP) y *bla*_{VIM-6} (plásmido unnamed y pMRVIM0713) transportados por un integrón de clase 1, *bla*_{VIM-7} (pMATVIM-7) portado por un integrón parcial de clase 1, *bla*_{KPC-2} (pD5170990) acarreado por un transposón, y *bla*_{OXA-779}, *bla*_{OXA-732} y *bla*_{KPC-2} acarreados por un integrón de clase 1 y un transposón, respectivamente (p4130-KPC) (Figura 23).

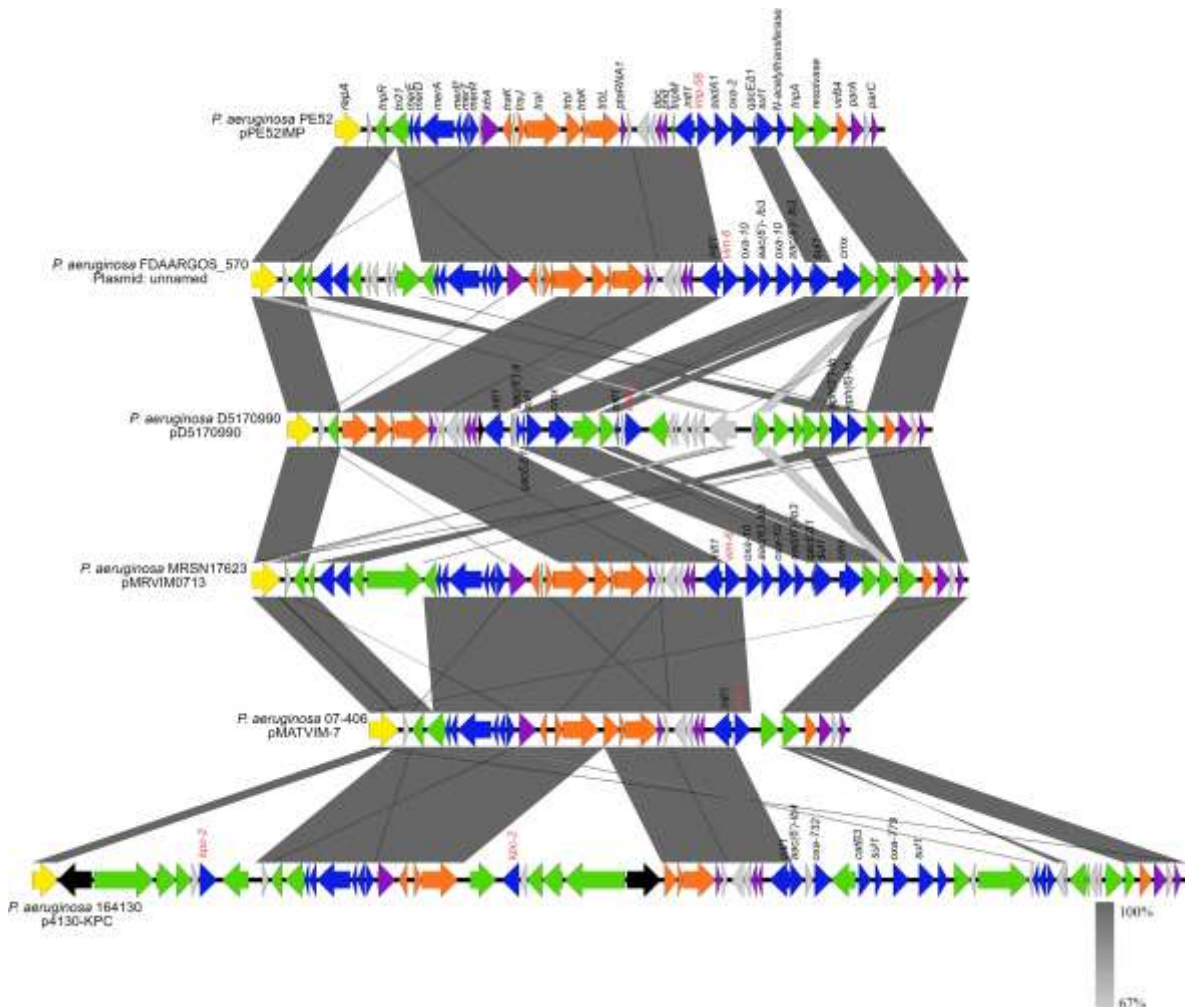


Figura 23. Comparación de la estructura del plásmido pPE52IMP y plásmidos del GenBank con *backbones* similares. Los módulos del plásmido se representaron con diferentes colores. Amarillo: replicación; púrpura: estabilidad; naranja: movilización; azul: adaptación; verde: transposones; gris: proteínas hipotéticas; negro: otros genes. El nivel de color gris indica el porcentaje de identidad BLAST de los plásmidos. La figura se construyó con Easyfig.

Finalmente, al igual que pPE52IMP, los plásmidos pMATVIM-7, unnamed (FDAARGOS_570), pD5170990, pMRVIM0713, y p4130-KPC se clasificaron en la subfamilia MOB_{P11}, pero no fueron clasificables según el esquema de tipificación por replicón.

Por otra parte, también encontramos dos plásmidos con el mismo *repA* y *backbone* similares a pPE52IMP en *Achromobacter ruhlandii* (plásmido p138R) y *Serratia marcescens* (plásmido pSMC1). Los tamaños de estos plásmidos fueron de 34 y 41.5 kb y se aislaron en Argentina y Japón, respectivamente (Tabla 15). El análisis comparativo reveló que comparten un *backbone* similar a pPE52IMP (Figura 24). Además, casi todos los genes del *backbone* comparten un 100% de identidad y cobertura, excepto *repA* de p138R que está truncado, y *tral* de pSMC1 que tiene 97.65% de similitud nucleotídica y un 100% de cobertura con *tral* de pPE52IMP (Figura 24). Asimismo, la región variable de estos plásmidos portaba diferentes beta-lactamasas (*bla*_{IMP-1}, *bla*_{CMY-8}) y otros genes de resistencia como *aac(6')-Ib4* y *aadA2* (Tabla 15).

Tabla 15. Características de los plásmidos de otros géneros bacterianos del GenBank con *backbone* similar a pPE52IMP.

Cepa	Plásmido	No. acceso	País	Origen de aislamiento	Tamaño	Genotipo de resistencia
138R	p138R	MK423762.1	Argentina	Paciente con fibrosis quística	34,096 pb	<i>aac(6')-Ib4</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i>
SM39	pSMC1	AP013064.1	Japón	Aislamiento clínico	41,517 pb	<i>aadA2</i> , <i>qacEΔ1</i> , <i>sul1</i> , <i>bla</i> _{IMP-1} , <i>bla</i> _{CMY-8}

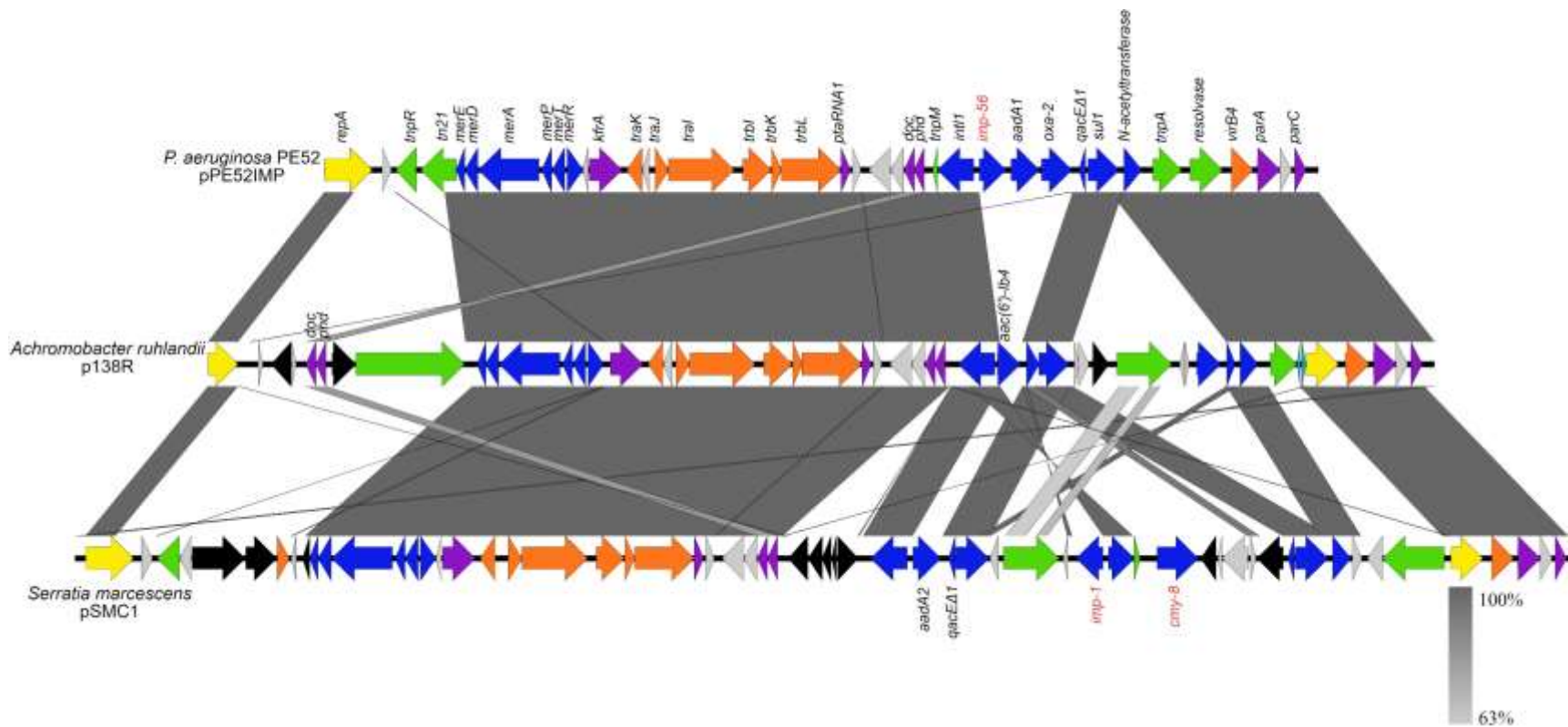


Figura 24. Comparación de pPE52IMP con plásmidos de otros géneros bacterianos con un esqueleto similar. Los módulos del plásmido se representaron con diferentes colores. Amarillo: replicación; Púrpura: estabilidad; Naranja: movilización; Azul: adaptación; Verde: transposones; Gris: proteínas hipotéticas; Negro: otros genes. El nivel de color gris indica el porcentaje de identidad BLAST de los plásmidos. Esta figura se construyó con Easyfig.

Para inferir una posible relación filogenética entre pPE52IMP y otros plásmidos de *P. aeruginosa*, utilizamos RepA para construir un árbol filogenético.

Análisis filogenético de RepA de plásmidos portadores de genes de resistencia

Para el análisis, incluimos la secuencia de aminoácidos de 33 RepA de plásmidos portadores de genes de resistencia a antibióticos (Anexo tabla I) (incluido el RepA de pPE52IMP). El análisis mostró una amplia diversidad de replicasas entre los plásmidos de *P. aeruginosa* que se agruparon en 11 clados (Figura 25). Además, las proteínas RepA de plásmidos con el mismo grupo de incompatibilidad se agruparon en el mismo clado, como IncP-2 (pOZ176, pJB37, pPUV-1), IncP-6 (C79, p10265-KPC, pCOL-1) e IncP-7 (p1160-VIM y pNK546b); sin embargo, el grupo de incompatibilidad de un plásmido dentro del clado IncP-7 (unnamed1 P8W) no fue reportado. Por otro lado, es importante señalar que las proteínas RepA de pPE52IMP y 4 de los plásmidos pPE52IMP-like (pMATVIM-7, unnamed1 (FDAARGOS_570), pD5170990 y pMRVIM0713) (Tabla 14 y Figura 25) se encontraban dentro del mismo clado (Figura 25).

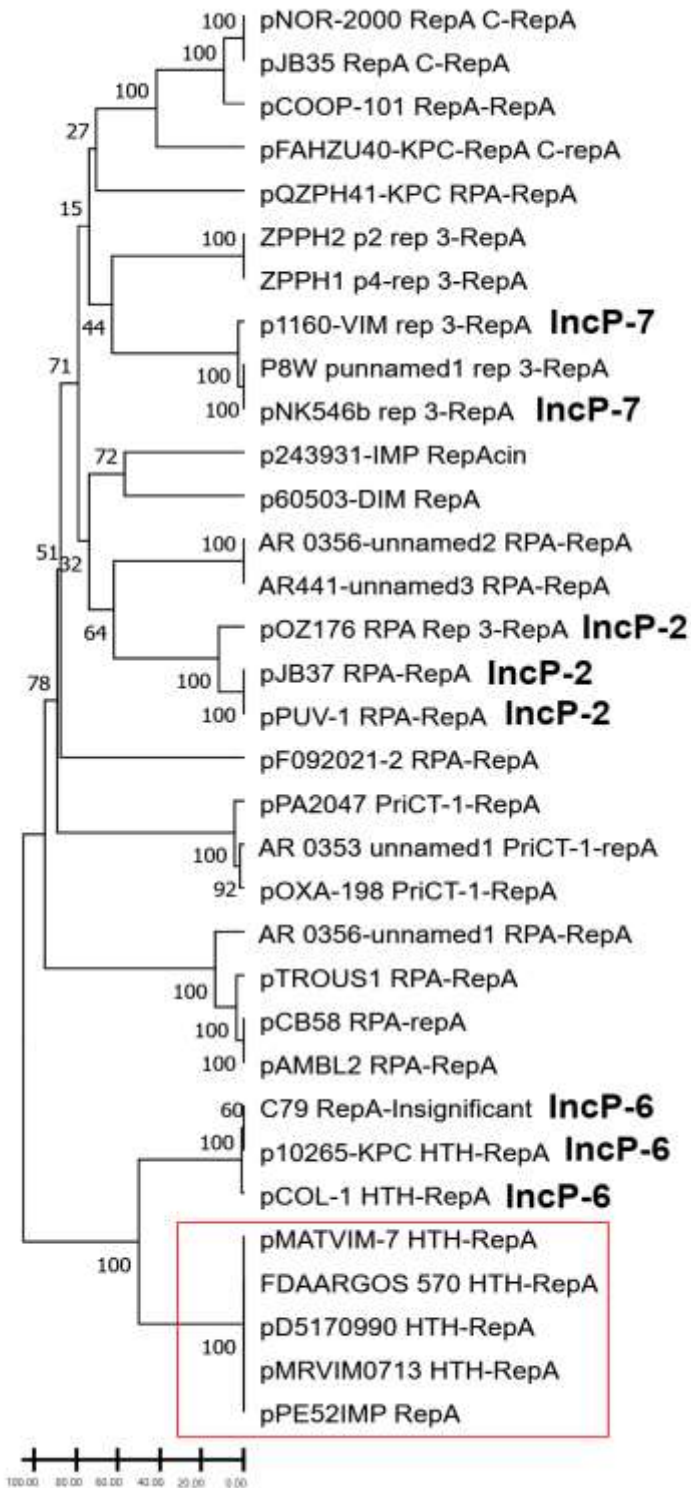


Figura 25. Árbol filogenético UPGMA de las proteínas replicasa A en plásmidos portadores de genes de resistencia. Los grupos de incompatibilidad de los plásmidos aparecen en negrita. Las replicasas en el mismo clado que pPE52IMP RepA están encerradas en un recuadro rojo. El árbol filogenético se construyó con MEGA.

En las 6 cepas restantes (PE21, PE83, PE112, PE197, PE151 y PE224) también realizamos el análisis de plásmidos y otros elementos genéticos móviles/movilizables, ya que al igual que PE52 son portadoras de *bla*_{IMP}, relaxasa MOB y plásmidos, pero tienen diferentes pulsotipos y fueron aisladas en diferentes fechas. PE21 se aisló en agosto de 2013, PE83 en enero de 2015, PE112 en noviembre de 2015, PE151 en mayo de 2016, PE197 en febrero de 2017 y PE224 en julio de 2017.

Características de los genomas

Las cepas PE21, PE112, PE197, PE151 y PE224 se secuenciaron mediante Illumina y minION, mientras que PE83 sólo se secuenció con Illumina. La secuenciación masiva reveló que el genoma de PE21 estaba conformado por un cromosoma de 7,100,829 pb y un segundo *contig* de 406,435 pb; PE112 y PE197 tenían un cromosoma de 7,089,072 y 7,149,282 pb, respectivamente, y ambas tenían dos *contigs* de 35,922 pb y 26,759 pb. Por otro lado, PE151 portaba un cromosoma de 7,171,071 pb y un segundo *contig* de 114,305 pb. Por último, PE224 tenía un cromosoma de 7,182,497 y dos *contigs* de 114,545 pb y 1,194 pb. En el caso de PE83, el tamaño de su genoma era de 7,342,540 pb y estaba fragmentado en 103 *contigs*.

Comparación genómica y MLST

Posteriormente, se realizó la búsqueda *in silico* del ST: el análisis reveló que las 6 cepas pertenecen a 3 diferentes ST: PE21 y PE83 pertenecen al ST167, las cepas PE112 y PE1967 pertenecen al ST2731 y las cepas PE151 y PE224 pertenecen al ST1284.

Como las cepas compartían ST, también se realizó un diagrama de Venn para conocer el número de genes que comparten. Los resultados revelaron que PE21 compartía 966 genes con PE83, PE112 compartía 686 genes con PE197 y, por último, PE151 compartía 1010 genes con PE224 (Figura 26).

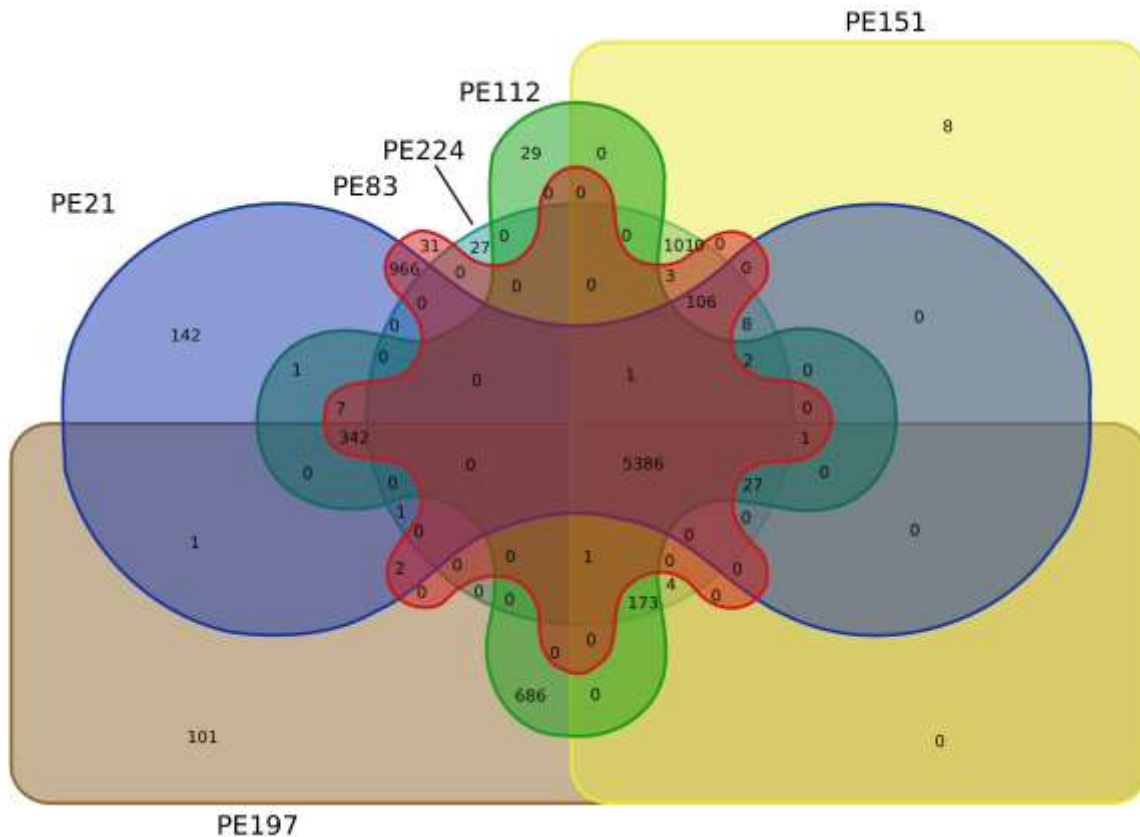


Figura 26. Comparación genómica de cepas de *P. aeruginosa*. El diagrama de Venn muestra el número de genes únicos y compartidos entre los seis genomas. Esta figura fue construida con “calculate and draw custom Venn diagrams”.

Debido a que las cepas tenían muchas similitudes, como son que compartían un gran número genes, tenían el mismo ST, además de lo observado de manera experimental (número y tamaño de plásmidos según PFGE-S1), se describieron por pares en el análisis de los elementos genéticos móviles.

Análisis de los elementos genéticos móviles/movilizables de las cepas PE21 y PE83

Las cepas *P. aeruginosa* PE21 y PE83 se aislaron de esputo y de orina, respectivamente, de pacientes internados en el Hospital. López-García *et al.*, 2018 identificaron la presencia de un plásmido y mediante Southern blot detectó hibridación con la sonda *bla_{IMP}* en el cromosoma en cada una de las cepas. La secuenciación del genoma completo de PE21 se realizó con 2 tecnologías, Illumina

Nextseq y minION y se generó un ensamblaje híbrido, lo cual nos permitió detectar un megaplásmido portador de *bla*_{GES-32} y un plásmido integrado en el cromosoma portador de *bla*_{IMP-62}.

El megaplásmido se le nombró pPE21GES, tenía un tamaño de 406,435 pb, un contenido de G+C de 56.9% y 416 marcos de lectura abiertos (ORFs). Se identificaron 4 módulos: adaptación, replicación, estabilidad y transferencia. El módulo de adaptación estaba conformado por un integrón clase 1 portador de los genes *bla*_{GES-32}, *aacA33* y *aadA1*. Igualmente, se identificaron los genes de resistencia a aminoglucósidos *aph(3'')-I*, *aph(6)-Id* y *aph(3')-VII*, una región de resistencia a levofloxacino, un operón de mercurio *merRTPCADE* acompañado de un transposón Tn21, un operón de resistencia a telurito *terDABCDD* y los genes *mexC*, *mexD* y *oprJ* de la bomba de eflujo MexCD-OprJ que están flanqueados por dos transposasas de la familia IS6 y Tn3 y una resolvasa. Por otro lado, el módulo de replicación consta del gen *repC* de tipo IncQ, una subunidad beta de la DNA pol III, una RNA polimerasa, *dnaK* y una ADN helicasa dependiente de ATP (*uvrD/pcrA*). El módulo de transferencia estaba conformado solamente de los genes *traC*, *traV* y *traB*, pero no pudimos identificar relaxasa ni *oriT*. El módulo de estabilidad portó los genes *parM/stbA*, *parA* y *parB*, pero también se identificaron genes del sistema de partición PRTRC (*parB*, *E*, *C*, *B*, *thiF*) y un sistema de resolución de multímeros *recAB* (Figura 27).

Entre los genes que también se localizaron destacan un clúster de genes de quimiotaxis (*cheABRWXA*), genes implicados en la codificación de un pili tipo IV (*pilG*, ATPasa *pilB*, *pilT*, *pilZ*, *pilD*), 13 genes relacionados con transposones, entre otros (Figura 27).

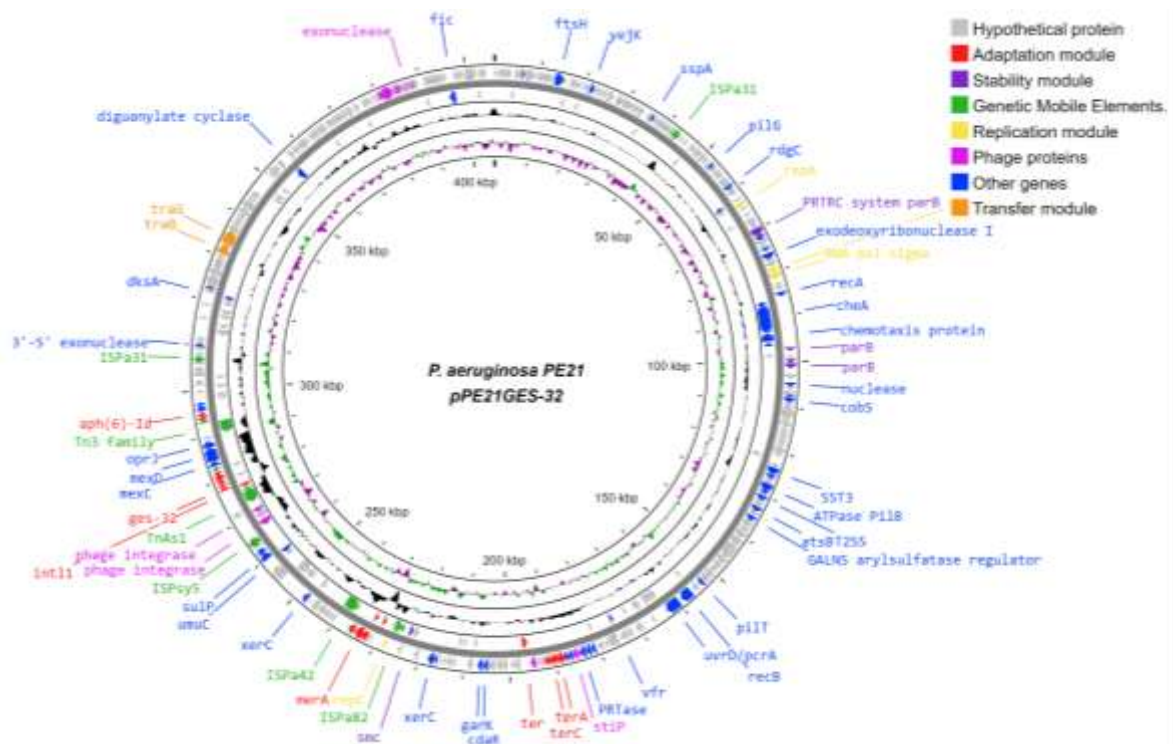


Figura 27. Estructura del plásmido pPE21GES de la cepa *P. aeruginosa* PE21. Los módulos del plásmido están representados con diferentes colores. Rojo: adaptación, morado: estabilidad, amarillo: replicación, naranja: transferencia, gris: proteínas hipotéticas, verde: elementos genéticos móviles, rosa: proteínas de fago, azul: otros genes. El contenido de GC, GC skew+ y GC skew- están representados en colores negro, morado y verde, respectivamente, en el interior del mapa. La figura se dibujó utilizando Proksee.

Como pPE21GES tenía una gran cantidad de proteínas hipotéticas, queríamos conocer si pertenecían a fagos utilizando PHASTER. Se encontraron 3 regiones de fagos incompletas: en la región 1 solamente se identificaron 12 proteínas hipotéticas, de las cuales 6 han sido reportadas en fagos anteriormente. La región 2 consta de 14 genes, un gen que codifica la vaina de la cola, uno la terminasa, dos que codifican la fibra de la cola y los 10 restantes son proteínas hipotéticas. Por último, la región 3 es la más grande con 17 genes, de los cuales 1 es una proteína fago-like y los 16 restantes son proteínas hipotéticas (Figura 28).

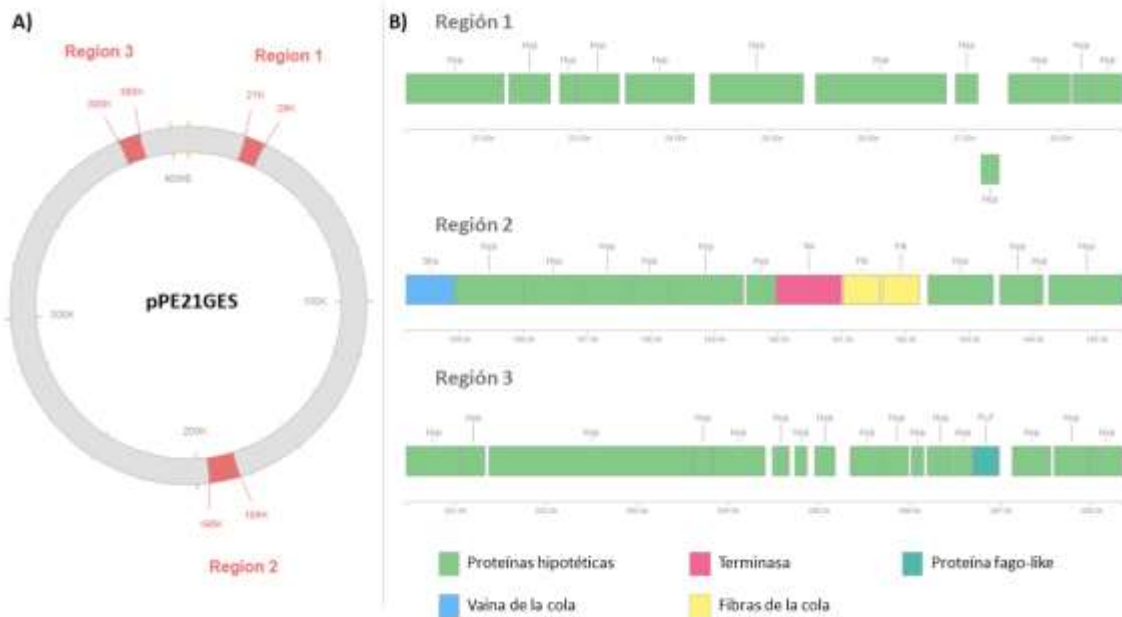


Figura 28. Regiones de los fagos presentes en el plásmido pPE21GES. A) Estructura circular del megaplásmido pPE21GES donde se representa la localización de las 3 regiones de fago (Color rojo). B) Representación lineal y detallada de la estructura de las 3 regiones de fagos. La figura fue construida por PHASTER.

Un segundo plásmido se identificó en PE21 (pPE21IMP) integrado en el cromosoma, lo cual coincide con lo encontrado en el Southern blot por López-García *et al.*, 2019. Identificamos 4 módulos: adaptación, replicación, estabilidad y transferencia, y su estructura es similar a pPE52IMP con excepción del integrón de clase 1 portador de los genes *aacA7*, *bla_{IMP-62}*, *qacH*, *aacA4*, *aadA1*, *bla_{OXA-2}* y *aadA1* (Figura 29).

Cabe recalcar que el plásmido está flanqueado por genes asociados a transposones, que pudieron estar involucrados en la integración del plásmido al cromosoma (Figura 29).

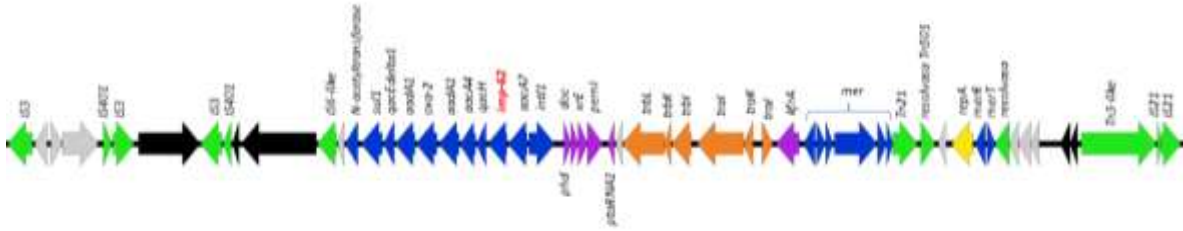


Figura 29. Estructura del plásmido pPE21IMP de la cepa de *P. aeruginosa* PE21. Los módulos del plásmido están representados con diferentes colores. Azul: adaptación; amarillo: replicación; naranja: movilización; morado: estabilidad; verde: transposones; gris: proteínas hipotéticas; negro: otros genes. La figura se construyó con Easyfig.

Por otro lado, el genoma de la cepa PE83 portadora de *bla*_{IMP-62} y *bla*_{GES-26} (López *et al.*, 2019) se secuenció únicamente con Illumina, lo cual resultó en un genoma altamente fragmentado que impidió la localización de los genes de resistencia. Sin embargo, se pudo obtener la secuencia parcial de dos plásmidos: el primero tiene un tamaño de 287,745 pb y es similar al megaplásmido pPE21GES de la cepa PE21. En su estructura pudimos identificar solamente un operón de resistencia a telurito *terDABCDD*, genes de partición *parM/stbA*, *parA* y *parB* y un segundo sistema de partición PRTRC (*parB*, E, C, B, *thiF*). Otros genes fueron también encontrados, entre los que destacan un clúster de genes de quimiotaxis (*cheARY*), genes que probablemente codifican un pili tipo IV (ATPasa *pilB*, *pilT*, *pilZ*), un sistema de resolución de multímeros *recAB*, 4 genes relacionados con transposones y una gran cantidad de proteínas hipotéticas (Figura 30).

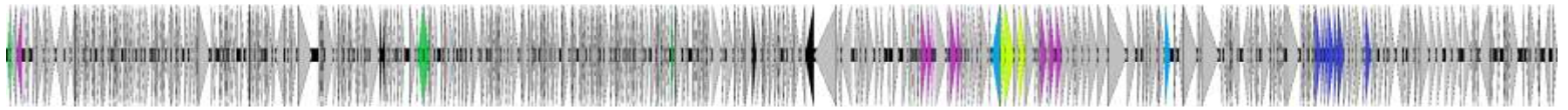


Figura 30. Estructura parcial del megaplásmido parcial de la cepa *P. aeruginosa* PE83. Azul: genes de resistencia a telurito; verde: genes relacionados con transposones; morado: genes de partición; azul turquesa: genes *recAB*; verde fluorescente: genes de quimiotaxis. La figura se construyó con Easyfig.

El segundo plásmido parcial tuvo un tamaño de 16,756 pb y su estructura es similar a pPE21IMP y pPE52IMP (Figura 31).

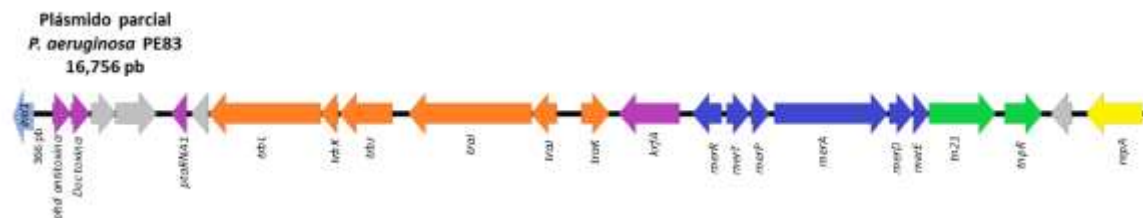


Figura 31. Estructura parcial del plásmido de la cepa de *P. aeruginosa* PE83. Los módulos del plásmido están representados con diferentes colores. Azul: adaptación; amarillo: replicación; naranja: movilización; morado: estabilidad; verde: transposones; gris: proteínas hipotéticas. La figura se construyó con Easyfig.

Análisis de los elementos genéticos móviles/movilizables de las cepas PE112 y PE197

Las cepas *P. aeruginosa* PE112 y PE197 se aislaron de urocultivo, de pacientes Hospitalizados. Mediante PFGE-S1 detectamos dos plásmidos de aproximadamente 29 y 34 kb en ambas cepas. Posteriormente, sus genomas fueron secuenciados con la tecnología de Illumina y minION, y con ambas lecturas se generó un ensamblaje híbrido para cada cepa. Con lo anterior, pudimos observar que portaban dos variantes de *bla*_{IMP} (*bla*_{IMP-83} y *bla*_{IMP-18}).

La variante *bla*_{IMP-83} estaba en un plásmido en cada una de las cepas (pPE112IMP y pPE197IMP) que tenían un tamaño de 26.7 kb, 35 ORFs y un contenido de G+C del 62,6%. Su estructura es similar a la de pPE52IMP, sin embargo, la diferencia radica en el módulo de adaptación donde se localizó un integrón de clase 1 portador de los genes de resistencia *bla*_{IMP-83} y *aadA1* (Figura 32).

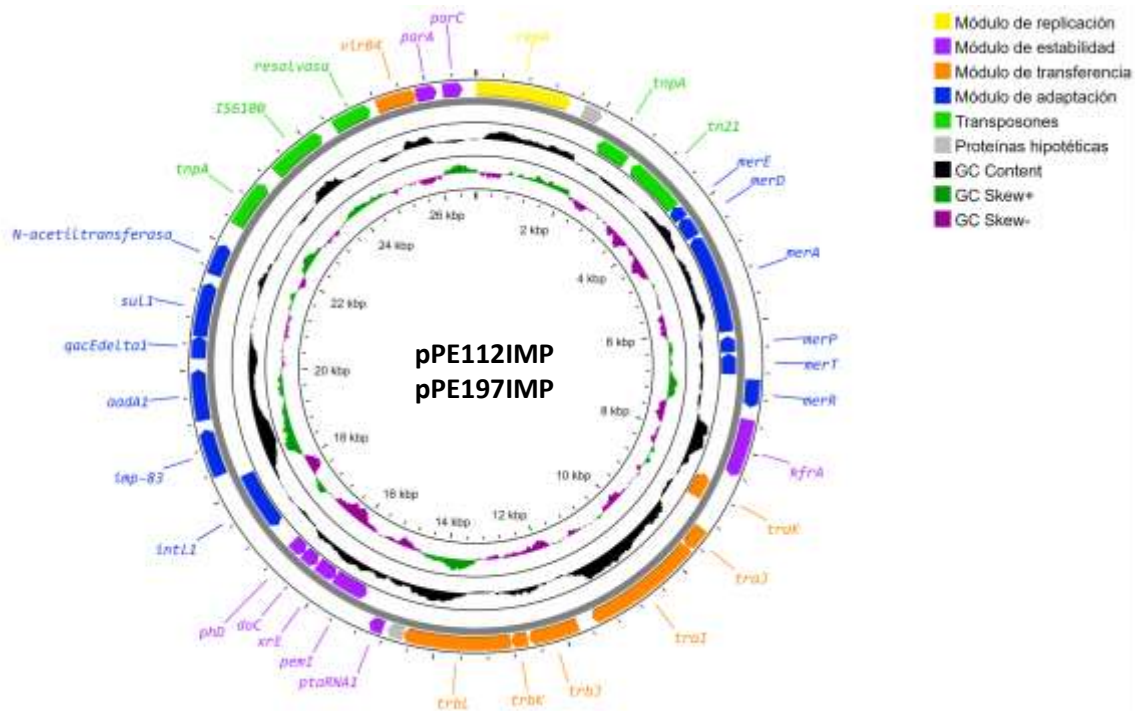


Figura 32. Estructura de los plásmidos pPE112IMP y pPE197IMP de las cepas PE112 y PE197. Los módulos del plásmido están representados con diferentes colores. Azul: adaptación; amarillo: replicación; naranja: movilización; morado: estabilidad; verde: transposones; gris: proteínas hipotéticas. El contenido de GC, GC skew+ y GC skew- están representados en colores negro, morado y verde, respectivamente, en el interior del mapa. La figura se dibujó utilizando Proksee.

Por otro lado, la variante *bla*_{IMP-18} se localizó en un ICE putativo en los cromosomas. Su estructura estaba conformada por dos integrasas, una de ellas de fago, una IS6-like, dos genes cromosómicos y 6 proteínas hipotéticas. Además, una región con genes de transferencia que consta de relaxasa MOB_Q y los genes *traD* y *traY* (Figura 33). La variante *bla*_{IMP-18} estaba en un integrón clase 1 acompañado de *aadA1* cuya estructura es similar al encontrado en pPE112IMP y pPE197IMP, excepto por la variante de *bla*_{IMP}.

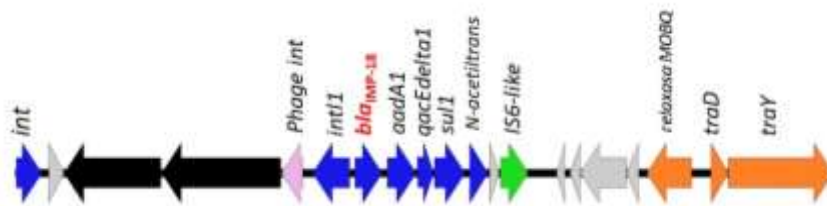


Figura 33. Estructura de la ICE putativa presente en las cepas PE112 y PE197. Los colores representan: azul: genes de adaptación, naranja: genes de transferencia, rosa: genes de fago, verde: IS, gris: proteínas hipotéticas, negro: genes cromosómicos. La figura se construyó con Easyfig.

Los ensamblajes de los genomas de PE112 y PE197 tuvieron un tercer *contig* con un tamaño de 35,922 pb, que es similar al tamaño del plásmido observado con PFGE-S1. Sin embargo, al anotarlo con RAST y PROKKA, su estructura presentaba una gran cantidad de proteínas hipotéticas. Después, analizamos la secuencia con PHASTER, encontrando que aproximadamente 32 kb pertenecían a genes de un fago completo y, por lo tanto, fue anotado con PHAROKKA, que es una herramienta para la anotación de genomas de bacteriófagos. Posteriormente, con BLASTn encontramos que los genes restantes habían sido reportados en plásmidos, por lo que determinamos que este elemento era un fago-plásmido. Los genes de plásmido incluyen un operón de mercurio (*merPTR*), un sistema toxina-antitoxina (*higA/higB*), un gen de partición *parA* y carece de *parB* y gen de replicación. Y también tiene genes de fago, como por ejemplo los que codifican el tallo (*gpX*, *gpU*, *gpE'*, *gp41*, *gpFI*, *I*), la placa basal (*J*, *gpV*), la integrasa de fago (*int*), la proteína de lisis holin, la cápside, el chaperon *apc*, la subunidad grande de la terminasa *gpA*, la subunidad pequeña de la terminasa Nu1, la proteína estructural V, la proteína *cro/C1* y el regulador *lexA* (Figura 34).

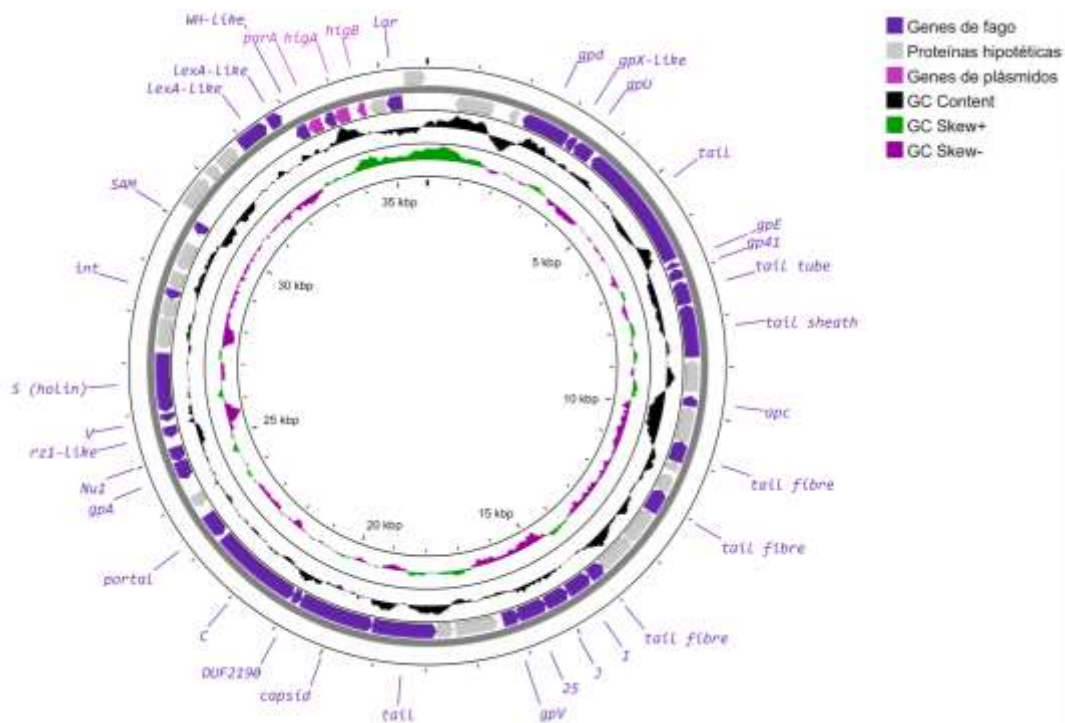


Figura 34. Estructura del fago-plásmido de las cepas PE112 y PE197. Los colores representan: morado: genes de fago; rosa: genes de plásmido; gris: proteínas hipotéticas. La figura fue dibujada utilizando Proksee.

Para buscar fagos similares usamos las bases de datos DBSCAN-SWA y NCBI virus. Con DBSCAN-SWA obtuvimos que el fago más parecido es *Pseudomonas* phage H70 (NC_027384) que es un fago Mu-like, y con NCBI virus las mejores coincidencias fueron: Bacteriophage sp (GenBank: OP073502) Punavirus P1 (GenBank: MH422554) y *Escherichia* phage P1 (GenBank: MH445380). Sin embargo, al realizar la comparación de las secuencias con MAUVE, observamos que ninguna de ellas era similar al fago-plásmido (Figura 35).

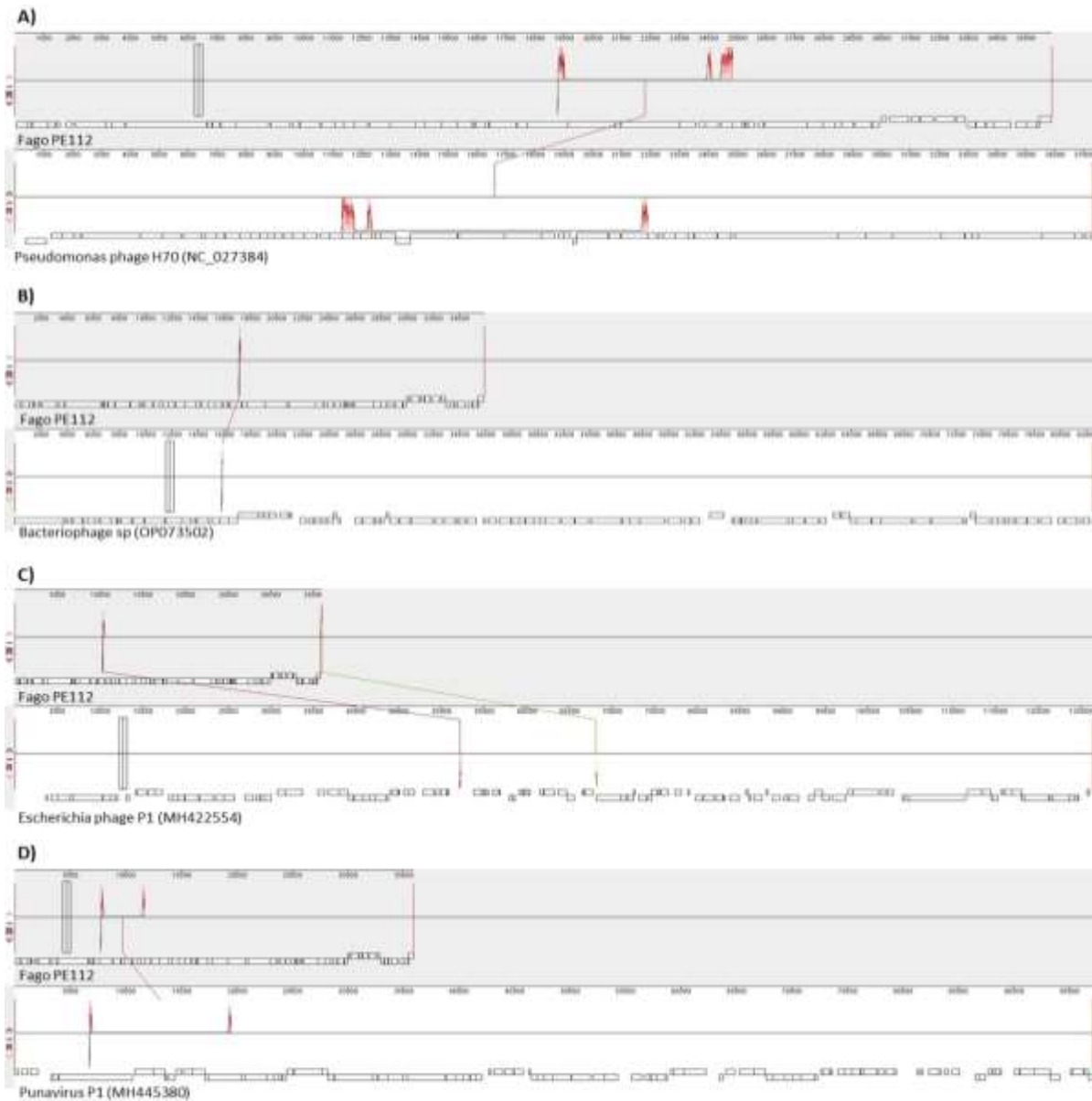


Figura 35. Comparación de la secuencia del fago-plásmido de las cepas PE112 y PE197 y los fagos A) H70, B) bacteriophage sp, C) P1 y D) Punavirus P1. El alineamiento se realizó con MAUVE.

Análisis de los elementos genéticos móviles/movilizables de las cepas PE151 y PE224

Las cepas *P. aeruginosa* PE151 y PE224 se aislaron de urocultivo de pacientes internados en el Hospital. Se generó un ensamblaje híbrido para cada cepa con las lecturas de Illumina y minION. La nueva variante *bla*_{IMP-99} se localizó en el cromosoma, en un integrón clase 1 y a su vez en un transposón Tn610 conformado por dos IS6100 (Figura 36).



Figura 36. Localización cromosómica de *bla*_{IMP-99} presente en las cepas PE151 y PE224. La figura fue construida utilizando Easyfig.

También se identificó un plásmido (pPE151 y pPE224) de 114,305 pb, con 57.9% de contenido de C+G y que no portaba genes de resistencia a antibióticos. Se identificaron 3 módulos: replicación, estabilidad y transferencia. El módulo de replicación consistió en los genes *repB*, *dnaB*, DNA helicasa, DNA/RNA helicasa. Por otro lado, el módulo de estabilidad tuvo genes del sistema de partición (*parA*, *parB* y *stbA*), genes de sistemas toxina-antitoxina (*pemK*, *dinJ*, *yafQ*). El módulo de transferencia consta de genes para un sistema de secreción tipo 4 (*traHIYWUTONM*, *trbC*) y genes para el *pili* delgado para la conjugación en medio líquido (*pilTLNOPBRXTVM*, *shufflon*), que sólo se han reportado en plásmidos tipos Incl. Por último, también tenía 72 proteínas hipotéticas sin dominio de función conocida (Figura 37).

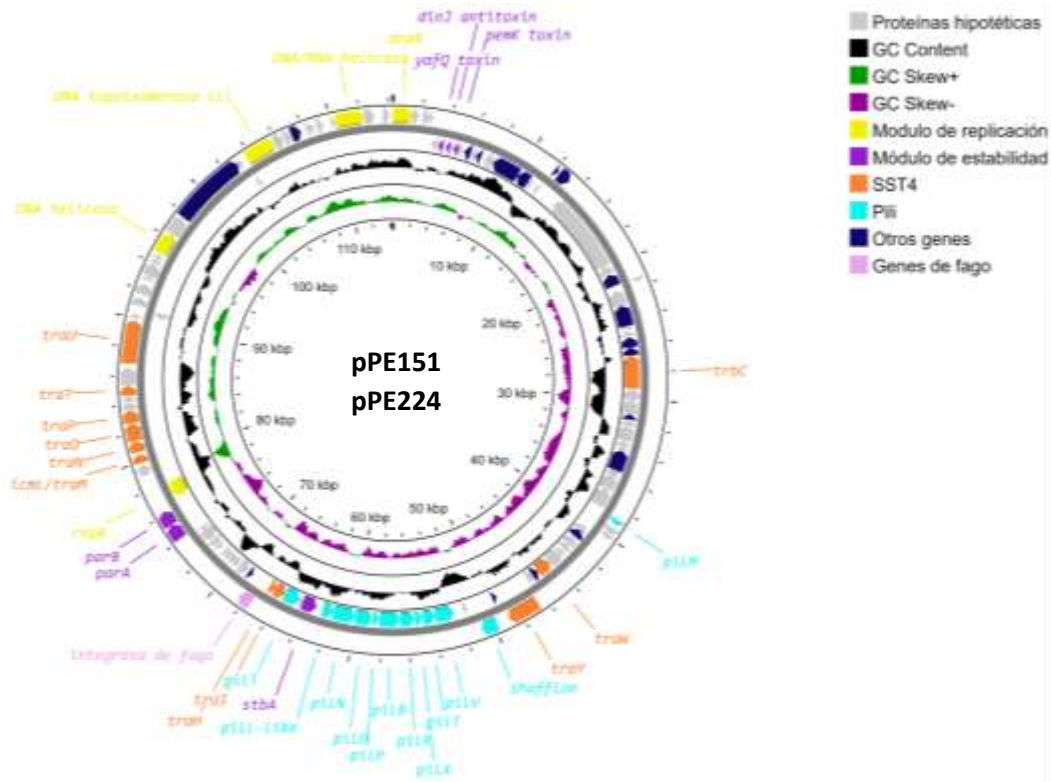


Figura 37. Estructura del plásmido tipo Incl de las cepas PE151 y PE224. Los módulos del plásmido están representados con diferentes colores. Amarillo: replicación; naranja y verde agua: transferencia; morado: estabilidad; azul marino: otros genes; rosa: genes de fagos; gris: proteínas hipotéticas. El contenido de GC, GC skew+ y GC skew- están representados en colores negro, morado y verde, respectivamente, en el interior del mapa. La figura se dibujó utilizando Proksee.

Igualmente, se encontró un segundo plásmido integrado al cromosoma de PE151 y PE224 (pPE151IMP y pPE224IMP respectivamente), cuya estructura es similar a pPE52IMP, con excepción del módulo de adaptación que consistió en un integrón de clase 1 portador del gen *aacA4*, un gen de resistencia a cobalt/zinc/cadmio (*czcD*), dos operones de resistencia a mercurio, el primero conformado por los genes *merR*, *merT*, *merP*, *merA*, *merD* y *merE* y el segundo conformado sólo por los genes *merR*, *merT* y *merP*. Sin embargo, cabe recalcar que la cepa PE224 mostró un segundo integrón clase 1, que era portador de los genes *bla*_{GES-9}, *aadA1*, *aadA6* (Figura 38).

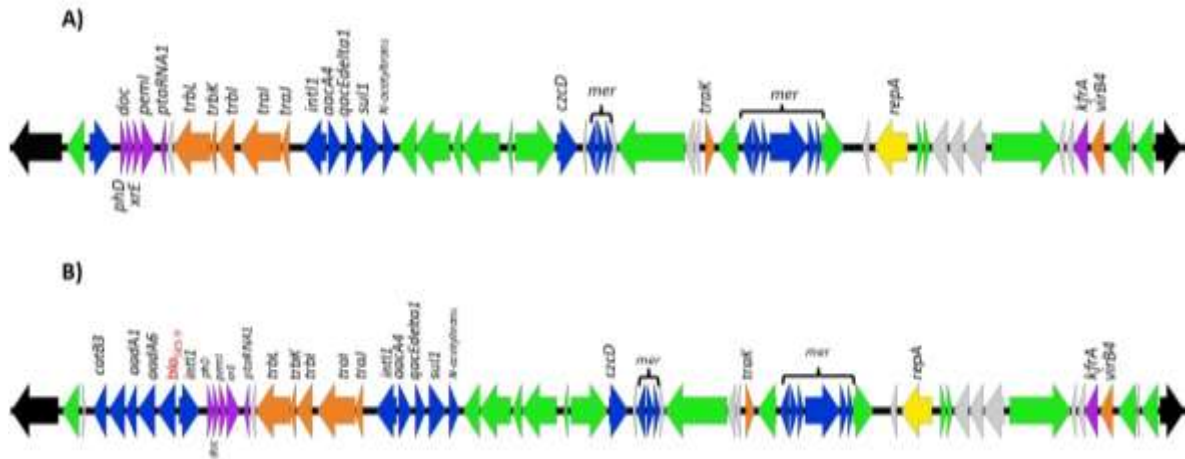


Figura 38. Estructura de los plásmidos integrados al cromosoma de pPE151IMP y pPE224IMP. Los módulos del plásmido están representados con diferentes colores. Azul: adaptación; amarillo: replicación; naranja: movilización; morado: estabilidad; verde: transposones; gris: proteínas hipotéticas; negro: otros genes. Ambas figuras se dibujaron con Easyfig.

8. DISCUSIÓN

Las infecciones del tracto urinario (ITU) se encuentran entre las infecciones bacterianas más comunes y afectan a aproximadamente 150 millones de personas al año en todo el mundo (Werneburg, 2022). *P. aeruginosa* es uno de los microorganismos más frecuentes causantes de ITUs y, particularmente las ITUs asociadas a catéter (Mittal *et al.*, 2009). En este estudio, más del 50% de las cepas se aislaron de cultivo de orina (53.8%), en contraste con otro estudio que reportó que el 30.5% de las cepas de *P. aeruginosa* fueron recuperadas de cultivos de orina (Khorvash *et al.*, 2017).

Por otro lado, las cepas de *P. aeruginosa* provinieron mayormente de pacientes del servicio de medicina interna (41%), seguido por la unidad de cuidados intensivos (UCI) (28.2%), donde es uno de los principales patógenos causante de infecciones nosocomiales (Ribeiro *et al.*, 2019). Esto fue consistente con otro estudio donde encontraron que *P. aeruginosa* fue responsable del 23% de las infecciones adquiridas en la UCI (Reynolds & Kollef, 2021).

Las infecciones causadas por *P. aeruginosa* representan un desafío en su tratamiento debido a su resistencia natural y a la aparición acelerada de cepas resistentes a casi todos los antibióticos, incluidos los carbapenémicos (Moradali *et al.*, 2017). Uno de sus más importantes mecanismos de resistencia es la producción de carbapenemasas como VIM, IMP, SPM, NDM, GIM, GES y KPC (Reyes *et al.*, 2023). En este trabajo, observamos que el 43% de los aislados portaron *bla*_{IMP}, el 58% *bla*_{GES} y el 2.5% *bla*_{VIM}, que también se ha reportado que son las beta-lactamasas más comúnmente encontradas en *P. aeruginosa* (Yoon & Jeong, 2021). Esto es mayor a lo encontrado por Khorvash *et al.*, 2017 quienes detectaron los genes *bla*_{IMP} y *bla*_{VIM} en el 31.3% y 14.6% de los aislados, respectivamente (Khorvash *et al.*, 2017). En contraste, otro estudio reportó que sólo el 3.1% de los aislados presentaron beta-lactamasas de espectro extendido o con actividad carbapenemasa (VIM, IMP, GES, PER y OXA) (Spagnolo *et al.*, 2021). Estas diferencias resaltan la variabilidad de los mecanismos de resistencia bacteriana

entre hospitales y regiones geográficas, lo cual pudiera verse influenciado por el uso de diferentes antibióticos en cada hospital, y la prevalencia de cepas bacterianas, por lo que es importante la vigilancia y el seguimiento de las infecciones causadas por *P. aeruginosa*.

Existen elementos genéticos móviles llamados plásmidos que pueden diseminar los genes de resistencia inter o intra-especies. Como parte de este estudio se buscaron plásmidos en las 39 cepas portadoras de *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} y *bla*_{GES}, de las cuales solamente 10 presentaron plásmidos. Esto puede atribuirse a que *P. aeruginosa* cuenta con diversos mecanismos de resistencia intrínseca (baja permeabilidad de la membrana, expresión de bombas de eflujo y las beta-lactamasas cromosómicas OXA-50 y AmpC) (Okamoto *et al.*, 2001), lo cual podría reducir la necesidad de mantener o adquirir material genético por transferencia horizontal. De hecho, la presencia de múltiples plásmidos en *P. aeruginosa* no es muy común en comparación con otras bacterias como las pertenecientes a la familia Enterobacterales. Lo cual también se ha visto en la base de datos del GenBank, donde se han reportado de uno a dos plásmidos en la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa*, y los tamaños de estos rondan entre 2 kb y 500 kb, consistente con lo observado en las cepas de este estudio que presentaron de 1 a 2 plásmidos con tamaños que van desde 27 hasta 126 kb aproximadamente.

Los plásmidos que son móviles y movilizables tienen en común la proteína relaxasa, que contribuye esencialmente a la iniciación y terminación de la transferencia de ADN conjugativo (Zechner *et al.*, 2017). Estas proteínas se han clasificado en 8 familias MOB (Garcillán-Barcia *et al.*, 2009) y en este estudio utilizamos esta clasificación para caracterizar parcialmente los plásmidos. Encontramos que MOB_{P11} y MOB_{H2} fueron las relaxasas más prevalentes en las cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, consistente con los hallazgos de Gómez-Martínez *et al.*, 2017 y López-García *et al.*, 2018 en cepas aisladas del mismo hospital.

Posteriormente, determinamos la relación filogenética de las cepas mediante PFGE, detectando 12 pulsotipos y el agrupamiento de las cepas en 4 clados principales, lo que nos permitió seleccionar una cepa de cada clado para secuenciar su genoma completo (PE112, PE197, PE151 y PE224). Además, también se eligieron las cepas

PE52, PE83, PE63 y PE21 estudiadas parcialmente por López-García *et al.*, 2018, para secuenciar su genoma completo.

Dado que la mayoría de las cepas en nuestro estudio se obtuvieron de muestras de orina y considerando que teníamos mayor información de las cepas PE21, PE52, PE63 y PE83 y ya estaban secuenciadas, decidimos llevar a cabo un estudio de genómica comparativa entre cepas de distintos nichos ecológicos (orina, esputo y ambiental); para lo cual se tomaron los genomas de las cepas PE52, PE63 y PE83 aisladas de orina, mientras que PE21 se aisló de esputo, e incluimos 59 genomas completos de cepas aisladas de orina, esputo y medio ambiente disponibles en la base de datos del GenBank. Esto nos permitió explorar si existen diferencias en los genes de resistencia, elementos genéticos móviles y genes de virulencia en función del nicho ecológico.

P. aeruginosa es un patógeno oportunista versátil capaz de adaptarse a diferentes nichos ecológicos debido a que tiene un amplio arsenal de factores de virulencia y determinantes de resistencia a los antibióticos (Jurado-Martín *et al.*, 2021), pero también a la adquisición de genes por transferencia horizontal. De hecho, Kung y colaboradores sugieren que el contenido del genoma accesorio determina la adaptabilidad ambiental (Kung *et al.*, 2010). En este estudio, comparamos los genomas de cepas de un hospital mexicano con genomas de aislados de orina, esputo y ambientales de diferentes ciudades y países depositados en el GenBank. Primero, quisimos conocer la distribución de los ST entre los diferentes nichos. El ST se determina combinando la variación alélica de 7 genes de *housekeeping* de *P. aeruginosa* (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* y *trpE*) (Curran *et al.*, 2004). Se conoce que los clones de alto riesgo causan brotes de infecciones asociadas a la atención de la salud en todo el mundo, que se asocian a malos resultados clínicos. Esto se debe a que tienen altos niveles de resistencia a los antibióticos, patogenicidad y virulencia, así como a una mayor capacidad para colonizar y persistir en un huésped (Oliver *et al.*, 2015). En este estudio, observamos una elevada presencia de ST235 y ST773 de alto riesgo (del Barrio-Tofiño *et al.*, 2020) en cepas urinarias y de esputo, lo que concuerda con otros estudios en cepas

clínicas recuperadas de diversos tipos de infecciones, incluidas las del tracto urinario y respiratorio (Guzvinec *et al.*, 2014; Hong *et al.*, 2021; Wright *et al.*, 2015).

Por otro lado, el ST27 de alto riesgo (del Barrio-Tofiño *et al.*, 2020) sólo se encontró en cepas ambientales, lo que también se ha reportado tanto en otros estudios como en la base de datos del MLST (Kidd *et al.*, 2012; Moloney *et al.*, 2020), pero también en cepas de humanos y animales, aunque con menor prevalencia (Haenni *et al.*, 2015; Kidd *et al.*, 2012; Ruiz-Roldán *et al.*, 2018). Lo anterior podría indicar que, a pesar de que cepas con ST27 son mayormente encontradas en medio ambiente, también tienen la capacidad de causar infecciones en humanos y animales.

Las cepas aisladas del hospital regional I.S.S.S.T.E de Puebla tenían STs diferentes a los genomas del GenBank (ST167, ST2731 y ST549). El análisis eBURST mostró que ST2731 y ST549 de las cepas PE52 y PE63, respectivamente, no tenían relación con los clones internacionales de alto riesgo. Por otro lado, ST167 (cepas PE21 y PE83) deriva del grupo 0, donde también se encuentra ST111 de alto riesgo; sin embargo, no están en el mismo complejo clonal, ya que sólo compartían dos alelos (Seidl *et al.*, 2015).

Para conocer la diseminación mundial de la ST167 se consultó la base de datos del MLST, y encontramos 4 cuatro cepas: dos eran cepas clínicas de México (números de acceso: GCF_000795625.1 y GCF_000794515.1) portadoras de *bla*_{IMP-15} y *bla*_{IMP-62}, una cepa era de Estados Unidos (número de acceso: GCF_000480475.1) y la cepa restante era de un país no reportado (número de acceso: GCA_021693455.1). Con base en los criterios para definir un clon de alto riesgo, el ST167 podría considerarse como un "clon local de alto riesgo", ya que, si bien no se ha reportado que cause infecciones a nivel mundial, está asociado con infecciones nosocomiales en México (Baquero *et al.*, 2013).

Por otro lado, como se sabe, el pangenoma representa el número total de genes de un grupo de estudio (S. S. Costa *et al.*, 2020) y, basándose en la persistencia de los genes en el genoma, se divide en cuatro clases: (1) genoma *core*, (2) genoma *soft-core*, (3) genoma *shell* y (4) genoma *cloud* (Collins & Higgs, 2012; Gautreau *et al.*, 2020). El pangenoma de los 65 genomas analizados consta de 20,911 genes. En

otros estudios que incluyeron 17, 23 y 18 genomas, el tamaño del pangenoma era menor (9,344, 9,786 y 12,775 genes, respectivamente) (Kandasamy *et al.*, 2020; Subedi *et al.*, 2018; Valot *et al.*, 2015), mientras que en el análisis del pangenoma con un tamaño de 54,272 genes se utilizaron 1,311 genomas (Freschi *et al.*, 2019). Estas diferencias pueden estar influidas por el número de genomas analizados en cada estudio, ya que el pangenoma aumenta con el número y la diversidad de cepas añadidas al análisis (Subedi *et al.*, 2018). Por otro lado, el genoma *core* comprende genes implicados en la supervivencia bacteriana, y su tamaño disminuye al mismo tiempo que se añaden genomas al análisis (S. S. Costa *et al.*, 2020). En nuestro estudio, el tamaño del genoma *core* comprendía 4,246 genes; en cambio, otros estudios han informado de genomas *core* más grandes, de 5,233 genes (Valot *et al.*, 2015), 4,910 (Subedi *et al.*, 2018) y 5,109 genes (Poulsen *et al.*, 2019) en cepas aisladas de diferentes fuentes. Otros factores que podrían influir son la diversa naturaleza de las cepas y las diferentes herramientas de anotación utilizadas (Subedi *et al.*, 2018).

Los genomas *soft-core*, *shell* y *cloud* mostraron 898, 1,709 y 14,058 genes, respectivamente, lo que fue diferente en comparación con otros estudios que incluyeron cepas aisladas de varios sitios de infección (Bianconi *et al.*, 2015; Muthukumarasamy *et al.*, 2020).

El genoma accesorio se compone de genes adquiridos por transferencia horizontal debido a la exposición de la bacteria al hospedero, al medio ambiente o a otras bacterias, proporcionándole ventajas adaptativas (Jackson *et al.*, 2011). Por lo tanto, construimos un dendrograma basado en el genoma accesorio y no observamos ninguna correlación con el sitio de aislamiento, pero los genomas se agruparon en función de su ST. Sin embargo, dado que la construcción del árbol se basó en la presencia y ausencia de genes del genoma accesorio, podría indicar que las cepas agrupadas en el mismo clado también portan genes adquiridos similares en su genoma accesorio. Para corroborar esto, construimos árboles filogenéticos basados en el genoma *core*, SNPs y MLST, donde pudimos observar que las cepas

se agrupaban de nuevo en relación con su ST; esto también fue reportado en otro estudio (Janice *et al.*, 2021).

La comparación de los genomas del Hospital de Puebla reveló que cada cepa tenía genes específicos, siendo la cepa PE52 la que contenía el mayor número de estos genes. Estos genes específicos de cepa suelen estar implicados en la adaptación al nicho (Guimarães *et al.*, 2015). Por otro lado, en un estudio previo reportaron que las cepas PE21 y PE83 exhiben perfiles fenotípicos de resistencia y características genotípicas similares (López-García *et al.*, 2018) y en la comparación del genoma, observamos que también comparten gran cantidad de genes.

Analizamos los genes de resistencia a antimicrobianos y los de virulencia porque el genoma accesorio suele estar compuesto por estos genes (Yoon & Jeong, 2021). Encontramos que los genes *bla*_{OXA-50} y *bla*_{PAO} (resistencia a beta-lactámicos), *fosA* (resistencia a fosfomicina) y *aph(3')-lib* (resistencia a aminoglucósidos) estaban presentes en el cromosoma de todas las cepas estudiadas, incluidas las cepas de referencia PAO1 y PA14; en otros estudios, estos genes también se han identificado en todas las cepas que se incluyeron (Khan *et al.*, 2020; Subedi *et al.*, 2018), lo que sugiere que son genes conservados en *P. aeruginosa*.

Por otro lado, el gen *catB7* (responsable de la resistencia al cloranfenicol) sólo estaba ausente en dos genomas de cepas clínicas (60503 y B11, provenientes de esputo y orina, respectivamente). Este gen se ha encontrado exclusivamente en el cromosoma de cepas de *P. aeruginosa*, pero no en otras bacterias (Irurum *et al.*, 2021; Subedi *et al.*, 2018). Sin embargo, en otros estudios ya se había señalado la ausencia de este gen en algunas cepas clínicas de *P. aeruginosa* (Diorio-Toth *et al.*, 2022; Kandasamy *et al.*, 2020).

OXA-50 es una oxacilinasas de clase D intrínseca en *P. aeruginosa* que tiene un perfil de hidrólisis de espectro estrecho frente a antibióticos como ampicilina, bencilpenicilina, cefaloridina, cefalotina, nitrocefina, piperacilina e imipenem (Girlich *et al.*, 2004). La familia OXA-50 consta de 59 variantes según la Beta-lactamase Database (hasta septiembre del 2023) (Naas *et al.*, 2017). En este estudio, buscamos la distribución de estas variantes entre los tres grupos de genomas;

*bla*_{OXA-50} y *bla*_{OXA-494} fueron las más prevalentes en los genomas de cepas urinarias y ambientales, respectivamente. Sin embargo, *bla*_{OXA-488} fue la más frecuente en los genomas de las cepas de esputo. En comparación con la enzima OXA-50, OXA-488 es tres veces más eficiente contra la bencilpenicilina y dos veces más eficiente hidrolizando imipenem (Streling *et al.*, 2022). Esto podría deberse a la continua presión de selección provocada por el uso indiscriminado de beta-lactámicos, que ha conducido a la aparición de variantes de OXA-50 con un espectro de hidrólisis mejorado frente al imipenem.

P. aeruginosa también es capaz de adquirir genes de resistencia a los antibióticos. En este estudio, no observamos ninguna relación entre la presencia de estos genes de resistencia adquirida y el sitio de aislamiento de las cepas clínicas. Sin embargo, algunos genomas clínicos presentaban genes de resistencia a antibióticos que suelen encontrarse en géneros distintos de *Pseudomonas* (Bathoorn *et al.*, 2016; Cantón *et al.*, 2012; Falco *et al.*, 2016). Esto puede ser debido a que las infecciones del tracto urinario y pulmonares suelen ser polimicrobianas (Bisht *et al.*, 2020; Gaston *et al.*, 2021), y el estrecho contacto e interacción con otras especies pudo haber facilitado el intercambio genético entre bacterias que coexisten en el mismo nicho. Estos resultados apoyan los hallazgos de Freschi y colaboradores (Freschi *et al.*, 2019), que demostraron que los eventos de transferencia horizontal de genes están implicados en la adquisición de genes de resistencia a los antibióticos. Por último, aunque este estudio aporta conocimientos sobre el comportamiento y la dinámica de *P. aeruginosa* en diferentes nichos, se podrían incluir un número más significativo de genomas de otros nichos para tener un mayor entendimiento.

Por otro lado, es importante destacar que *bla*_{IMP} fue más predominante en las cepas aisladas del hospital de Puebla, especialmente en las cepas PE21, PE83 y PE52. Esta notable diferencia podría estar relacionada con la presión de selección dentro del hospital de Puebla y la consecuente selección de cepas resistentes a carbapenémicos, portadoras de este gen de resistencia. De hecho, en un trabajo previo se informó que en este hospital *bla*_{IMP} era el gen de resistencia a carbapenémicos más prevalente (López-García *et al.*, 2018). Además, las bacterias

que se encuentran en el mismo nicho podrían estar influenciando la adquisición de este gen de resistencia.

Por otro lado, *crpP* se encontró tanto en genomas clínicos como ambientales. Sin embargo, fue el único gen de resistencia adquirida identificado en genomas de cepas ambientales, lo que coincide con otro estudio (Ramsay *et al.*, 2019). Además, este gen se asoció anteriormente con la resistencia al antibiótico ciprofloxacino (Chávez-Jacobo *et al.*, 2018). No obstante, algunos estudios no han encontrado asociación entre la presencia de *crpP* y el fenotipo de resistencia a ciprofloxacino (Xu *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2021; López *et al.*, 2022) y, por otro lado, un trabajo reciente ha concluido que CrpP no es responsable de la resistencia a la ciprofloxacina en *E. coli* (Zubyk & Wright, 202).

Curiosamente, en este estudio algunos genes de resistencia a antibióticos se encontraron en elementos genéticos móviles/movilizables, como *bla_{IMP}*, *bla_{DIM}*, *bla_{OXA}*, *bla_{GES}*, *bla_{VIM}* que se asociaron con integrones clásicos y parciales de clase 1, consistente con otros estudios (Janice *et al.*, 2021; Sánchez-Martínez *et al.*, 2010; Touati *et al.*, 2013); mientras que *bla_{KPC}* y *bla_{NDM}*, *bla_{SPM}* se asociaron con secuencias de inserción y transposones, similar a lo reportado por otros autores (El Salabi *et al.*, 2010; Ramírez *et al.*, 2013; Tohya *et al.*, 2019). Comúnmente, los transposones e integrones se localizan dentro de plásmidos y elementos conjugativos integrativos (Partridge *et al.*, 2018), lo que coincide con nuestros hallazgos. En particular, el gen *crpP* fue identificado inicialmente en un plásmido (Chávez-Jacobo *et al.*, 2018); sin embargo, en este y otro estudio, se localizó en ICEs (López *et al.*, 2022). De forma similar, *catB7* se identificó en ICEs, lo que podría estar relacionado con la pérdida de este gen en algunos genomas. La identificación de genes de resistencia a antibióticos portados por elementos genéticos móviles/movilizables sugiere una mayor posibilidad de transferencia horizontal de genes dentro o entre diferentes aislados, especies y ambientes (Ramsamy *et al.*, 2022). Por otro lado, el bajo número de EGM en los genomas de cepas ambientales en comparación con los genomas de cepas clínicas, podría estar relacionado con el

hecho de que no tuvieran genes de resistencia adquiridos horizontalmente, ya que éstos son portados regularmente por EGM (Partridge *et al.*, 2018).

El número de plásmidos en *P. aeruginosa* encontrado en este estudio es menor que en otras bacterias, como las Enterobacterales (Shintani *et al.*, 2015). Sin embargo, las cepas urinarias portaban mayor número de plásmidos, destacando las cepas del Hospital de Puebla, lo cual sugiere que la resistencia mediada por plásmidos podría ser el principal mecanismo de adquisición de resistencia en este hospital.

Se ha descubierto que los sistemas CRISPR-Cas desempeñan un papel importante en el moldeamiento del genoma accesorio (van Belkum *et al.*, 2015) porque restringen la transferencia horizontal de genes y la infección por bacteriófagos (Shehreen *et al.*, 2019). Para saber si los sistemas CRISPR-Cas podrían estar desempeñando un papel en la adquisición de plásmidos, correlacionamos su presencia y ausencia con la presencia de plásmidos. Aunque la mayoría de los genomas presentaban sistemas CRISPR-Cas pero no portaban plásmidos, algunos genomas portaban ambos, lo que podría deberse a la presencia de proteínas anti-CRISPR-Cas cuya función es inhibir la actividad de estos sistemas (Bondy-Denomy *et al.*, 2015) o a que los espaciadores podrían estar dirigidos a otros elementos genéticos móviles. No obstante, no analizamos las secuencias espaciadoras CRISPR. Por otro lado, las cepas mexicanas tenían plásmidos y sistemas CRISPR-Cas pero no presentaban anti-CRISPR.

Los sistemas CRISPR-Cas se han asociado a genomas de pequeño tamaño y a una menor abundancia de ICEs (Wheatley & MacLean, 2021). Por el contrario, los genomas de las cepas ambientales tenían menos sistemas CRISPR-Cas, genomas de menor tamaño y un reducido número de ICEs en comparación con los genomas de las cepas de esputo y urinarias. Lo anterior podría deberse a que simplemente el intercambio genético entre bacterias del medio ambiente pudo haber sido menor en comparación de lo que sucede en el ambiente hospitalario.

Además, los plásmidos de las cepas DN1 e IMP-13 (provenientes de ambiente y orina) portaban CRISPR-Cas, lo que nos pareció interesante, así que buscamos el tipo de sistema que tenía, encontrando que era el sistema tipo IV. Este tipo de

CRISPR-Cas sólo se ha encontrado en plásmidos y otros elementos genéticos móviles, y se ha planteado la hipótesis de que su función principal es eliminar plásmidos competidores (Pinilla-Redondo *et al.*, 2020). Lo anterior se ha estudiado en plásmidos de arqueas y bacterias (incluidas las Gammaproteobacterias), encontrándose que muchos espaciadores de los sistemas CRISPR-Cas de tipo IV acarreados por plásmidos coincidían con secuencias de otros plásmidos (Pinilla-Redondo *et al.*, 2022). En los plásmidos de *Klebsiella pneumoniae* se encontró algo similar (Kamruzzaman & Iredell, 2020); sin embargo, esto sigue sin estar claro en *P. aeruginosa*.

Es importante señalar que 28 de los genomas sólo tenían espaciadores CRISPR huérfanos (carentes de Cas), que suelen considerarse vestigiales. Sin embargo, se ha descubierto que algunos CRISPR de este tipo en *E. coli* podrían ser funcionales (Almendros *et al.*, 2016). En *P. aeruginosa* esto sigue sin estar claro.

Por otro lado, *P. aeruginosa* también puede adquirir resistencia a través de mutaciones cromosómicas. En este estudio, encontramos mutaciones relacionadas con la resistencia a los antibióticos en los genes *ampD*, *ampR*, *oprD*, *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* y *parS*. OprD es una proteína de membrana externa implicada en la difusión de pequeños péptidos, aminoácidos básicos y carbapenémicos en la célula (Li *et al.*, 2012). Sin embargo, las alteraciones en la estructura/expresión o la pérdida de OprD provocan disminuciones en la susceptibilidad a los carbapenémicos (Lister *et al.*, 2009). El análisis de *oprD* reveló la presencia de codones de paro prematuro, desplazamiento de marco y mutaciones relacionadas con la resistencia a los carbapenémicos, sobre todo en los genomas de cepas de orina y esputo, como se ha informado en otros estudios que analizaron cepas clínicas (González-Vázquez *et al.*, 2021; López-García *et al.*, 2018). Por el contrario, las deleciones en la secuencia de *oprD* pueden generar un loop L7-corto, que se asocia con el fenotipo de susceptibilidad a meropenem (Epp *et al.*, 2001; González-Vázquez *et al.*, 2021). Curiosamente, este genotipo de *oprD* se encontró mayormente en los genomas de cepas ambientales.

La resistencia a las fluoroquinolonas puede deberse a mutaciones en las regiones determinantes de la resistencia a las quinolonas (QRDR, por sus siglas en inglés) en las subunidades de la ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*) y la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*) (López-Causapé *et al.*, 2017), y fueron observadas en los genomas de las cepas de orina y esputo, pero no en los genomas de las cepas ambientales. La ausencia de estas mutaciones en las cepas ambientales podría sugerir que no estuvieron expuestas a presión de selección ya que, aunque el medio ambiente puede sufrir contaminación por antibióticos debido a la actividad humana (Martinez, 2009), no están expuestas a la misma fuerte presión de selección por antibióticos que las bacterias hospitalarias.

La producción de la cefalosporinasa AmpC es un mecanismo intrínseco de resistencia a los antibióticos beta-lactámicos en *P. aeruginosa*. Sin embargo, puede potenciarse por mutaciones en *ampR* (factor de transcripción) y *ampD* (amidasa citosólica) que causan la desrepresión de AmpC (Lister *et al.*, 2009). Observamos que las mutaciones en AmpD eran más prevalentes en genomas de cepas urinarias (n = 7), seguidas de las ambientales (n = 5), y en menor medida en genomas de cepas de esputo (n = 3). En cambio, sólo un genoma de una cepa urinaria presentaba una mutación en el gen *ampR*. Por otra parte, los polimorfismos en AmpC son causados por mutaciones y algunos aumentan su actividad hidrolítica frente a las cefalosporinas (Berrazeg *et al.*, 2015). Se observaron polimorfismos de AmpC en casi todos los genomas estudiados excepto en dos (una cepa de esputo y una cepa ambiental). Hasta la fecha, se han descrito 553 variantes de la cefalosporinasa derivada de *Pseudomonas* (PDC) (hasta septiembre de 2023) (Naas *et al.*, 2017). Sin embargo, este estudio no se centró en la búsqueda de variantes, y desconocemos si su distribución pudiera estar relacionada con los sitios de aislamiento de los genomas estudiados.

Algunas mutaciones en ParS (la quinasa sensora del sistema de doble componente ParR/S) están relacionadas con la resistencia a la colistina. Estas sólo fueron observadas en genomas de cepas clínicas, siendo más prevalentes en genomas de cepas de esputo (n = 3). Es importante mencionar que nuestro estudio tiene algunas

limitaciones, como el hecho de que no conocemos el perfil fenotípico de resistencia a colistina y no podemos relacionarlo con su genotipo de resistencia.

Es importante señalar que las cepas ambientales sólo portaban genes del resistoma intrínseco, y algunas mutaciones en estos genes y en otros genes relacionados con la resistencia a antibióticos, lo que puede indicar que la adquisición de mutaciones son los principales mecanismos en las cepas ambientales y no la ganancia de genes por transferencia horizontal.

P. aeruginosa posee una amplia variedad de factores de virulencia, como flagelos, pili y LPS que contribuyen a la adhesión/colonización en el hospedero, sistemas de secreción que liberan efectores y toxinas en el hospedero, proteasas y toxinas que causan daño tisular, entre otros (Liao *et al.*, 2022). Decidimos analizar los genes de virulencia debido a que previos estudios de genómica comparativa, utilizando cepas provenientes de infecciones oculares y de pacientes con fibrosis quística, han reportado diferencias en la presencia de ciertos genes, tales como *exoU* y *exoS*.

ExoS, ExoT, ExoU y ExoY son exotoxinas exportadas directamente en las células del hospedero a través de un sistema de secreción tipo 3. En este estudio, la variación en la presencia y ausencia de genes de virulencia fue más evidente en estas proteínas efectoras. *exoS* codifica una citotoxina con actividad de proteína activadora de GTPasa (GAP, por sus siglas en inglés) y actividad de adenosina difosfato ribosil transferasa (ADPRT, por sus siglas en inglés) (Jouault *et al.*, 2022) y se encontró principalmente en los genomas de cepas de orina.

Por otro lado, ExoU es una citotoxina con actividad fosfolipasa A2 que causa lisis y necroptosis en células epiteliales, macrófagos y neutrófilos (Foulkes *et al.*, 2019). Se ha demostrado en modelo de ratón que la producción de ExoU contribuye al desarrollo de neumonía grave (Diaz *et al.*, 2008), y a resultados desfavorables en pacientes con neumonía asociada a ventilación mecánica (Hauser *et al.*, 2002). *exoU* se encontró principalmente en genomas de cepas aisladas de esputo. Sin embargo, en otros estudios también se ha encontrado en cepas aisladas de ojo (Stewart *et al.*, 2011; Subedi *et al.*, 2018). Del mismo modo, se ha sugerido que debido a que el gen *exoU* está ausente en PAO1 y es acarreado por islas

genómicas, pudo haber sido adquirido por transferencia horizontal (Sawa *et al.*, 2014) para proporcionar ventajas adaptativas.

Por razones que no están del todo claras, *exoU* y *exoS* son mutuamente excluyentes. Sin embargo, en este y otros estudios se han encontrado cepas portadoras de ambas citotoxinas (Hassuna *et al.*, 2020; Yousefi-Avarvand *et al.*, 2015). Una posible explicación que se ha sugerido es que proporcionan un mayor *fitness* en distintos nichos ecológicos (Horna *et al.*, 2019).

ExoY es una adenilil ciclasa cuya acción altera el citoesqueleto de actina, inhibe la captación bacteriana por las células del hospedero y aumenta la permeabilidad endotelial. Sin embargo, la importancia de ExoY en las infecciones sigue sin estar clara (Hauser, 2009). El gen *exoY* se observó sobre todo en genomas de cepas urinarias y ambientales. Sin embargo, otros estudios también lo han observado en cepas aisladas de ojo y de fibrosis quística (Subedi *et al.*, 2018). ExoT es la efectora más prevalente en los genomas de cepas clínicas y ambientales de *P. aeruginosa* (Feltman *et al.*, 2001; Jurado-Martín *et al.*, 2021). En este estudio se encontró en el 100% de los genomas analizados.

Por otra parte, la prevalencia de los genes *plcN*, *plcH*, *lasB* y *toxA* fue del 100% (excepto para *plcN*) en las tres fuentes de aislamiento, contrariamente a lo observado por Hassuna *et al.*, (2020) en aislados de infecciones del tracto respiratorio. Por otro lado, *plcB* y *plcH* se detectaron en el 98.7% (153/155) y el 96.1% (149/155) de las cepas recuperadas de infecciones nosocomiales e infecciones adquiridas en la comunidad (Elmouaden *et al.*, 2019), lo que indica que están muy conservadas en el genoma de *P. aeruginosa*. La razón de las diferencias en la distribución de estos genes en distintos estudios sigue sin estar clara. Por último, *pldA* se encontró sobre todo en los genomas de cepas de esputo. En otro estudio, también se encontró mayoritariamente en cepas responsables de infección pulmonar aguda y, en menor medida, en cepas provenientes de infección del tracto urinario (Boulant *et al.*, 2018). Además, se ha sugerido que desempeña un papel en la infección pulmonar crónica en ratas (Wilderman *et al.*, 2001).

Es importante señalar que, aunque los genes de virulencia fueron más prevalentes en los genomas de cepas clínicas, también estaban presentes en menor cantidad en los genomas de cepas ambientales, como también ha sido reportado por otro autor (Alva *et al.*, 2018). Esto reforzaría la idea de que las cepas ambientales también pueden causar infecciones (Dettman & Kassen, 2021) y ser un potencial factor de riesgo para la salud humana (Radó *et al.*, 2017), y pone de manifiesto que la prevalencia de genes de virulencia puede variar en función del sitio de aislamiento.

Dado que observamos en nuestro análisis de genómica comparativa la presencia de plásmidos que portaban genes como *bla*_{IMP} y otros elementos genéticos móviles en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* del Hospital de Puebla, decidimos realizar un análisis detallado de estos elementos genéticos móviles en las cepas PE21, PE52, PE83, así como en otras cuatro cepas relevantes: PE112, PE151, PE197 y PE224, que provenían del mismo hospital. Además, a pesar de que recientemente se han reportado carbapenemasas tipo *bla*_{KPC-2}, *bla*_{VIM-1}, y *bla*_{IMP-45} acarreadas por plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad en *P. aeruginosa* (Yoon & Jeong, 2021), la información disponible sobre los plásmidos en esta bacteria y su papel en la diseminación de genes de resistencia sigue siendo limitada. Lo anterior puede atribuirse, en parte, a los diversos mecanismos de resistencia intrínseca presentes en este microorganismo y a su complejo sistema de regulación que le permite adaptarse y sobrevivir en diversos entornos, reduciendo la necesidad de adquirir material genético a través de transferencia horizontal.

Primero analizamos la cepa PE52, en la que se observó de manera experimental que es portadora de *bla*_{IMP-56} y *bla*_{IMP-18} y dos plásmidos (López-García *et al.*, 2018). Sin embargo, por secuenciación masiva encontramos sólo un plásmido al que llamamos pPE52IMP. Esto puede deberse a las tecnologías de secuenciación que utilizamos para la secuenciación del genoma de PE52, o bien, pudo haber perdido el plásmido durante su almacenaje.

El plásmido pPE52IMP fue portador de *bla*_{IMP-56}, su contenido de GC fue menor al del cromosoma de *P. aeruginosa* (aproximadamente 66,6%) (Kung *et al.*, 2010),

pero es similar al contenido de GC reportado en otros plásmidos encontrados en este microorganismo (de 45,8% a 63,8%) (Shintani *et al.*, 2015). Esto coincide con un estudio previo que reveló que el contenido promedio de GC de los plásmidos era 10% inferior al del cromosoma de su huésped, ya que los plásmidos con contenido de GC muy diferente no podrían mantenerse estables en su hospedero (Nishida, 2012).

pPE52IMP estaba conformado por los módulos de estabilidad, replicación transferencia y adaptación. El módulo de estabilidad generalmente comprende de un sistema de partición que contribuye a la segregación del plásmido, un sistema de adicción que asegura la muerte de las células libres de plásmido, y sistemas de resolución de multímeros que previenen la formación de multímeros de plásmido (Norman *et al.*, 2009). El sistema de partición consiste en una ATPasa (*parA*), una secuencia de ADN similar a un centrómero (*parC*) y una proteína de unión al ADN (*parB*) (Kawalek *et al.*, 2020); esta última está compuesta por un dominio central de unión al ADN HTH flanqueado por un dominio de dímero C-terminal y una región N-terminal necesaria para la oligomerización de la proteína (Funnell, 2016). En el plásmido pPE52IMP, sólo se encontraron los genes *parA* y *parC*, pero el gen *parB* no. Posteriormente, se analizaron los dominios de las proteínas hipotéticas y ninguna presentó dominios que pudieran indicar que están jugando el papel de *parB*. Por otra parte, se ha demostrado que el gen *kfrA* actúa como autorregulador transcripcional y participa en la estabilidad del plásmido (Adamczyk *et al.*, 2006, 2021; Lewicka *et al.*, 2021), lo que sugiere que este gen podría estar implicado en la estabilidad de pPE52IMP. Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales para comprender cómo se lleva a cabo el proceso de segregación en este plásmido y si *kfrA* pudiera estar implicado. Igualmente, pPE52IMP tuvo un sistema de adicción compuesto por el sistema toxina- antitoxina *doc/phd*, el cual es un sistema de tipo II donde Doc (*death on curing*) que es una toxina, es bloqueada directamente por la antitoxina Phd (*prevents host death*). Se ha reportado que este sistema desempeña un papel importante en la persistencia, estabilidad, muerte celular programada y la respuesta al estrés del plásmido (Yang & Walsh, 2017).

Por otro lado, los plásmidos conjugativos llevan dos conjuntos de genes; el primero permite el procesamiento del ADN (genes de transferencia y replicación del ADN (Dtr)), y el segundo es un complejo de formación de pares de apareamiento (Mpf) asociado a la membrana (una forma de sistema de secreción tipo 4). En cambio, los plásmidos movilizables utilizan el Mpf de otro elemento genético en la misma célula para moverse (Costa *et al.*, 2021; Smillie *et al.*, 2010). El módulo de transferencia de pPE52IMP consiste en los genes *traK*, *traJ* y *traI* de plásmidos tipo IncP que son esenciales para la formación del relaxosoma, y los genes de transferencia conjugativa *trbJ*, *trbK* y *trbL* que están implicados en la formación del sistema Mpf. Sin embargo, los genes *traH* (actividad chaperona), *traG* (proteína de acoplamiento), *traA*, *traB*, *traD* y *traE* (no esenciales para la conjugación) y los genes *trbBCDEFGHI* (necesarios para la formación del sistema Mpf) están ausentes en pPE52IMP (Adamczyk & Jagura-Burdzy, 2003), lo que sugiere que podría tratarse de un plásmido movilizable. Además, la ausencia de transconjugantes en los experimentos de conjugación realizados anteriormente por Gómez-Martínez 2017, refuerza este análisis.

Los operones de mercurio comprenden genes que confieren resistencia a mercurio (*merEDAPTR*) y suelen localizarse en transposones e integrones transportados por plásmidos (Nascimento *et al.*, 2003). pPE52IMP lleva el operón *mer* localizado junto a los genes *tn21* y *tnpR* que forman parte de elementos transponibles de la familia Tn3.

Por otro lado, algunos autores han utilizado características del “backbone” del plásmido para diseñar esquemas de clasificación como la tipificación por repicones basada en PCR (PBRT) (Carattoli *et al.*, 2005) y la tipificación por oligonucleótidos degenerados MOB (DPMT) (Alvarado *et al.*, 2012) basadas en las funciones de replicación y movilidad del plásmido, respectivamente (Orlek *et al.*, 2017). Los plásmidos de *P. aeruginosa* que poseían un “backbone” similar al de pPE52IMP tenían una relaxasa de la subfamilia MOB_{P11} según la tipificación por MOB (Alvarado *et al.*, 2012); esto concuerda con los hallazgos reportados por López-García, 2018 y Gómez-Martínez, 2017. Esto podría estar relacionado a que la subfamilia MOB_{P11}

pertenece a la superfamilia MOB_P, que es una de las más abundantes en plásmidos de gammaproteobacterias (incluyendo *Pseudomonas*) (Garcillán-Barcia & de la Cruz, 2013).

pPE52IMP y los plásmidos con “*backbone*” similar no pudieron clasificarse mediante PBRT (Carattoli *et al.*, 2005), lo que puede estar relacionado con el hecho de que este esquema se centra en clasificar plásmidos de Enterobacterales pero no de otras familias bacterianas. Igualmente, pPE52IMP no perteneció a ninguno de los 14 grupos de incompatibilidad descritos en *P. aeruginosa* (IncP-1 a IncP-14). De hecho, algunos estudios han podido clasificar una cantidad pequeña de los plásmidos de *Pseudomonas*, por ejemplo, Shintani *et al.*, 2015 reportaron que de los 183 plásmidos de Pseudomonadales que analizaron, solamente 21 pudieron clasificarse en los grupos de incompatibilidad IncP (Shintani *et al.*, 2015). Lo anterior refleja la necesidad de desarrollar una técnica para clasificar los plásmidos de *P. aeruginosa*. No obstante, la clasificación de los plásmidos mediante el uso de la tipificación por MOB podría resultar útil en algunos casos.

Bertini *et al.*, 2010 diseñaron una clasificación para los plásmidos de *Acinetobacter baumannii* basada en la homología de la secuencia de la replicasa que identificaba 19 grupos de homología (GR) (Bertini *et al.*, 2010). Los genes de la replicasa que compartían al menos un 74% de identidad estaban en el mismo grupo de homología. Otros autores han añadido más grupos utilizando los mismos criterios de identidad, reportando hasta la fecha 33 GR (Salgado-Camargo *et al.*, 2020). Por lo tanto, utilizamos criterios similares para conocer la distribución y comportamiento de RepA en pPE52IMP y plásmidos de *P. aeruginosa* reportados en el GenBank. Es importante destacar que sólo incluimos en el análisis los plásmidos portadores de genes de resistencia a antibióticos. Encontramos que los RepA de plásmidos pertenecientes al mismo grupo de incompatibilidad (IncP-2, IncP-7, IncP-6) se agruparon en tres clados, probablemente porque los plásmidos pertenecientes al mismo grupo de incompatibilidad tienen el mismo o relacionado sistema de replicación/partición (Thomas, 2014). Por otro lado, la RepA de pPE52IMP y los plásmidos con “*backbone*” similar se agruparon todas en un clado, lo que indica que

están estrechamente relacionados y que probablemente son una nueva familia de plásmidos.

Según la información disponible en el GenBank, las cepas de *P. aeruginosa* y de los otros géneros portadoras de plásmidos similares a pPE52IMP fueron aisladas de EE.UU. (principalmente), Brasil, Francia, Argentina y Japón, lo que indicaría que estos plásmidos están circulando en diferentes países y actuando como vehículos para la diseminación de genes de resistencia a antibióticos.

Los plásmidos estrechamente relacionados suelen tener un *core* denominado "*backbone*" asociado a funciones específicas del plásmido, como la iniciación de la replicación, la conjugación y la estabilidad. Además, el "*backbone*" puede incluir genes de virulencia y genes de resistencia a antibióticos y metales pesados que confieren ventajas adaptativas a la bacteria (Norberg *et al.*, 2011). En el análisis del árbol filogenético, encontramos cuatro plásmidos de cepas de *P. aeruginosa* y un plásmido de una cepa reportada en el GenBank (que no fue incluido en el árbol filogenético porque su RepA estaba trunca) que tienen el "*backbone*" similar al de pPE52IMP. Además, los plásmidos tenían una región variable con genes de resistencia a carbapenémicos tales como *bla*_{VIM-6}, *bla*_{VIM-7}, *bla*_{KPC-2}, y otros genes codificantes de beta-lactamasas como *bla*_{OXA-779}, *bla*_{OXA-732} y *bla*_{OXA-10} transportados por integrones de clase 1 y transposones.

Se han identificado plásmidos que poseen un "*backbone*" conservado en los cuales se han insertado genes de resistencia a antibióticos en regiones conocidas como *hotspot*; en algunos de estos plásmidos, el gen *repA* actúa como *hotspot* (Bonnin *et al.*, 2013; Jain & Srivastava, 2013; Naas *et al.*, 2013). En este estudio, los genes de resistencia a antibióticos de los plásmidos analizados se encuentran insertados entre *phd* y un gen resolvasa, por lo que podría ser un *hotspot* potencial para integrar los genes de resistencia en este tipo de plásmidos, pero son necesarios más estudios.

Durante la búsqueda de plásmidos en el GenBank, encontramos dos plásmidos que tenían "*backbone*" similar a pPE52IMP en bacterias que no están estrechamente relacionadas con *P. aeruginosa*: el plásmido p138R de *A. ruhlandii*, y pSMC1 de *S.*

marcescens, que portaban los genes *aadA1*, *aac(6')-Ib4*, *bla_{CMY-8}*, y *bla_{IMP-1}*. Estos resultados indican que los plásmidos pPE52IMP-like podrían ser de amplio rango de hospedero (Jain & Srivastava, 2013), permitiendo la diseminación de genes de resistencia entre bacterias distintas a *P. aeruginosa*. Sin embargo, se necesitarían experimentos de transformación con bacterias receptoras de otros géneros para confirmar el rango de hospedero de este tipo de plásmidos.

Curiosamente, las cepas PE112 y PE197 también acarrean un plásmido cuya estructura es similar a pPE52IMP, excepto porque portan una variante diferente de *bla_{IMP}* (*bla_{IMP-83}*). Por otro lado, las cepas PE21, PE151 y PE224 acarrean el mismo plásmido pPE52IMP-like, pero integrados en el cromosoma. Estos portaron integrones con los genes de resistencia *aacA7*, *bla_{IMP-62}*, *qacH*, *aacA4*, *aadA1*, *bla_{OXA-2}* y *aadA1* (PE21), *aacA4* (PE151) y *bla_{GES-9}*, *aadA1*, *aadA6* y *aacA4* (PE224). Esto indica que el plásmido podría estar circulando entre las cepas del Hospital de Puebla, y desempeñando un papel importante en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos. Esto es reforzado por el hecho de que las cepas se aislaron en diferentes años y aun así el plásmido continúa siendo prevalente con el paso del tiempo.

Se ha reportado que las bacterias pueden integrar a su cromosoma plásmidos que portan funciones beneficiosas, como los genes de resistencia a antibióticos, para evitar la pérdida del plásmido durante la segregación (Carroll & Wong, 2018). Estos plásmidos se integran regularmente en sitios de genes de *tRNA* del cromosoma del hospedero (Bi *et al.*, 2016). Sin embargo, en este estudio los plásmidos integrados no se encontraron flanqueados por *tRNA*, sino por secuencias relacionadas con transposones. Sugiriendo la posibilidad de que podrían estar involucradas con la integración por recombinación (Partridge *et al.*, 2018). Hasta el momento sólo se ha informado de un plásmido integrado en el cromosoma de *P. aeruginosa*, el pHS87b, que alberga un integrón clase 1 con el gen *aacA4*, y que se integró en un sitio *tRNA^{Thr}* gracias a la acción de una integrasa del fago P4 (Bi *et al.*, 2016). La limitada cantidad de información sobre este tema en *P. aeruginosa*, puede deberse a que la

integración de un plásmido es un evento poco común y como resultado, no ha sido ampliamente estudiado.

Además de estos plásmidos, las cepas PE21, PE83, PE112, PE151, PE197 y PE224 tuvieron otros elementos genéticos móviles portando genes de resistencia a antibióticos. PE21 tuvo un megaplásmido con *bla*_{GES-32}. PE112 y PE197 portaron una ICE putativa con *bla*_{IMP-18} y un fago-plásmido. Por último, PE151 y PE224 tuvieron un transposón Tn610 portando *bla*_{IMP-99} y un plásmido sin genes de resistencia.

El megaplásmido de PE21 fue nombrado pPE21GES-32. Su estructura es similar a la del plásmido pOZ176 que pertenece al IncP-2 (Xiong *et al.*, 2013). Sin embargo, tiene algunas diferencias, la más destacable es que porta los genes de resistencia *bla*_{GES-32}, *aacA33*, *aadA1*, *aph(3'')-I*, *aph(6)-Id* y *aph(3')-VII*, en comparación con pOZ176 que codifica los genes de resistencia *bla*_{IMP-9} y *aacA4*. Igualmente, el gen *repA*-IncP2 no fue encontrado en pPE21GES-32, pero tiene una replicasa que es similar a la de plásmidos tipo IncQ. El replicón de los plásmidos tipo IncQ consta de 3 genes, *repA* que es una helicasa, *repB* que es una primasa y *repC* que es una proteína de unión a ADN específica de *iteron* (Rawlings & Tietze, 2001), siendo esta última la única encontrada en pPE21GES-32.

Un hallazgo interesante en la estructura de pPE21GES-32 es que porta una bomba de eflujo MexCD-OprJ, involucrada en la resistencia a aminoglucósidos (Cazares *et al.*, 2020). Esta bomba es regulada por *nfxB*, que cuando adquiere mutaciones produce la sobreexpresión de MexCD-OprJ (Jamal *et al.*, 2023). Sin embargo, en este plásmido el regulador se encuentra ausente. Es importante mencionar que los genes que codifican MexCD-OprJ también se encontraron en el cromosoma de la cepa PE21, pero se desconoce si *nfxB* puede actuar en *trans*. Por otro lado, la estructura de pPE21GES-32 también fue similar a la de los plásmidos incluidos en un linaje de plásmidos IncP-2 asociados con la diseminación de *bla*_{IMP-45} (Zhang *et al.*, 2021) y a plásmidos reportados en especies no *aeruginosa* (*P. citronellolis*, *P. koreensis*) (Cazares *et al.*, 2020). Sugiriendo que plásmidos similares son

ampliamente distribuidos y relacionados con la diseminación de genes de resistencia a antibióticos.

En la cepa PE83 identificamos la secuencia parcial de dos plásmidos similares a pPE21GES-32 y pPE52IMP. Esto es debido a que usamos secuenciación de lecturas cortas Illumina que generó un ensamble con múltiples *contigs* que impidió la localización de los genes de resistencia *bla*_{IMP-62} y *bla*_{GES-26}. Para resolver este problema, se puede llevar a cabo una nueva secuenciación del genoma utilizando tecnologías de secuenciación de lecturas largas, como minION y PacBio, con el fin de generar un ensamble híbrido.

Los plásmidos de las cepas PE151 y PE224 se les denominaron pPE151 y pPE224, respectivamente. Estos cuentan con módulos de replicación, estabilidad y transferencia y un contenido de GC de 57.9% que es similar a lo reportado en otros plásmidos de *P. aeruginosa* (de 45,8% a 63,8%) (Shintani *et al.*, 2015). Sin embargo, algo a destacar es su sistema de conjugación de plásmidos IncI1, el cual codifica tanto un pilus conjugativo grueso y rígido como un pilus delgado y flexible (Foley *et al.*, 2021). El pilus grueso es esencial para la transferencia tanto en medio líquido como en superficies, mientras que el pilus delgado sólo es necesario para la conjugación en medio líquido (Yoshida *et al.*, 1999). No obstante, algunos genes están ausentes en la maquinaria del pilus grueso como *traABCDEFGHIXVSRQPLKJ*, *trbAB* y *nikAB*. TrbA es una proteína del complejo de acoplamiento del SST4, *trbB* es una disulfito isomerasa (Sampei *et al.*, 2010), *traB* y *traC* codifican proteínas esenciales para la transferencia conjugativa en medios líquidos y sólidos (Foley *et al.*, 2021), *traA* facilita la activación de *traBC* (Poidevin *et al.*, 2018), *traQ* forma el apéndice del pilus, *traP* forma un multímero con *traO*. Igualmente, *traK* es esencial para la función del sistema de secreción tipo 4, NikA es una proteína de unión a *oriT* y *nikB* es una relaxasa (Foley *et al.*, 2021), por mencionar sólo algunos genes que tienen funciones importantes en la transferencia conjugativa. Por otro lado, los genes *pilSUVKQSJ* estuvieron ausentes en el pilus delgado y flexible. *pilS* codifica una prepilina mayor, *pilV* una prepilina menor (adhesina) y *pilQ* es una ATPasa (Foley *et al.*, 2021), por mencionar algunos. Basado en el análisis bioinformático,

podríamos inferir que los plásmidos pPE151 y pPE224 no son conjugativos. Sin embargo, se requieren experimentos de conjugación para corroborarlo.

Igualmente, es importante destacar que, si bien los plásmidos pPE151 y pPE224 no portan genes de resistencia a antibióticos, recientemente se reportó un plásmido con estructura similar (p201330-IMP) que acarrea la carbapenemasa *bla*_{IMP-1} (GenBank: MN961671.1) en una cepa de *P. aeruginosa*. Lo anterior resalta la importancia de continuar con la vigilancia de este plásmido, ya que existe la posibilidad de que adquiera genes de resistencia en el futuro y contribuir a su diseminación dentro del entorno hospitalario.

Los integrones clase 1 han sido asociados con varias secuencias de inserción como IS6100 (Jeon *et al.*, 2023). IS6100 pertenece a la familia IS6/IS26, que desempeña un papel importante en la propagación de genes de resistencia a antibióticos y se considera de gran relevancia clínica (Harmer & Hall, 2019). En las cepas PE151 y PE224 también encontramos la *bla*_{IMP-99} dentro de un integrón clase 1, el cual está flanqueado por IS6100 que forma parte de un transposón Tn610. Aunque IS6100 se identificó por primera vez en *Mycobacterium fortuitum*, también se ha reportado codificada en plásmidos en otras bacterias como *Arthrobacter sp* y *P. aeruginosa* (Varani *et al.*, 2021).

El intercambio genético por elementos genéticos móviles como fagos y plásmidos ha sido ampliamente estudiado. Sin embargo, existen otros elementos que también ayudan a la diseminación de genes y que son menos estudiados, como los fago-plásmidos. Estos son fagos temperados que se transfieren horizontalmente como virus, pero permanecen y se replican dentro de la bacteria como plásmidos (Pfeifer *et al.*, 2022). En este estudio, encontramos que las cepas PE112 y PE197 tienen un fago-plásmido de 35,922 pb. Su estructura está compuesta de genes de plásmido como *higA/higB*, *parA*, *merPTR*, pero no pudimos detectar *parB* y genes de replicación. Esto no es raro, ya que es consistente con un estudio donde encontraron que algunos fagos-plásmidos codifican al menos un *parA* y otros no tuvieron sistemas de replicación, sugiriendo que usan mecanismos de replicación aún desconocidos (Pfeifer *et al.*, 2021). La parte restante de la estructura es un fago

completo de aproximadamente 32 kb, que porta genes homólogos a los de fagos P2, lambda y Mu. No obstante, su secuencia no se asemeja a la de ningún fago previamente reportado, sugiriendo la posibilidad de que se trate de un fago nuevo. Por otro lado, es importante destacar que el tamaño de este fago-plásmido es similar al tamaño de la banda observada con PFGE-S1, lo que refuerza el hallazgo del fago-plásmido de manera extracromosómica. Sin embargo, para confirmarlo se requiere realizar un *southern-blot* con sondas específicas para el fago.

Aunque los fago-plásmidos de PE112 y PE197 no fueron portadores de genes de resistencia, se han encontrado fago-plásmidos que codifican genes de resistencia como *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC} (tipo 2, 3, 4 y 33), *mcr*, entre otros (Pfeifer *et al.*, 2022). Sugiriendo que existe la posibilidad de que puedan adquirir genes de resistencia y contribuir a su diseminación dentro del entorno hospitalario.

Como podemos observar encontramos diferentes variantes de *bla*_{IMP} en las cepas circulantes en el Hospital de Puebla, como *bla*_{IMP-18}, *bla*_{IMP-56}, *bla*_{IMP-83} y la nueva variante *bla*_{IMP-99}, que son derivadas de *bla*_{IMP-18} y *bla*_{IMP-62} que deriva de *bla*_{IMP-15}. Esta variabilidad de beta-lactamasas puede deberse a la fuerte presión de selección ejercida por los antimicrobianos, que resulta en numerosas familias y subfamilias, así como múltiples variantes (Salahuddin & Khan, 2014). Estas mutaciones pueden causar un cambio estructural de la enzima ocasionando diferencias importantes en las propiedades bioquímicas, los espectros del sustrato, los perfiles de inhibición y, como consecuencia, a los fenotipos de resistencia (Gniadkowski, 2008). Es por lo anterior, que debemos mantener la vigilancia de las variantes de carbapenemasas y estudiar si hay cambios importantes en su espectro de hidrólisis, y el estudio de los elementos que las transfieren.

9. CONCLUSION

Al realizar el análisis filogenético de genomas de un hospital mexicano y del GenBank de diferentes nichos, observamos que los genomas se agrupan de acuerdo con la secuencia tipo y no a su origen de aislamiento. Pero se muestran notables diferencias en el contenido de genes de resistencia, elementos genéticos móviles y genes de virulencia en función del nicho ecológico de las cepas. Destacando la presencia de genes involucrados en la adaptación al medio ambiente en los genomas ambientales y la presencia de mutaciones de genes relacionados a la resistencia a los antibióticos, en contraste con los genomas clínicos que no portan esos genes de adaptación y portan en su mayoría genes de resistencia acarreados en elementos genéticos móviles y movilizables presentes en el cromosoma. En contraste con las cepas del hospital poblano donde se destaca la presencia de plásmidos acarreando genes de resistencia. En el caso del viruloma se muestra la presencia de *exoS* en genomas urinarios y *exoU* y *pldA* en esputo. Por otro lado, reportamos que las cepas del hospital poblano acarrean plásmidos y/o plásmidos integrados en el cromosoma y fagos-plásmidos. Donde destacamos la caracterización del primer plásmido albergando *bla*_{IMP-56} (pPE52IMP) que pertenece a una nueva familia de plásmidos descrita en este trabajo que acarrean genes de resistencia con la misma RepA y similar *backbone*.

10. PERSPECTIVAS

- Caracterizar bioinformática y experimentalmente los fago-plásmidos de las cepas PE112 y PE197.
- Buscar los sitios de integración al cromosoma de los plásmidos integrados de las cepas PE21, PE151 y PE224.
- Corroborar que el fago-plásmido es extracromosómico mediante experimentos de *southern-blot* con sondas específicas.
- Determinar si los plásmidos pPE151 y pPE224 son conjugativos mediante experimentos de conjugación.
- Determinar el espectro de acción de la nueva variante *bla*_{IMP-99}.
- Secuenciar con minION el genoma de la cepa PE83 para continuar con la caracterización de los plásmidos.
- Determinar si *kfrA* pudiera estar implicado en el proceso de segregación de plásmidos pPE52IMP-like.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Acharya, M., Joshi, P. R., Thapa, K., Aryal, R., Kakshapati, T., & Sharma, S. (2017). Detection of metallo- β -lactamases-encoding genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital, Kathmandu, Nepal. *BMC Res Notes*, *10*(1), 1–5.
- Adamczyk, M., & Jagura-Burdzy, G. (2003). Spread and survival of promiscuous IncP-1 plasmids. *Acta Biochim Pol*, *50*(2), 425–453.
- Adamczyk, M., Dolowy, P., Jonczyk, M., Thomas, C. M., & Jagura-Burdzy, G. (2006). The kfrA gene is the first in a tricistronic operon required for survival of IncP-1 plasmid R751. *Microbiology*, *152*(6), 1621–1637.
- Adamczyk, M., Lewicka, E., Szatkowska, R., Nieznanska, H., Ludwiczak, J., Jasiński, M., Dunin-Horkawicz, S., Sitkiewicz, E., Swiderska, B., Goch, G., & Jagura-Burdzy, G. (2021). Revealing biophysical properties of KfrA-type proteins as a novel class of cytoskeletal, coiled-coil plasmid-encoded proteins. *BMC Microbiol*, *21*(1).
- Akasaka, T., Tanaka, M., Yamaguchi, A., & Sato, K. (2001). Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, *45*(8), 2263–2268.
- Almeida, S. L. (2015). Health Care-Associated Infections (HAIs). *J Emerg Nurs*, *41*(2), 100–101.
- Almendros, C., Guzmán, N. M., García-Martínez, J., & Mojica, F. J. M. (2016). Anticas spacers in orphan CRISPR4 arrays prevent uptake of active CRISPR-Cas I-F systems. *Nat Microbiol*, *1*(8).
- Alva, P. P., Raj, J. M., Karunasagar, I., & Premanath, R. (2018). Environmental and clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates with pooled presence of *exoS*, *exoU*, *exoT* and *exoY* genes. *J Pure Appl Microbiol*, *12*(3), 1119–1124.
- Alvarado, A., Garcillán-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2012). A degenerate primer MOB typing (DPMT) method to classify gamma-proteobacterial plasmids in clinical and environmental settings. *PloS One*, *7*(7).
- Al-Wrafy, F., Brzozowska, E., Górska, S., & Gamian, A. (2017). Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* - the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, *71*(0), 78–91.

- Arndt, D., Grant, J. R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., & Wishart, D. S. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res*, *44*(W1), W16–W21.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., ... Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genom*, *9*.
- Babakhani, S., & Oloomi, M. (2018). Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *J Basic Microbiol*, *58*(11), 905–917.
- Bahr, G., González, L. J., & Vila, A. J. (2021). Metallo- β -lactamases in the Age of Multidrug Resistance: From Structure and Mechanism to Evolution, Dissemination, and Inhibitor Design. *Chem Rev*, *121*(13), 7957–8094.
- Balero de Paula, S., Cayô, R., Streling, A. P., Silva Nodari, C., Pereira Matos, A., Eches Perugini, M. R., Gales, A. C., Carrara-Marroni, F. E., & Yamada-Ogatta, S. F. (2017). Detection of blaVIM-7 in an extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate belonging to ST1284 in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*, *89*(1), 80–82.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Pribelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J comput biol: a J comput mol cell biol*, *19*(5), 455–477.
- Baquero, F., Tedim, A. P., & Coque, T. M. (2013). Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. *Front Microbiol*, *4*(MAR).
- Bardaji, L., Añorga, M., Ruiz-Masó, J. A., del Solar, G., & Murillo, J. (2017). Plasmid Replicons from *Pseudomonas* Are Natural Chimeras of Functional, Exchangeable Modules. *Front Microbiol*, *8*(FEB).
- Barton, B. M., Harding, G. P., & Zuccarelli, A. J. (1995). A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem*, *226*(2), 235–240.
- Bathoorn, E., Tsioutis, C., da Silva Voorham, J. M., Scoulica, E. V., Ioannidou, E., Zhou, K., Rossen, J. W., Gikas, A., Friedrich, A. W., & Grundmann, H. (2016). Emergence of pan-resistance in KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Crete, Greece: A close call. *J Antimicrob Chemother*, *71*(5), 1207–1212.

- Berrazeg, M., Jeannot, K., Ntsogo Enguéné, V. Y., Broutin, I., Loeffert, S., Fournier, D., & Plésiat, P. (2015). Mutations in β -Lactamase AmpC Increase Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Antipseudomonal Cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*, *59*(10), 6248–6255.
- Bertelli, C., Laird, M. R., Williams, K. P., Lau, B. Y., Hoad, G., Winsor, G. L., & Brinkman, F. S. L. (2017). IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic Acids Res*, *45*(W1), W30–W35.
- Bertini, A., Poirel, L., Mugnier, P. D., Villa, L., Nordmann, P., & Carattoli, A. (2010). Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, *54*(10), 4168–4177.
- Bi, D., Xie, Y., Tai, C., Jiang, X., Zhang, J., Harrison, E. M., Jia, S., Deng, Z., Rajakumar, K., & Ou, H. Y. (2016). A site-specific integrative plasmid found in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate HS87 along with a plasmid carrying an aminoglycoside-resistant gene. *PLoS ONE*, *11*(2).
- Bianconi, I., Jeukens, J., Freschi, L., Alcalá-Franco, B., Facchini, M., Boyle, B., Molinaro, A., Kukavica-Ibrulj, I., Tümmler, B., Levesque, R. C., & Bragonzi, A. (2015). Comparative genomics and biological characterization of sequential *Pseudomonas aeruginosa* isolates from persistent airways infection. *BMC Genom*, *16*(1).
- Bisht, K., Baishya, J., & Wakeman, C. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* polymicrobial interactions during lung infection. *Curr Opin Microbiol*, *53*, 1–8.
- Bondy-Denomy, J., Garcia, B., Strum, S., Du, M., Rollins, M. F., Hidalgo-Reyes, Y., Wiedenheft, B., Maxwell, K. L., & Davidson, A. R. (2015). Multiple mechanisms for CRISPR-Cas inhibition by anti-CRISPR proteins. *Nature*, *526*(7571), 136–139.
- Bonnin, R. A., Nordmann, P., Carattoli, A., & Poirel, L. (2013). Comparative genomics of IncL/M-type plasmids: Evolution by acquisition of resistance genes and insertion sequences. *Antimicrob Agents Chemother*, *57*(1), 674–676.
- Bonnin, R. A., Poirel, L., Nordmann, P., Eikmeyer, F. G., Wibberg, D., Pühler, A., & Schlüter, A. (2013). Complete sequence of broad-host-range plasmid pNOR-2000 harbouring the metallo- β -lactamase gene blaVIM-2 from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*, *68*(5), 1060–1065.
- Bonomo, R. A. (2017). β -Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *7*(1), a025239.
- Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen,

- M., Coppens, J., Xavier, B. B., ... Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother*, 75(12), 3491–3500.
- Botelho, J., Grosso, F., & Peixe, L. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology, and evolution. *Drug Resist Updat*, 44, 100640.
- Botelho, J., Grosso, F., & Peixe, L. (2020). ICEs Are the Main Reservoirs of the Ciprofloxacin-Modifying *crpP* Gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Genes*, 11(8), 1–12.
- Boulant, T., Boudehen, Y. M., Filloux, A., Plesiat, P., Naas, T., & Dortet, L. (2018). Higher Prevalence of PldA, a *Pseudomonas aeruginosa* Trans-Kingdom H2-Type VI Secretion System Effector, in Clinical Isolates Responsible for Acute Infections and in Multidrug Resistant Strains. *Front Microbiol*, 9.
- Bouras, G., Nepal, R., Houtak, G., Psaltis, A. J., Wormald, P. J., & Vreugde, S. (2023). Pharokka: a fast scalable bacteriophage annotation tool. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 39(1).
- Breidenstein, E. B. M., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. W. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance. *Trends Microbiol.*, 19(8), 419–426.
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(3), 969–976.
- Cabezón, E., de la Cruz, F., & Arechaga, I. (2017). Conjugation Inhibitors and Their Potential Use to Prevent Dissemination of Antibiotic Resistance Genes in Bacteria. *Front Microbiol*, 8(NOV).
- Cantón, R., González-Alba, J. M., & Galán, J. C. (2012). CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Front Microbiol*, 3(APR).
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., & Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*, 63(3), 219–228.
- Carroll, A. C., & Wong, A. (2018). Plasmid persistence: costs, benefits, and the plasmid paradox. *Can J Microbiol*, 64(5), 293–304.
- Cazares, A., Moore, M. P., Hall, J. P. J., Wright, L. L., Grimes, M., Emond-Rhéault, J.-G., Pongchaikul, P., Santanirand, P., Levesque, R. C., Fothergill, J. L., & Winstanley, C., (2020). A megaplasmid family driving dissemination of multidrug resistance in *Pseudomonas*. *Nat commun.* 11(1):1370.

- Chávez-Jacobo, V. M., Hernández-Ramírez, K. C., Romo-Rodríguez, P., Viridiana Pérez-Gallardo, R., Campos-García, J., Félix Gutiérrez-Corona, J., Pablo García-Merinos, J., Meza-Carmen, V., Silva-Sánchez, J., & Ramírez-Díaz, M. I. (2018). CrpP Is a Novel Ciprofloxacin-Modifying Enzyme Encoded by the *Pseudomonas aeruginosa* pUM505 Plasmid. *Antimicrob Agents Chemother*, 62(6).
- Collins, R. E., & Higgs, P. G. (2012). Testing the infinitely many genes model for the evolution of the bacterial core genome and pangenome. *Mol Biol Evol*, 29(11), 3413–3425.
- Coluzzi, C., Garcillán-Barcia, M. P., De La Cruz, F., & Rocha, E. P. C. (2022). Evolution of Plasmid Mobility: Origin and Fate of Conjugative and Non-conjugative Plasmids. *Mol Biol Evol*, 39(6).
- Contreras-Gómez, M. J., Martínez, J. R. W., Rivas, L., Riquelme-Neira, R., Ugalde, J. A., Wozniak, A., García, P., Munita, J. M., Olivares-Pacheco, J., & Alcalde-Rico, M. (2022). Role of the multi-drug efflux systems on the baseline susceptibility to ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam in clinical isolates of non-carbapenemase-producing carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Pharmacol*, 13, 1007162.
- Costa, S. S., Guimarães, L. C., Silva, A., Soares, S. C., & Baraúna, R. A. (2020). First Steps in the Analysis of Prokaryotic Pan-Genomes. *Bioinform Biol Insights*, 14.
- Costa, T. R. D., Harb, L., Khara, P., Zeng, L., Hu, B., & Christie, P. J. (2021). Type IV secretion systems: Advances in structure, function, and activation. *Mol Microbiol*, 115(3), 436–452.
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P. L., & Maas, W. K. (1988). Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev*, 52(3), 375.
- Couvin, D., Bernheim, A., Toffano-Nioche, C., Touchon, M., Michalik, J., Néron, B., Rocha, E. P. C., Vergnaud, G., Gautheret, D., & Pourcel, C. (2018). CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Res*, 46(W1), W246–W251.
- 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*. *J Clin Microbiol*, 42(12), 5644–5649.
- Dai, X., Zhou, D., Xiong, W., Feng, J., Luo, W., Luo, G., Wang, H., Sun, F., & Zhou, X. (2016). The IncP-6 plasmid p10265-KPC from *Pseudomonas aeruginosa* carries a novel Δ ISEc33-associated blaKPC-2 gene cluster. *Front Microbiol*, 7(MAR), 177282.

- Darling, A. C. E., Mau, B., Blattner, F. R., & Perna, N. T. (2004). Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res*, *14*(7), 1394–1403.
- Daury, L., Orange, F., Taveau, J. C., Verchère, A., Monlezun, L., Gounou, C., Marreddy, R. K. R., Picard, M., Broutin, I., Pos, K. M., & Lambert, O. (2016). Tripartite assembly of RND multidrug efflux pumps. *Nat Commun*, *7*.
- de la Rosa-Zamboni, D., Carrasco-González, M. I., de Blas-Barrientos, N., Flores-Constantino, M. L., Flores-Zamora, E., Camacho-Pérez, M., Neri-Saldaña, I. G., & Guerrero-Díaz, A. C. (2023). Patient-nurse ratio as an index related to healthcare-associated infections: a surveillance study. *Bol Med Hosp Infant Mex*, *80*(1), 29–35.
- del Barrio-Tofiño, E., López-Causapé, C., & Oliver, A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with horizontally acquired β -lactamases: 2020 update. *Int J Antimicrob Agents*, *56*(6).
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M., & Díaz-Orejas, R. (1998). Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*, *62*(2), 434–464.
- Delavat, F., Miyazaki, R., Carraro, N., Pradervand, N., & van der Meer, J. R. (2017). The hidden life of integrative and conjugative elements. *FEMS Microbiol Rev*, *41*(4), 512–537.
- 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. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, *14*(1).
- Dettman, J. R., & Kassen, R. (2021). Evolutionary genomics of niche-specific adaptation to the cystic fibrosis lung in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Biol Evol*, *38*(2), 663–675.
- Diaz, M. H., Shaver, C. M., King, J. D., Musunuri, S., Kazzaz, J. A., & Hauser, A. R. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* induces localized immunosuppression during pneumonia. *Infect Immun*, *76*(10), 4414–4421.
- Dionisio, F., Zilhão, R., & Gama, J. A. (2019). Interactions between plasmids and other mobile genetic elements affect their transmission and persistence. *Plasmid*, *102*, 29–36.
- Diorio-Toth, L., Irum, S., Potter, R. F., Wallace, M. A., Arslan, M., Munir, T., Andleeb, S., Burnham, C.-A. D., & Dantas, G. (2022). Genomic Surveillance of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Reveals an Additive Effect of Carbapenemase Production on Carbapenem Resistance. *Microbiol Spectr*, *10*(3).

- Domingues, S., da Silva, G. J., & Nielsen, K. M. (2012). Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mob Genet Elements*, 2(5), 211–223.
- El Garch, F., Bogaerts, P., Bebrone, C., Galleni, M., & Glupczynski, Y. (2011). OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(10), 4828–4833.
- El Salabi, A., Toleman, M. A., Weeks, J., Bruderer, T., Frei, R., & Walsh, T. R. (2010). First report of the metallo- β -lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(1), 582.
- Elmouaden, C., Laglaoui, A., Ennanei, L., Bakkali, M., & Abid, M. (2019). Virulence genes and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in the Northwestern of Morocco. *J Infect Dev Ctries*, 13(10), 892–898.
- Epp, S. F., Köhler, T., Plésiat, P., Michéa-Hamzhepour, M., Frey, J., & Pechère, J. C. (2001). C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(6), 1780–1787.
- Falco, A., Ramos, Y., Franco, E., Guzmán, A., & Takiff, H. (2016). A cluster of KPC-2 and VIM-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST833 isolates from the pediatric service of a Venezuelan Hospital. *BMC Infect Dis*, 16(1).
- Feltman, H., Schulert, G., Khan, S., Jain, M., Peterson, L., & Hauser, A. R. (2001). Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading)*, 147(Pt 10), 2659–2669. www.pseudomonas.com
- Feng, W., Zhou, D., Wang, Q., Luo, W., Zhang, D., Sun, Q., Tong, Y., Chen, W., Sun, F., & Xia, P. (2016). Dissemination of IMP-4-encoding pIMP-HZ1-related plasmids among *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in a Chinese teaching hospital. *Sci Rep*, 6.
- Foley, S. L., Kaldhove, P. R., Ricke, S. C., & Han, J. (2021). Incompatibility Group I1 (Incl1) Plasmids: Their Genetics, Biology, and Public Health Relevance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 85(2).
- Foulkes, D. M., McLean, K., Haneef, A. S., Fernig, D. G., Winstanley, C., Berry, N., & Kaye, S. B. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* Toxin ExoU as a Therapeutic Target in the Treatment of Bacterial Infections. *Microorganisms*, 7(12).
- Freschi, L., Vincent, A. T., Jeukens, J., Emond-Rheault, J. G., Kukavica-Ibrulj, I., Dupont, M. J., Charette, S. J., Boyle, B., & Levesque, R. C. (2019). The *Pseudomonas aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on Its Population Structure, Horizontal Gene Transfer, and Pathogenicity. *Genome Biol Evol*, 11(1), 109–120.

- Funnell, B. E. (2016). ParB partition proteins: Complex formation and spreading at bacterial and plasmid centromeres. *Front Mol Biosci*, 3(AUG).
- Funnell, B. E. (2016). ParB partition proteins: Complex formation and spreading at bacterial and plasmid centromeres. *Front Mol Biosci*, 3(AUG).
- Galetti, R., Andrade, L. N., Varani, A. M., & Darini, A. L. C. (2019). A phage-like plasmid carrying blaKPC-2 Gene in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* (Vol. 10, Issue MAR). Frontiers Media S.A.
- Gan, R., Zhou, F. X., Si, Y., Yang, H., Chen, C., Ren, C., Wu, J., & Zhang, F. (2022). DBSCAN-SWA: An Integrated Tool for Rapid Prophage Detection and Annotation. *Front Genet*, 13.
- Garcillán-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2013). Ordering the bestiary of genetic elements transmissible by conjugation. *Mob Genet Elements*, 3(1), e24263.
- Garcillán-Barcia, M. P., Alvarado, A., & De la Cruz, F. (2011). Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiol Rev*, 35(5), 936–956.
- Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., & De La Cruz, F. (2009). The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev*, 33(3), 657–687.
- Garcillán-Barcia, M. P., Redondo-Salvo, S., & de la Cruz, F. (2023). Plasmid classifications. *Plasmid*, 126, 102684.
- Garcillán-Barcia, M. P., Redondo-Salvo, S., Vielva, L., & de la Cruz, F. (2020). MOBscan: Automated Annotation of MOB Relaxases. *Methods Mol Biol*, 2075, 295–308.
- Garcillán-Barcia, M. P., Redondo-Salvo, S., Vielva, L., & de la Cruz, F. (2020). MOBscan: Automated Annotation of MOB Relaxases. *Methods Mol Biol (Clifton, N.J.)*, 2075, 295–308.
- Garneau-Tsodikova, S., & Labby, K. J. (2016). Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives. *Med Chem Comm*, 7(1), 11–27.
- Garza-Ramos, U., Morfin-Otero, R., Sader, H. S., Jones, R. N., Hernández, E., Rodríguez-Noriega, E., Sanchez, A., Carrillo, B., Esparza-Ahumada, S., & Silva-Sanchez, J. (2008). Metallo- β -lactamase gene blaIMP-15 in a class 1 integron In95, from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital in Mexico. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(8), 2943–2946.
- Garza-Ramos, U., Tinoco, P., Silva-Sanchez, J., Morfin-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Leon-Garnica, G., Sader, H. S., & Jones, R. N. (2008). Metallo- β -

- lactamase IMP-18 is located in a class 1 integron (In96) in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* from Mexico. *Int J Antimicrob Agents*, 31(1), 78–80.
- Gaston, J. R., Johnson, A. O., Bair, K. L., White, A. N., & Armbruster, C. E. (2021). Polymicrobial interactions in the urinary tract: Is the enemy of my enemy my friend? *Infect Immun*, 89(4).
- Gautreau, G., Bazin, A., Gachet, M., Planel, R., Burlot, L., Dubois, M., Perrin, A., Médigue, C., Calteau, A., Cruveiller, S., Matias, C., Ambroise, C., Rocha, E. P. C., & Vallenet, D. (2020). PPanGGOLiN: Depicting microbial diversity via a partitioned pangenome graph. *PLoS Comput Biol*, 16(3).
- Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A. J., ... Zhang, J. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.*, 5(10).
- Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A. J., ... Zhang, J. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.*, 5(10).
- Ghaly, T. M., Gillings, M. R., Penesyan, A., Qi, Q., Rajabal, V., & Tetu, S. G. (2021). The Natural History of Integrons. *Microorganisms*, 9(11).
- Girlich, D., Naas, T., & Nordmann, P. (2004). Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(6), 2043–2048.
- Glen, K. A., & Lamont, I. L. (2021). β -lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Future Prospects. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(12).
- Gniadkowski, M. (2008). Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. *Clin Microbiol Infect*, 14(SUPPL. 1), 11–32.
- Gómez-Martínez, J., Rocha-Gracia, R. del C., Bello-López, E., Cevallos, M. A., Castañeda-Lucio, M., Sáenz, Y., Jiménez-Flores, G., Cortés-Cortés, G., López-García, A., & Lozano-Zarain, P. (2023). Comparative Genomics of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Different Ecological Niches. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(5).
- González-Vázquez, M. C., Rocha-Gracia, R. del C., Carabarán-Lima, A., Bello-López, E., Huerta-Romano, F., Martínez-Laguna, Y., & Lozano-Zarain, P. (2021). Location of OprD porin in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *APMIS*, 129(4), 213–224.

- Guénard, S., Muller, C., Monlezun, L., Benas, P., Broutin, I., Jeannot, K., & Plésiat, P. (2014). Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, *58*(1), 221–228.
- Guimarães, L. C., Benevides De Jesus, L., Vinícius, M., Viana, C., Silva, A., Thiago, R., Ramos, J., De, S., Soares, C., & Azevedo, V. (2015). Inside the Pan-genome-Methods and Software Overview. *Curr Genomics*, *16*, 245–252.
- Guzvinec, M., Izdebski, R., Butic, I., Jelic, M., Abram, M., Koscak, I., Baraniak, A., Hryniewicz, W., Gniadkowski, M., & Andrasevic, A. T. (2014). Sequence types 235, 111, and 132 Predominate among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Croatia. *Antimicrob Agents Chemother*, *58*(10), 6277–6283.
- Haenni, M., Hocquet, D., Ponsin, C., Cholley, P., Guyeux, C., Madec, J. Y., & Bertrand, X. (2015). Population structure and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from animal infections in France. *BMC Vet Res*, *11*(1).
- Halat, D. H., & Moubareck, C. A. (2022). Focus: Antimicrobial Resistance: The Intriguing Carbapenemases of *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Genetic Profile, and Global Epidemiology. *Yale J Biol Med*, *95*(4), 507.
- Haque, M., Sartelli, M., McKimm, J., & Bakar, M. A. (2018). Health care-associated infections - an overview. *Infect Drug Resist*, *11*, 2321–2333.
- Harmer, C. J., & Hall, R. M. (2019). An analysis of the IS6/IS26 family of insertion sequences: is it a single family? *Microb Genom*, *5*(9).
- Hassuna, N. A., Mandour, S. A., & Mohamed, E. S. (2020). Virulence constitution of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in upper Egypt. *Infect Drug Resist*, *13*, 587–595.
- Hauser, A. R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol*, *7*(9), 654–665.
- Hauser, A. R., Cobb, E., Bodí, M., Mariscal, D., Vallés, J., Engel, J. N., & Rello, J. (2002). Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Med*, *30*(3), 521–528.
- Henrichfreise, B., Wiegand, I., Pfister, W., & Wiedemann, B. (2007). Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother*, *51*(11), 4062–4070.

- Hong, J. S., Song, W., Park, M. J., Jeong, S., Lee, N., & Jeong, S. H. (2021). Molecular Characterization of the First Emerged NDM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in South Korea. *Microb Drug Resist*, 27(8), 1063–1070.
- Horna, G., Amaro, C., Palacios, A., Guerra, H., & Ruiz, J. (2019). High frequency of the *exoU+*/*exoS+* genotype associated with multidrug-resistant “high-risk clones” of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Peruvian hospitals. *Sci Rep*, 9(1).
- Horna, G., Amaro, C., Palacios, A., Guerra, H., & Ruiz, J. (2019). High frequency of the *exoU+*/*exoS+* genotype associated with multidrug-resistant “high-risk clones” of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Peruvian hospitals. *Sci Rep.*, 9(1).
- Hu, Y. Y., Wang, Q., Sun, Q. L., Chen, G. X., & Zhang, R. (2019). A novel plasmid carrying carbapenem-resistant gene blaKPC-2 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Drug Resist*, 12, 1285–1288.
- Hülter, N., Ilhan, J., Wein, T., Kadibalban, A. S., Hammerschmidt, K., & Dagan, T. (2017). An evolutionary perspective on plasmid lifestyle modes. *Curr Opin Microbiol*, 38, 74–80.
- Irum, S., Naz, K., Ullah, N., Mustafa, Z., Ali, A., Arslan, M., Khalid, K., & Andleeb, S. (2021). Antimicrobial resistance and genomic characterization of six new sequence types in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from pakistan. *Antibiotics*, 10(11).
- Jackson, R. W., Vinatzer, B., Arnold, D. L., Dorus, S., & Murillo, J. (2011). The influence of the accessory genome on bacterial pathogen evolution. *Mob Genet Elements*, 1(1), 55–65.
- Jain, A., & Srivastava, P. (2013). Broad host range plasmids. *FEMS Microbiol Lett*, 348(2), 87–96.
- Jamal, Z., Gholami, M., Ebrahimzadeh, M. A., & Goli, H. R. (2023). The Role of MexCD-OprJ and MexEF-OprN Efflux Systems in the Multiple Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Clinical Samples. *Curr Microbiol*, 80(7), 1–8.
- Janice, J., Agyepong, N., Owusu-Ofori, A., Govinden, U., Essack, S. Y., Samuelsen, Ø., Sundsfjord, A., & Pedersen, T. (2021). Carbapenem resistance determinants acquired through novel chromosomal integrations in extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 65(7).
- Jeon, J. H., Jang, K. M., Lee, J. H., Kang, L. W., & Lee, S. H. (2023). Transmission of antibiotic resistance genes through mobile genetic elements in *Acinetobacter baumannii* and gene-transfer prevention. *Sci Total Environ*, 857, 159497.

- Johnson, C. M., & Grossman, A. D. (2015). Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. *Annu Rev Genet*, 49, 577–601.
- Jouault, A., Saliba, A. M., & Touqui, L. (2022). Modulation of the immune response by the *Pseudomonas aeruginosa* type-III secretion system. *Front Cell Infect Microbiol*, 12.
- Juan, C., Peña, C., & Oliver, A. (2017). Host and Pathogen Biomarkers for Severe *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J Infect Dis*, 215(suppl_1), S44–S51.
- Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int J Mol Sci*, Vol. 22, Page 3128, 22(6), 3128.
- Kamruzzaman, M., & Iredell, J. R. (2020). CRISPR-Cas System in Antibiotic Resistance Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol*, 10.
- Kandasamy, K., Thirumalmuthu, K., Prajna, N. V., Lalitha, P., Mohankumar, V., & Devarajan, B. (2020). Comparative genomics of ocular *Pseudomonas aeruginosa* strains from keratitis patients with different clinical outcomes. *Genomics*, 112(6), 4769–4776.
- Kawalek, A., Wawrzyniak, P., Bartosik, A. A., & Jagura-Burdzy, G. (2020). Rules and exceptions: The role of chromosomal ParB in DNA segregation and other cellular processes. *Microorganisms*, 8(1).
- Khan, M., Stapleton, F., Summers, S., Rice, S. A., & Willcox, M. D. P. (2020). Antibiotic resistance characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from keratitis in Australia and India. *Antibiotics*, 9(9), 1–16.
- Khorvash, F., Yazdani, M., Shabani, S., & Soudi, A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa*-producing Metallo- β -lactamases (VIM, IMP, SME, and AIM) in the Clinical Isolates of Intensive Care Units, a University Hospital in Isfahan, Iran. *Adv Biomed Res*, 6(1), 147.
- Kidd, T. J., Ritchie, S. R., Ramsay, K. A., Grimwood, K., Bell, S. C., & Rainey, P. B. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Exhibits Frequent Recombination, but Only a Limited Association between Genotype and Ecological Setting. *PLoS ONE*, 7(9).
- Kieser, T. (1984). Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*, 12(1), 19–36.
- Kieser, T. (1984). Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*, 12(1), 19–36.
- Kong, K. F., Jayawardena, S. R., Del Puerto, A., Wiehlmann, L., Laabs, U., Tümmler, B., & Mathee, K. (2005). Characterization of *poxB*, a chromosomal-encoded *Pseudomonas aeruginosa* oxacillinase. *Gene*, 358(1–2), 82–92.

- Kumar, P. (2017). Pharmacology of Specific Drug Groups: Antibiotic Therapy. *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry: Seventh Edition*, 457–487.
- Kung, V. L., Ozer, E. A., & Hauser, A. R. (2010). The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74(4), 621–641.
- Lee, S., Park, Y. J., Kim, M., Lee, H. K., Han, K., Kang, C. S., & Kang, M. W. (2005). Prevalence of Ambler class A and D beta-lactamases among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. *J Antimicrob Chemother*, 56(1), 122–127.
- Leighton, T. L., Buensuceso, R. N. C., Howell, P. L., & Burrows, L. L. (2015). Biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili and regulation of their function. *Environ Microbiol*, 17(11), 4148–4163.
- Lewicka, E., Mitura, M., Steczkiewicz, K., Kieracinska, J., Skrzynska, K., Adamczyk, M., & Jagura-Burdzy, G. (2021). Unique Properties of the Alpha-Helical DNA-Binding Protein KfrA Encoded by the IncU Incompatibility Group Plasmid RA3 and Its Host-Dependent Role in Plasmid Maintenance. *Appl Environ Microbiol*, 87(2).
- Li, H., Luo, Y. F., Williams, B. J., Blackwell, T. S., & Xie, C. M. (2012). Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *Int J Med Microbiol*, 302(2), 63–68.
- Li, H., Toleman, M. A., Bennett, P. M., Jones, R. N., & Walsh, T. R. (2008). Complete sequence of p07-406, a 24,179-base-pair plasmid harboring the blaVIM-7 metallo- β -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(9), 3099–3105.
- Li, X. Z., Barre, N., & Poole, K. (2000). Influence of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*, 46(6), 885–893.
- Liao, C., Huang, X., Wang, Q., Yao, D., & Lu, W. (2022). Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. *Front Cell Infect Microbiol*, 12.
- Lilly, J., & Camps, M. (2015). Mechanisms of Theta Plasmid Replication. *Microbiol Spectr*, 3(1), 33–44.
- Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*, 22(4), 582–610.

- Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., Chen, L., & Yang, J. (2019). VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D687–D692.
- Liu, M., Li, X., Xie, Y., Bi, D., Sun, J., Li, J., Tai, C., Deng, Z., & Ou, H. Y. (2019). ICEberg 2.0: an updated database of bacterial integrative and conjugative elements. *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D660–D665.
- Llanes, C., Hocquet, D., Vogne, C., Benali-Baitich, D., Neuwirth, C., & Plésiat, P. (2004). Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(5), 1797–1802.
- López, C., Delmonti, J., Bonomo, R. A., & Vila, A. J. (2022). Deciphering the evolution of metallo- β -lactamases: A journey from the test tube to the bacterial periplasm. *J Biol Chem*, 298(3).
- López, M., Rojo-Bezares, B., Chichón, G., & Sáenz, Y. (2022). Resistance to Fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa* from Human, Animal, Food and Environmental Origin: The Role of CrpP and Mobilizable ICEs. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(9).
- López, M., Rojo-Bezares, B., Chichón, G., & Sáenz, Y. (2022). Resistance to Fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa* from Human, Animal, Food and Environmental Origin: The Role of CrpP and Mobilizable ICEs. *Antibiotics*, 11(9).
- López-Causapé, C., Cabot, G., del Barrio-Tofiño, E., & Oliver, A. (2018). The Versatile Mutational Resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*, 9(APR).
- López-Causapé, C., Sommer, L. M., Cabot, G., Rubio, R., Ocampo-Sosa, A. A., Johansen, H. K., Figuerola, J., Cantón, R., Kidd, T. J., Molin, S., & Oliver, A. (2017). Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* mutational resistome in an international Cystic Fibrosis clone. *Sci Rep*, 7(1).
- López-García, A., Del Carmen Rocha-Gracia, R., Bello-López, E., Juárez-Zelocualtecal, C., Sáenz, Y., Castañeda-Lucio, M., López-Pliego, L., Cristina González-Vázquez, M., Torres, C., Ayala-Nuñez, T., Jiménez-Flores, G., María De La Paz Arenas-Hernández, M., & Lozano-Zarain, P. (2018). Characterization of antimicrobial resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying IMP variants recovered from a Mexican hospital. *Infect Drug Resist*, 11, 1523–1536.
- Lorusso, A. B., Carrara, J. A., Barroso, C. D. N., Tuon, F. F., & Faoro, H. (2022). Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci*, 23(24).

- Martinez, J. L. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc Biol Sci*, 276(1667), 2521–2530.
- Martinez, J. L. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc Biol Sci*, 276(1667), 2521–2530.
- Martínez, T., Vázquez, G. J., Aquino, E. E., Ramírez-Ronda, R., & Robledo, I. E. (2012). First report of a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate co-harboring KPC-2 and IMP-18 carbapenemases. *Int J Antimicrob Agents*, 39(6), 542–543.
- Meletis, G., Exindari, M., Vavatsi, N., Sofianou, D., & Diza, E. (2012). Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Hippokratia*, 16(4), 303.
- Million-Weaver, S., & Camps, M. (2014). Mechanisms of plasmid segregation: have multicopy plasmids been overlooked? *Plasmid*, 75, 27–36.
- Mistry, J., Chuguransky, S., Williams, L., Qureshi, M., Salazar, G. A., Sonnhammer, E. L. L., Tosatto, S. C. E., Paladin, L., Raj, S., Richardson, L. J., Finn, R. D., & Bateman, A. (2021). Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Res*, 49(D1), D412–D419.
- Mittal, R., Aggarwal, S., Sharma, S., Chhibber, S., & Harjai, K. (2009). Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview. *J Infect Public Health*, 2(3), 101–111.
- Mohanty, S., Baliyarsingh, B., Nayak, S. K., Mohanty, S., Baliyarsingh, B., & Nayak, S. K. (2020). Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: A Concise Review. *IntechOpen*.
- Moloney, E. M., Deasy, E. C., Swan, J. S., Brennan, G. I., O'Donnell, M. J., & Coleman, D. C. (2020). Whole-genome sequencing identifies highly related *Pseudomonas aeruginosa* strains in multiple washbasin U-bends at several locations in one hospital: evidence for trafficking of potential pathogens via wastewater pipes. *J Hosp Infect.*, 104(4), 484–491.
- Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol*, 7(FEB), 249785.
- 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(MAR).
- Muthukumarasamy, U., Preusse, M., Kordes, A., Koska, M., Schniederjans, M., Khaleedi, A., & Häussler, S. (2020). Single-nucleotide polymorphism-based

- genetic diversity analysis of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Genome Biol Evol*, 12(4), 396–406.
- Naas, T., Bonnin, R. A., Cuzon, G., Villegas, M. V., & Nordmann, P. (2013). Complete sequence of two KPC-harboring plasmids from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.*, 68(8), 1757–1762.
- Naas, T., Oueslati, S., Bonnin, R. A., Dabos, M. L., Zavala, A., Dortet, L., Retailleau, P., & Iorga, B. I. (2017). Beta-lactamase database (BLDB)—structure and function. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 32(1), 917–919.
- Naas, T., Oueslati, S., Bonnin, R. A., Dabos, M. L., Zavala, A., Dortet, L., Retailleau, P., & Iorga, B. I. (2017). Beta-lactamase database (BLDB) - structure and function. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 32(1), 917–919.
- Nascimento, A. M. A., Chartone-Souza, E., Nascimento, A. M. A., & Chartone-Souza, E. (2003). Operon mer: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genet Mol Res.*, 2(1), 92–101.
- Néron, B., Littner, E., Haudiquet, M., Perrin, A., Cury, J., & Rocha, E. P. C. (2022). IntegronFinder 2.0: Identification and Analysis of Integrons across Bacteria, with a Focus on Antibiotic Resistance in *Klebsiella*. *Microorganisms*, 10(4).
- Nishida, H. (2012). Comparative Analyses of Base Compositions, DNA Sizes, and Dinucleotide Frequency Profiles in Archaeal and Bacterial Chromosomes and Plasmids. *Int J Evol Biol.*, 2012, 1–5.
- Nishida, H. (2012). Comparative Analyses of Base Compositions, DNA Sizes, and Dinucleotide Frequency Profiles in Archaeal and Bacterial Chromosomes and Plasmids. *Int J Evol Biol*, 2012, 1–5.
- Norberg, P., Bergström, M., Jethava, V., Dubhashi, D., & Hermansson, M. (2011). The IncP-1 plasmid backbone adapts to different host bacterial species and evolves through homologous recombination. *Nat Commun.*, 2(1).
- Norman, A., Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2009). Conjugative plasmids: Vessels of the communal gene pool. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci*, 364(1527), 2275–2289.
- O'Donnell, J. N., & Lodise, T. P. (2022). New Perspectives on Antimicrobial Agents: Imipenem-Relebactam. *Antimicrob Agents Chemother*, 66(7).
- Okamoto, K., Gotoh, N., & Nishino, T. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(7), 1964–1971.

- Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C., & Juan, C. (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat*, 21–22, 41–59.
- Orlek, A., Stoesser, N., Anjum, M. F., Doumith, M., Ellington, M. J., Peto, T., Crook, D., Woodford, N., Sarah Walker, A., Phan, H., & Sheppard, A. E. (2017). Plasmid classification in an era of whole-genome sequencing: Application in studies of antibiotic resistance epidemiology. *Front Microbiol*, 8(FEB).
- 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 Genom*, 15(1), 1–17.
- Ozer, E. A., Nnah, E., Dldelot, X., Whitaker, R. J., Hauser, A. R., & Ochman, H. (2019). The Population Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Is Characterized by Genetic Isolation of *exoU*⁺ and *exoS*⁺ Lineages. *Genome Biol Evol*, 11(1), 1780–1796.
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary: Rapid large-scale prokaryote pan-genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691–3693.
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*, 31(4).
- Pfeifer, E., & Rocha, E. P. C. (2023). Phage-plasmids promote genetic exchanges between phages and plasmids and create novel ones. *BioRxiv*, 2023.08.08.552325.
- Pfeifer, E., Bonnin, R. A., & Rocha, E. P. C. (2022). Phage-Plasmids Spread Antibiotic Resistance Genes through Infection and Lysogenic Conversion. *MBio*, 13(5).
- Pfeifer, E., Moura De Sousa, J. A., Touchon, M., & Rocha, E. P. C. (2021). Bacteria have numerous distinctive groups of phage–plasmids with conserved phage and variable plasmid gene repertoires. *Nucleic Acids Res*, 49(5), 2655–2673.
- Pinilla-Redondo, R., Mayo-Muñoz, D., Russel, J., Garrett, R. A., Randau, L., Sørensen, S. J., & Shah, S. A. (2020). Type IV CRISPR-Cas systems are highly diverse and involved in competition between plasmids. *Nucleic Acids Res*, 48(4), 2000–2012.
- Pinilla-Redondo, R., Russel, J., Mayo-Muñoz, D., Shah, S. A., Garrett, R. A., Nesme, J., Madsen, J. S., Fineran, P. C., & Sørensen, S. J. (2022). CRISPR-Cas systems are widespread accessory elements across bacterial and archaeal plasmids. *Nucleic Acids Res*, 50(8), 4315–4328.

- Poidevin, M., Sato, M., Altinoglu, I., Delaplace, M., Sato, C., & Yamaichi, Y. (2018). Mutation in ESBL Plasmid from *Escherichia coli* O104:H4 Leads Autoagglutination and Enhanced Plasmid Dissemination. *Front Microbiol*, 9(FEB).
- Poole, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol*, 2(APR).
- Poulsen, B. E., Yang, R., Clatworthy, A. E., White, T., Osmulski, S. J., Li, L., Penaranda, C., Lander, E. S., Shores, N., & Hung, D. T. (2019). Defining the core essential genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(20), 10072–10080.
- Radó, J., Kaszab, E., Petrovics, T., Pászti, J., Kriszt, B., & Szoboszlay, S. (2017). Characterization of environmental *Pseudomonas aeruginosa* using multilocus sequence typing scheme. *J Med Microbiol.*, 66(10), 1457–1466.
- Ramírez, D. G., Nicola, F., Zarate, S., Relloso, S., Smayevsky, J., & Arduino, S. (2013). Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* with KPC-type carbapenemase in a teaching hospital: An 8-year study. *J Med Microbiol*, 62(PART10), 1565–1570.
- Ramsamy, Y., Mlisana, K. P., Amoako, D. G., Abia, A. L. K., Ismail, A., Allam, M., Mbanga, J., Singh, R., & Essack, S. Y. (2022). Mobile genetic elements-mediated Enterobacteriales-associated carbapenemase antibiotic resistance genes propagation between the environment and humans: A One Health South African study. *Sci Total Environ*, 806((Pt 3)).
- Ramsay, K. A., Wardell, S. J. T., Patrick, W. M., Brockway, B., Reid, D. W., Winstanley, C., Bell, S. C., & Lamont, I. L. (2019). Genomic and phenotypic comparison of environmental and patient-derived isolates of *Pseudomonas aeruginosa* suggest that antimicrobial resistance is rare within the environment. *J Med Microbiol*, 68(11), 1591–1595.
- Rawlings, D. E., & Tietze, E. (2001). Comparative biology of IncQ and IncQ-like plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65(4), 481–496.
- Redondo-Salvo, S., Bartomeus-Peñalver, R., Vielva, L., Tagg, K. A., Webb, H. E., Fernández-López, R., & de la Cruz, F. (2021). COPLA, a taxonomic classifier of plasmids. *BMC Bioinform*, 22(1), 1–9.
- Redondo-Salvo, S., Fernández-López, R., Ruiz, R., Vielva, L., de Toro, M., Rocha, E. P. C., Garcillán-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2020). Pathways for horizontal gene transfer in bacteria revealed by a global map of their plasmids. *Nat Commun* 2020 11:1, 11(1), 1–13.
- Reyes, J., Komarow, L., Chen, L., Ge, L., Hanson, B. M., Cober, E., Herc, E., Alenazi, T., Kaye, K. S., Garcia-Diaz, J., Li, L., Kanj, S. S., Liu, Z., Oñate, J. M.,

- Salata, R. A., Marimuthu, K., Gao, H., Zong, Z., Valderrama-Beltrán, S. L., ... Satlin, M. (2023). Global epidemiology and clinical outcomes of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and associated carbapenemases (POP): a prospective cohort study. *The Lancet Microbe*, 4(3), e159–e170.
- Reynolds, D., & Kollef, M. (2021). The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs*, 81(18), 2117–2131.
- RHOVE. (2022). *Boletín Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) 2022*. www.gob.mx/salud
- Ribeiro, Á. C. da S., Crozatti, M. T. L., da Silva, A. A., Macedo, R. S., Machado, A. M. de O., & Silva, A. T. de A. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* in the ICU: prevalence, resistance profile, and antimicrobial consumption. *Rev Soc Bras Med Trop*, 53.
- Richard, E., Darracq, B., Loot, C., & Mazel, D. (2022). Unbridled Integrins: A Matter of Host Factors. *Cells*, 11(6).
- Richardot, C., Juarez, P., Jeannot, K., Patry, I., Plésiat, P., & Llanes, C. (2016). Amino Acid Substitutions Account for Most MexS Alterations in Clinical nfxC Mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 60(4), 2302–2310.
- Robertson, J., Bessonov, K., Schonfeld, J., & Nash, J. H. E. (2020). Universal whole-sequence-based plasmid typing and its utility to prediction of host range and epidemiological surveillance. *Microb Genom*, 6(10), 1–12.
- Rodríguez-Martínez, J. M., Poirel, L., & Nordmann, P. (2009). Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(5), 1766–1771.
- Rossolini, G. M., Arena, F., & Giani, T. (2017). Mechanisms of Antibacterial Resistance. *Infect Dis, 2-Volume Set*, 1181-1196.e1.
- Ruiz-Masó, J. A., Machón, C., Bordanaba-Ruiseco, L., Espinosa, M., Coll, M., & Del Solar, G. (2015). Plasmid Rolling-Circle Replication. *Microbiol Spectr*, 3(1).
- Ruiz-Roldán, L., Bellés, A., Bueno, J., Azcona-Gutiérrez, J. M., Rojo-Bezares, B., Torres, C., Castillo, F. J., Sáenz, Y., & Seral, C. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Spanish Children: Occurrence in Faecal Samples, Antimicrobial Resistance, Virulence, and Molecular Typing. *Biomed Res Int*, 2018.
- Salahuddin, P., & Khan, A. U. (2014). Studies on structure-based sequence alignment and phylogenies of beta-lactamases. *Bioinformatics*, 10(5), 308–313.

- Salgado-Camargo, A. D., Castro-Jaimes, S., Gutierrez-Rios, R. M., Lozano, L. F., Altamirano-Pacheco, L., Silva-Sanchez, J., Pérez-Oseguera, Á., Volkow, P., Castillo-Ramírez, S., & Cevallos, M. A. (2020). Structure and Evolution of *Acinetobacter baumannii* Plasmids. *Front Microbiol*, *11*.
- Sampei, G. ichi, Furuya, N., Tachibana, K., Saitou, Y., Suzuki, T., Mizobuchi, K., & Komano, T. (2010). Complete genome sequence of the incompatibility group I1 plasmid R64. *Plasmid*, *64*(2), 92–103.
- Sánchez-Martínez, G., Garza-Ramos, U. J., Reyna-Flores, F. L., Gaytán-Martínez, J., Lorenzo-Bautista, I. G., & Silva-Sanchez, J. (2010). In169, A New Class 1 Integron that Encoded blaIMP-18 in a Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolate from Mexico. *Arch Med Res*, *41*(4), 235–239.
- Savari, M., Rostami, S., Ekrami, A., & Bahador, A. (2016). Characterization of Toxin-Antitoxin (TA) Systems in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates in Iran. *Jundishapur J Microbiol*, *9*(1), 26627.
- Sawa, T., Kooguchi, K., & Moriyama, K. (2020). Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J Intensive Care*, *8*(1), 1–13.
- Sawa, T., Shimizu, M., Moriyama, K., & Wiener-Kronish, J. P. (2014). Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: A review. *Crit Care*, *18*(1).
- Schumacher, M. A. (2007). Structural biology of plasmid segregation proteins. *Curr Opin Struct Biol*, *17*(1), 103–109.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *30*(14), 2068–2069.
- Seidl, K., Leimer, N., Palheiros Marques, M., Furrer, A., Holzmann-Bürgel, A., Senn, G., Zbinden, R., & Zinkernagel, A. S. (2015). Clonality and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at the University Hospital Zurich, Switzerland between 2012 and 2014. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*, *14*(1).
- Shehabi, A. A., & Kamal, A. M. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* a common opportunistic pathogen in Jordan: A review article. *Int Arab J Antimicrob Agents*, *9*(1), 1–8.
- Shehreen, S., Chyou, T. Y., Fineran, P. C., & Brown, C. M. (2019). Genome-wide correlation analysis suggests different roles of CRISPR-Cas systems in the acquisition of antibiotic resistance genes in diverse species. *Phil Trans R Soc B*, *374*(1772).

- Shintani, M., Sanchez, Z. K., & Kimbara, K. (2015). Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Front Microbiol*, 6(MAR).
- Shu, J. C., Kuo, A. J., Su, L. H., Liu, T. P., Lee, M. H., Su, I. N., & Wu, T. L. (2017). Development of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is associated with OprD polymorphisms, particularly the amino acid substitution at codon 170. *J Antimicrob Chemother*, 72(9), 2489–2495.
- Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., & Chandler, M. (2006). ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res*, 34(Database issue).
- Smillie, C., Pilar Garcillán-Barcia, ‡ M, Francia, ‡ M Victoria, Rocha, E. P. C., & De La Cruz, F. (2010). Mobility of Plasmids †. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74(3), 1092–2172.
- Song, Y., Mu, Y., Wong, N.-K., Yue, Z., Li, J., Yuan, M., Zhu, X., Hu, J., Zhang, G., Wei, D., Wang, C., Wu, W., Bai, F., & Feng, J. (2023). Emergence of hypervirulent *Pseudomonas aeruginosa* pathotypically armed with co-expressed T3SS effectors ExoS and ExoU. *HLife*.
- Spagnolo, A. M., Sartini, M., & Cristina, M. L. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* in the healthcare facility setting. *Rev Med Microbiol*, 32(3), 169–175.
- Stewart, R. M. K., Wiehlmann, L., Ashelford, K. E., Preston, S. J., Frimmersdorf, E., Campbell, B. J., Neal, T. J., Hall, N., Tuft, S., Kaye, S. B., & Winstanley, C. (2011). Genetic characterization indicates that a specific subpopulation of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with keratitis infections. *J Clin Microbiol*, 49(3), 993–1003.
- Streling, A. P., Cayô, R., Nodari, C. S., Almeida, L. G. P., Bronze, F., Siqueira, A. V., Matos, A. P., Oliveira, V., Vasconcelos, A. T. R., Marcondes, M. F. M., & Gales, A. C. (2022). Kinetics Analysis of β -Lactams Hydrolysis by OXA-50 Variants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist*, 28(8), 849–852.
- 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. *Sci Rep*, 8(1).
- Sullivan, M. J., Petty, N. K., & Beatson, S. A. (2011). Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(7), 1009–1010.
- Sun, J., & Barbieri, J. T. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT ADP-ribosylates CT10 regulator of kinase (Crk) proteins. *J Biol Chem*, 278(35), 32794–32800.
- Suzuki, H., Brown, C. J., & Top, E. M. (2018). Genomic Signature Analysis to Predict Plasmid Host Range. *Mol Life Sci*, 458–464.

- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outterson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., ... Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*, *18*(3), 318–327.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol*, *38*(7), 3022–3027.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V, Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). GUEST COMMENTARY Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *J Clin Microbiol* (Vol. 33, Issue 9).
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, *33*(9), 2233–2239.
- Thomas, C. M. (2014). Plasmid Incompatibility. In E. Bell (Ed.), *Mol Life Sci* (pp. 1–3). Springer.
- Thomas, C. M., & Haines, A. S. (2004). Plasmids of the Genus *Pseudomonas*. *Pseudomonas*, 197–231.
- Timsit, J. F., Paul, M., Shields, R. K., Echols, R., Baba, T., Yamano, Y., & Portsmouth, S. (2022). Cefiderocol for the Treatment of Infections Due to Metallo-B-lactamase–Producing Pathogens in the CREDIBLE-CR and APEKS-NP Phase 3 Randomized Studies. *Clin Infect Dis*, *75*(6), 1081–1084.
- Tohya, M., Tada, T., Watanabe, S., Kuwahara-Arai, K., Zin, K. N., Zaw, N. N., Aung, M. Y., Mya, S., Zan, K. N., Kirikae, T., & Tin, H. H. (2019). Emergence of carbapenem-resistant *Pseudomonas asiatica* producing NDM-1 and VIM-2 Metallo-Lactamases in Myanmar. *Antimicrob Agents Chemother*, *63*(8).
- Touati, M., Diene, S. M., Dekhil, M., Djahoudi, A., Racherache, A., & Rolain, J. M. (2013). Dissemination of a class I integron carrying VIM-2 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital intensive care unit in annaba Algeria. *Antimicrob Agents Chemother.*, *57*(5), 2426–2427.
- 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).

- van Belkum, A., Soriaga, L. B., LaFave, M. C., Akella, S., Veyrieras, J. B., Barbu, E. M., Shortridge, D., Blanc, B., Hannum, G., Zambardi, G., Miller, K., Enright, M. C., Mugnier, N., Brami, D., Schicklin, S., Felderman, M., Schwartz, A. S., Richardson, T. H., Peterson, T. C., ... Cady, K. C. (2015). Phylogenetic distribution of CRISPR-Cas systems in antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio*, 6(6).
- Varani, A., He, S., Siguier, P., Ross, K., & Chandler, M. (2021). The IS6 family, a clinically important group of insertion sequences including IS26. *Mob DNA*, 12(1), 1–18.
- Verdial, C., Serrano, I., Tavares, L., Gil, S., & Oliveira, M. (2023). Mechanisms of Antibiotic and Biocide Resistance That Contribute to *Pseudomonas aeruginosa* Persistence in the Hospital Environment. *Biomedicines*, 11(4).
- Vielva, L., De Toro, M., Lanza, V. F., & De La Cruz, F. (2017). PLACNETw: a web-based tool for plasmid reconstruction from bacterial genomes. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 33(23), 3796–3798.
- Villa, L., García-Fernández, A., Fortini, D., & Carattoli, A. (2010). Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother*, 65(12), 2518–2529.
- Villegas, M. V., Lolans, K., Correa, A., Kattan, J. N., Lopez, J. A., & Quinn, J. P. (2007). First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(4), 1553–1555.
- Werneburg, G. T. (2022). Catheter-Associated Urinary Tract Infections: Current Challenges and Future Prospects. *Res Rep Urol*, 14, 109.
- Wheatley, R. M., & MacLean, R. C. (2021). CRISPR-Cas systems restrict horizontal gene transfer in *Pseudomonas aeruginosa*. *ISME Journal*, 15(5), 1420–1433.
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol*, 13(6).
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
- Wilderman, P. J., Vasil, A. I., Johnson, Z., & Vasil, M. L. (2001). Genetic and biochemical analyses of a eukaryotic-like phospholipase D of *Pseudomonas aeruginosa* suggest horizontal acquisition and a role for persistence in a chronic pulmonary infection model. *Mol Microbiol*, 39(2), 291–304.
- Wright, L. L., Turton, J. F., Livermore, D. M., Hopkins, K. L., & Woodford, N. (2015). Dominance of international “high-risk clones” among metallo- β -lactamase-

- producing *Pseudomonas aeruginosa* in the UK. *J Antimicrob Chemother*, 70(1), 103–110.
- Xiong, J., Alexander, D. C., Jennifer, H. M., Dérasp, M., Low, D. E., Jamieson, F. B., & Roy, P. H. (2013). Complete sequence of pOZ176, a 500-kilobase IncP-2 plasmid encoding IMP-9-mediated carbapenem resistance, from outbreak isolate *Pseudomonas aeruginosa* 96. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(8), 3775–3782.
- Xu, Y., Zhang, Y., Zheng, X., Yu, K., Sun, Y., Liao, W., Jia, H., Xu, C., Zhou, T., & Shen, M. (2021). The prevalence and functional characteristics of CrpP-like in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 40(12), 2651–2656.
- Yang, Q. E., & Walsh, T. R. (2017). Toxin-antitoxin systems and their role in disseminating and maintaining antimicrobial resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 41(3), 343–353.
- Yano, H., Shintani, M., Tomita, M., Suzuki, H., & Oshima, T. (2018). Reconsidering plasmid maintenance factors for computational plasmid design. *Comput Struct Biotechnol J*, 17, 70–81.
- Yi, H., Huang, L., Yang, B., Gomez, J., Zhang, H., & Yin, Y. (2020). AcrFinder: genome mining anti-CRISPR operons in prokaryotes and their viruses. *Nucleic Acids Res*, 48(W1), W358–W365.
- Yi, H., Sun, Q., Wang, X., Liu, Y., Feng, N., Zhang, L., Song, W., Shang, X., Li, X., & Ma, X. (2021). Study on Virulence Genes of Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* in Xinjiang Province. *Clin Lab*, 67(8), 1765–1774.
- Yoon, E. J., & Jeong, S. H. (2021). Mobile Carbapenemase Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*, 12, 614058.
- Yoshida, T., Kim, S. R., & Komano, T. (1999). Twelve pil genes are required for biogenesis of the R64 thin pilus. *J Bacteriol*, 181(7), 2038–2043.
- Yousefi-Avarvand, A., Khashei, R., Sedigh Ebrahim-Saraie, H., Emami, A., Zomorodian, K., & Motamedifar, M. (2015). The Frequency of Exotoxin A and Exoenzymes S and U Genes Among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Shiraz, Iran. *Int J Mol Cell Med*, 4(3), 167–173.
- Zakharova, I. B., & Viktorov, D. V. (2015). Integrative conjugative elements (ICEs) of microorganisms. *Mol Gen Microbiol Virol*, 30(3), 114–123.
- Zechner, E. L., Moncalián, G., & de la Cruz, F. (2017). Relaxases and Plasmid Transfer in Gram-Negative Bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol*, 413, 93–113.

- Zhang, X., Wang, L., Li, D., Li, P., Yuan, L., Yang, F., Guo, Q., & Wang, M. (2021). An IncP-2 plasmid sublineage associated with dissemination of bla IMP-45 among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Emerg Microbes Infect*, 10(1), 442–449.
- Zhang, Y., Zhang, N., Wang, M., Luo, M., Peng, Y., Li, Z., Xu, J., Ou, M., Kan, B., Li, X., & Lu, X. (2023). The prevalence and distribution of aminoglycoside resistance genes. *Biosafety and Health*, 5(1), 14–20.
- Zhu, Z., Yang, H., Yin, Z., Jing, Y., Zhao, Y., Fu, H., Du, H., & Zhou, D. (2021). Diversification and prevalence of the quinolone resistance *crpP* genes and the *crpP*-carrying Tn 6786-related integrative and conjugative elements in *Pseudomonas aeruginosa*. *Virulence*, 12(1), 2162–2170.
- Zhu, Z., Yang, H., Yin, Z., Jing, Y., Zhao, Y., Fu, H., Du, H., & Zhou, D. (2021). Diversification and prevalence of the quinolone resistance *crpP* genes and the *crpP*-carrying Tn 6786-related integrative and conjugative elements in *Pseudomonas aeruginosa*. *Virulence*, 12(1), 2162–2170.
- Zubyk, H. L., & Wright, G. D. (2021). CrpP is not a fluoroquinolone-inactivating enzyme. *Antimicrob Agents Chemother.*, 65(8).

12. ANEXOS

Anexos de resultados

Anexo figura I. Secuencia y alineamiento de *bla*_{IMP} de la cepa PE112.

Secuencia de nucleótidos

ATGAAAAAATTATTTGTTTTATGTGTATTCTTCTTTGCAACATTGCTGCTGCAGATGATTCTTTG
CCTGATTTAAAAATTGAGAAGCTTGAAAAAGGCGTTTATGTTTCATACTTCGTTTGAAGAAGTTAA
AGGTTGGGGTGTAGTCACAAAACACGGTTTGTAGTGGTTCTTGAAAGAATGATGCTTATCTGATA
GATACTCCAATTACCGCTAAAGATACTGAAAAATTAGTTAATTGGTTTTATTGAGCACGGCTATAG
AATCAAAGGCAGTATTTCCACACATTTCCATGGCGACAGTACGGCTGGAATAGAGTGGCTTAAT
TCTCAATCTATCTCCACGTATGCCTCTGAATTAACAAATGAACTTCTAAAAAAGACAATAAGGT
GCAAGCTACAAATCTTTTAGTGGAGTTAGTTATTCACCTTATCAAAAACAAAATTGAAGTTTTCTA
TCCAGGTCCAGGACACACTCAAGATAACGTAGTGGTTTTGGTTACCTGAAAAGAAAATTTTATTC
GGTGGTTGCTTTGTTAAACCGGACGGTCTTGAAAATTTAGGGGATGCAAATTTAGAAGCTTGG
CCAAAGTCCGCTAAAATATTAATGTCTAAATATGGTAAAGCAAACACTGGTTGTTTCAAGTCATAG
TGAAATTGGAAACGCATCACTCTTGCAGCGCACATGGGAGCAGGCTGTTAAAGGGTTAAATGA
AAGTAAAAAACCGTTACAGCCAAGTAGCTAA

Secuencia de aminoácidos

MKKLFVLCVFFLCNIAAADSLPDLKIEKLEKGVYVHTSFEEVKGWGVVTKHGLVVLVKNDAYLIDT
PITAKDTEKLVNWFIEHGYRIKGSISTHFHGDSTAGIEWLNSQSISTYASELTNELLKKNKVNQATNS
FSGVSYSLIKNKIEVFYPPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKPDGLGNLGDANLEAWPKSAKIL
MSKYGKAKLVVSSHSEIGNASLLQRTWEQAVKGLNESKKPLQPSS

Alineamiento con IMP-83

Comparte 100% de identidad con IMP-83

PE112	MKKLFVLCVFFLCNIAAADSLPDLKIEKLEKGVYVHTSFEEVKGWGVVTKHGLVVLVKN	60
IMP-83	MKKLFVLCVFFLCNIAAADSLPDLKIEKLEKGVYVHTSFEEVKGWGVVTKHGLVVLVKN	60

PE112	DAYLIDTPITAKDTEKLVNWFIEHGYRIKGSISTHFHGDSTAGIEWLNSQSISTYASELT	120
IMP-83	DAYLIDTPVTAKDTEKLVNWFIEHGYRIKGSISTHFHGDSTAGIEWLNSQSISTYASELT	120
	*****:*****	
PE112	NELLKKNKVNQATNSFSGVSYSLIKNKIEVFYPPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKP	180
IMP-83	NELLKKNKVNQATNSFSGVSYSLIKNKIEVFYPPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKP	180

PE112	DGLGNLGDANLEAWPKSAKILMSKYGKAKLVVSSHSEIGNASLLQRTWEQAVKGLNESKK	240
IMP-83	DGLGNLGDANLEAWPKSAKILMSKYGKAKLVVSSHSEIGNASLLQRTWEQAVKGLNESKK	240

PE112	PLQPSS	246
IMP-83	PLQPSS	246

Anexo figura II. Secuencia y alineamiento de *bla_{IMP}* de la cepa PE201.

Secuencia de nucleótidos

GCGTTTATGTTCACTTCGTTTGAAGAAGTTAAAGGTTGGGGTGTAGTCACAAAACACGGTTT
 AGTGGTTCTTGTAAGAATGATGCTTATCTGATAGATACTCCAATTACCGCTAAAGATACTGAAA
 AATTAGTTAATTGGTTTATTGAGCACGGCTATAGAATCAAAGGCAGTATTTCCACACATTTCCAT
 GGCGACAGTACGGCTGGAATAGAGTGGCTTAATTCTCAATCTATCTCCACGTATGCCTCTGAAT
 TAACAAATGAACTTCTAAAAAAGACAATAAGGTGCAAGCTACAAATTCTTTTAGTGGAGTTAGT
 TATTCACCTTATCAAAAACAAAATTGAAGTTTTCTATCCAGGTCCAGGACACACTCAAGATAACGT
 AGTGGTTTGGTTACCTGAAAAGAAAATTTTATTCGGTGGTTGCTTTGTTAAACCGGACGGTCTT
 GGAAATTTAGGGGACGCAAAT

Secuencia de aminoácidos

VYVHTSFEEVKGWGVVTKHGLVVLVKNDAYLIDTPITAKDTEKLVNWFIEHGYRIKGSISTHFGDS
 TAGIEWLNSQSISTYASELTNELLKKNKQATNSFSGVSYSLIKNKIEVFYPPGHTQDNVWVWLP
 EKKILFGGCFVKPDGLGNLGDAN

Alineamiento con IMP-18 e IMP-56

Comparte 100% de identidad con las 2 variantes, ya que la secuenciación no cubre el cambio de aminoácido que distingue a las variantes. Esta cepa no fue secuenciada mediante minION.

imp-56	MKKLFVLCVFFLCNIAAADSLPDLKIEKLEKGVYVHTSFEEVKGWGVVTKHGLVVLVKN	60
imp-18	MKKLFVLCVFFLCNIAAADSLPDLKIEKLEKGVYVHTSFEEVKGWGVVTKHGLVVLVKN	60
PE201	-----VYVHTSFEEVKGWGVVTKHGLVVLVKN *****	27
imp-56	DAYLIDTPITAKDTEKLVNWFIEHGYRIKGSISTHFGDSTAGIEWLNSQSISTYASELT	120
imp-18	DAYLIDTPITAKDTEKLVNWFIEHGYRIKGSISTHFGDSTAGIEWLNSQSISTYASELT	120
PE201	DAYLIDTPITAKDTEKLVNWFIEHGYRIKGSISTHFGDSTAGIEWLNSQSISTYASELT *****	87
imp-56	NELLKKNKQATNSFSGVSYSLIKNKIEVFYPPGHTQDNVWVWLP	180
imp-18	NELLKKNKQATNSFSGVSYSLIKNKIEVFYPPGHTQDNVWVWLP	180
PE201	NELLKKNKQATNSFSGVSYSLIKNKIEVFYPPGHTQDNVWVWLP *****	147
imp-56	DGLGNLGDANLEAWPKSAKILMSKYGKAKLVVSHSEIGNASLLQRTWEQAVKGLNESKK	240
imp-18	DGLGNLGDANLEAWPKSAKILMSKYGKAKLVVSHSEIGNASLLQRTWEQAVKGLNESKK	240
PE201	DGLGNLGDAN----- *****	157
imp-56	PLQPSS	246
imp-18	PLQPSS	246
PE201	-----	157

Anexo figura III. Secuencia y alineamiento de la nueva variante de *bla*_{IMP} de la cepa PE151.

Secuencia de nucleótidos

**El triplete en negritas es la serina que cambia*

ATGAAAAAATTATTTGTTTTATGTGATTCTTCTTTGCAACATTGCTGCTGCAGATGATTCTTTG
 CCTGATTTAAAAATTGAGAAGCTTGAAAAAGGCGTTTATGTTCATACTTCGTTTGAAGAAGTTAA
 AGGTTGGGGTGTAGTCACAAAACACGGTTTGTAGTGGTTCTTGTAAGAATGATGCTTATCTGATA
 GATACTCCA**AGT**ACCGCTAAAGATACTGAAAAATTAGTTAATTGGTTTATTGAGCACGGCTATA
 GAATCAAAGGCAGTATTTCCACACATTTCCATGGCGACAGTACGGCTGGAATAGAGTGGCTTA
 ATTCTCAATCTATCTCCACGTATGCCTCTGAATTAACAAATGAACCTTCTAAAAAAGACAATAAG
 GTGCAAGCTACAAATTTCTTTTAGTGGAGTTAGTTATTCACCTTATCAAAAACAAAATTGAAGTTTT
 CTATCCAGGTCCAGGACACACTCAAGATAACGTAGTGGTTTGGTTACCTGAAAAGAAAATTTTA
 TTCGGTGGTTGCTTTGTTAAACCGGACGGTCTTGGAAATTTAGGGGATGCAAATTTAGAAGCTT
 GGCCAAAGTCCGCTAAAATATTAATGTCTAAATATGGTAAAGCAAACCTGGTTGTTTCAAGTCAT
 AGTGAAATTGGAAACGCATCACTCTTGAACGCACATGGGAGCAGGCTGTTAAAGGGTTAAT
 GAAAGTAAAAACCGTTACAGCCAAGTAGCTAA

Secuencia de aminoácidos

MKKLFVLCVFFLCNIAAADDSPDLKIEKLEKGVYVHTSFEEVKGWGVVTKHGLVVLVKNDAYLIDT
 PSTAKDTEKLVNWFIEHGYRIKGSISTHFGDSTAGIEWLNSQSISTYASELTNELLKKNKQVQATN
 SFGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKPDGLGNLGDANLEAWPKSAKIL
 MSKYGKAKLVVSSHSEIGNASLLQRTWEQAVKGLNESKKPLQPSS

Alineamiento con IMP-83

Comparten 94/95 (98.95) de identidad

PE151-IMP	MKKLFVLCVFFLCNIAAADDSPDLKIEKLEKGVYVHTSFEEVKGWGVVTKHGLVVLVKN	60
IMP-83	MKKLFVLCVFFLCNIAAADDSPDLKIEKLEKGVYVHTSFEEVKGWGVVTKHGLVVLVKN	60

PE151-IMP	DAYLIDTP S TAKDTEKLVNWFIEHGYRIKGSISTHFGDSTAGIEWLNSQSISTYASELT	120
IMP-83	DAYLIDTP V TAKDTEKLVNWFIEHGYRIKGSISTHFGDSTAGIEWLNSQSISTYASELT	120

PE151-IMP	NELLKKNKQVQATNSFGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKP	180
IMP-83	NELLKKNKQVQATNSFGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKP	180

PE151-IMP	DGLGNLGDANLEAWPKSAKILMSKYGKAKLVVSSHSEIGNASLLQRTWEQAVKGLNESKK	240
IMP-83	DGLGNLGDANLEAWPKSAKILMSKYGKAKLVVSSHSEIGNASLLQRTWEQAVKGLNESKK	240

PE151-IMP	PLQPSS	246
IMP-83	PLQPSS	246

Comparte 98.95% de identidad con las variantes IMP-83, 56, 18, 49, 75 y 71

IMP-49	MKKLFVLCVFFLCNIAAADDSPDLKIEKLEKGVYVHTSFEEVKGWGVVTKHGLVVLVKN	60
IMP-56	MKKLFVLCVFFLCNIAAADDSPDLKIEKLEKGVYVHTSFEEVKGWGVVTKHGLVVLVKN	60
PE151-IMP	MKKLFVLCVFFLCNIAAADDSPDLKIEKLEKGVYVHTSFEEVKGWGVVTKHGLVVLVKN	60
IMP-83	MKKLFVLCVFFLCNIAAADDSPDLKIEKLEKGVYVHTSFEEVKGWGVVTKHGLVVLVKN	60
IMP-18	MKKLFVLCVFFLCNIAAADDSPDLKIEKLEKGVYVHTSFEEVKGWGVVTKHGLVVLVKN	60
IMP-75	MKKLFVLCVFFLCNIAAADDSPDLKIEKLEKGVYVHTSFEEVKGWGVVFAKHGLVVLVKN	60
IMP-71	MKKLFVLCVFFLCNIAAADDSPDLKIEKLEKGVYVHTSFEEVKGWGVVFAKHGLVVLVKN	60

```

***** .:*****
IMP-49      DAYLIDTPITAKDTEKLVNWFIEHGYRIKGSISTHFHGDSTAGIEWLNSQSISTYASELT 120
IMP-56      DAYLIDTPITAKDTEKLVNWFIEHGYRIKGSISTHFHGDSTAGIEWLNSQSISTYASELT 120
PE151-IMP   DAYLIDTPSTAKDTEKLVNWFIEHGYRIKGSISTHFHGDSTAGIEWLNSQSISTYASELT 120
IMP-83      DAYLIDTPVTAKDTEKLVNWFIEHGYRIKGSISTHFHGDSTAGIEWLNSQSISTYASELT 120
IMP-18      DAYLIDTPITAKDTEKLVNWFIEHGYRIKGSISTHFHGDSTAGIEWLNSQSISTYASELT 120
IMP-75      DAYLIDTPITAKDTEKLVNWFIEHGYRIKGSISTHFHGDSTAGIEWLNSQSISTYASELT 120
IMP-71      DAYLIDTPITAKDTEKLVNWFIEHGYRIKGSISTHFHGDSTAGIEWLNSQSISTYASELT 120
*****

IMP-49      NELLKKNKVKQATNSFSGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKP 180
IMP-56      NELLKKNKVKQATNSFSGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKP 180
PE151-IMP   NELLKKNKVKQATNSFSGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKP 180
IMP-83      NELLKKNKVKQATNSFSGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKP 180
IMP-18      NELLKKNKVKQATNSFSGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKP 180
IMP-75      NELLKKNKVKQATNSFSGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKP 180
IMP-71      NELLKKNKVKQATNSFSGVSYSLIKNKIEVFYPGPGHTQDNVVVWLPEKKILFGGCFVKP 180
*****

IMP-49      DGLGNLGDANLEAWPKSAKILMSKYGKAKLVVSSHSEIGNASLLQRTWEQAVKGLNESKK 240
IMP-56      DGLGNLGDANLEAWPKSAKILMSKYGKAKLVVSGHSEIGNASLLQRTWEQAVKGLNESKK 240
PE151-IMP   DGLGNLGDANLEAWPKSAKILMSKYGKAKLVVSSHSEIGNASLLQRTWEQAVKGLNESKK 240
IMP-83      DGLGNLGDANLEAWPKSAKILMSKYGKAKLVVSSHSEIGNASLLQRTWEQAVKGLNESKK 240
IMP-18      DGLGNLGDANLEAWPKSAKILMSKYGKAKLVVSSHSEIGNASLLQRTWEQAVKGLNESKK 240
IMP-75      DGLGNLGDANLEAWPKSAKILMSKYGKAKLVVPSHSEIGNASLLQRTWEQAVKGLNESKK 240
IMP-71      DGLGNLGDANLEAWPKSAKILMSKYGKAKLVVSSHSEIGNASLLQRTWEQAVKGLNESKK 240
*****

IMP-49      PLQPSS      246
IMP-56      PLQPSS      246
PE151-IMP   PLQPSS      246
IMP-83      PLQPSS      246
IMP-18      PLQPSS      246
IMP-75      PLQPSS      246
IMP-71      PLQPSS      246
*****

```

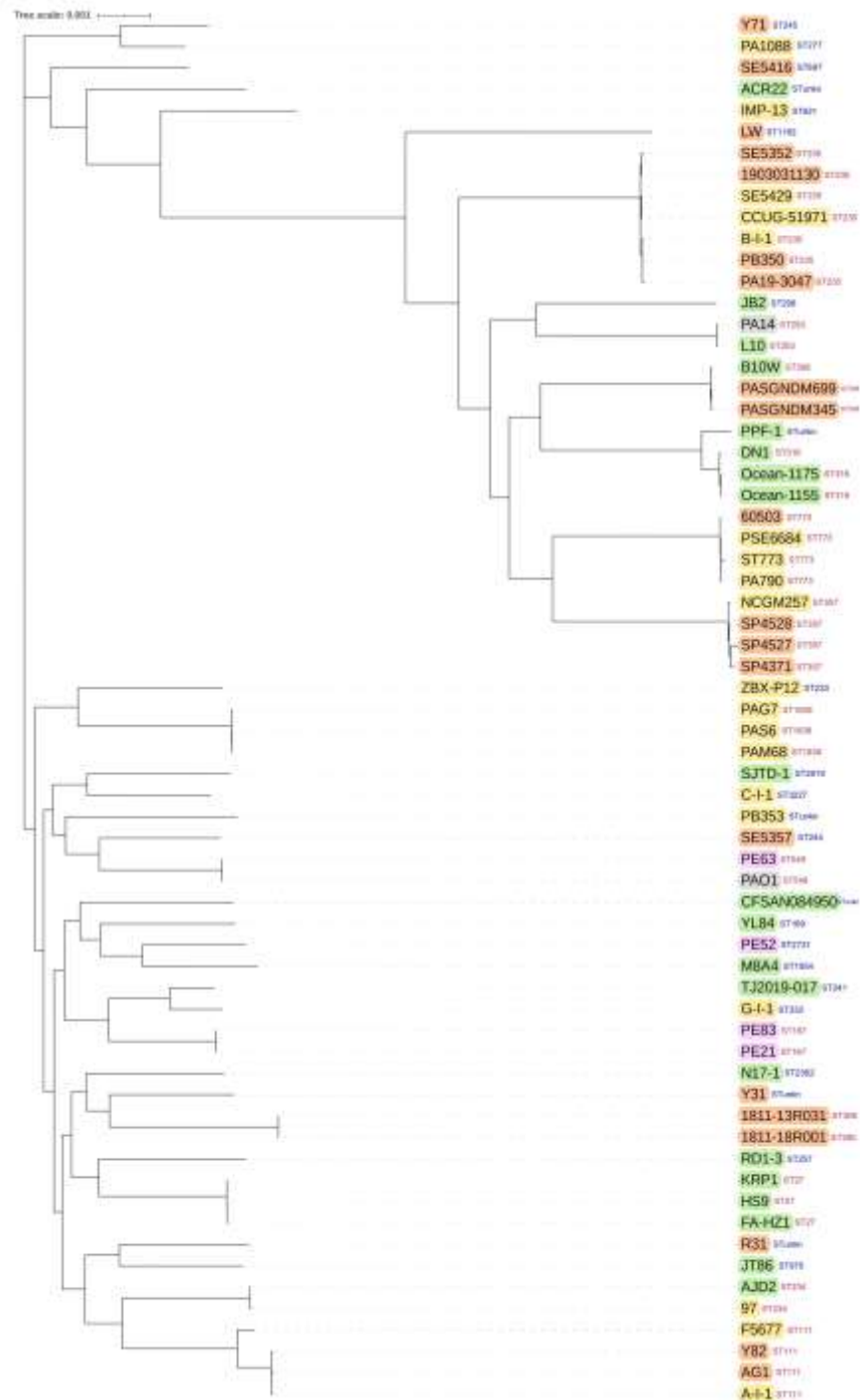
Anexo figura IV. Reporte de calidad de los Drafts de las cepas PE21, PE52, PE63 y PE83 generados con QUAST.

Report

	PE21_metaensamble	PE52_metaensamble	PE63_metaensamble	PE83_metaensamble
# contigs (>= 0 bp)	102	49	27	105
# contigs (>= 1000 bp)	94	39	25	96
# contigs (>= 5000 bp)	64	26	24	67
# contigs (>= 10000 bp)	59	22	22	61
# contigs (>= 25000 bp)	50	18	21	51
# contigs (>= 50000 bp)	34	15	17	37
Total length (>= 0 bp)	7388568	6787472	6236071	7343505
Total length (>= 1000 bp)	7382737	6781080	6235157	7336979
Total length (>= 5000 bp)	7314686	6752122	6233777	7268340
Total length (>= 10000 bp)	7273101	6721588	6223116	7215409
Total length (>= 25000 bp)	7117242	6639948	6207433	7035622
Total length (>= 50000 bp)	6539198	6520733	6095578	6521432
# contigs	101	47	26	103
Largest contig	537278	1497908	917426	537294
Total length	7388095	6786596	6235658	7342540
GC (%)	65.47	66.14	66.57	65.51
N50	199338	668905	480098	197737
N75	111559	287215	261135	101656
L50	11	4	5	11
L75	23	8	9	24
# N's per 100 kbp	0.00	0.31	0.00	0.00

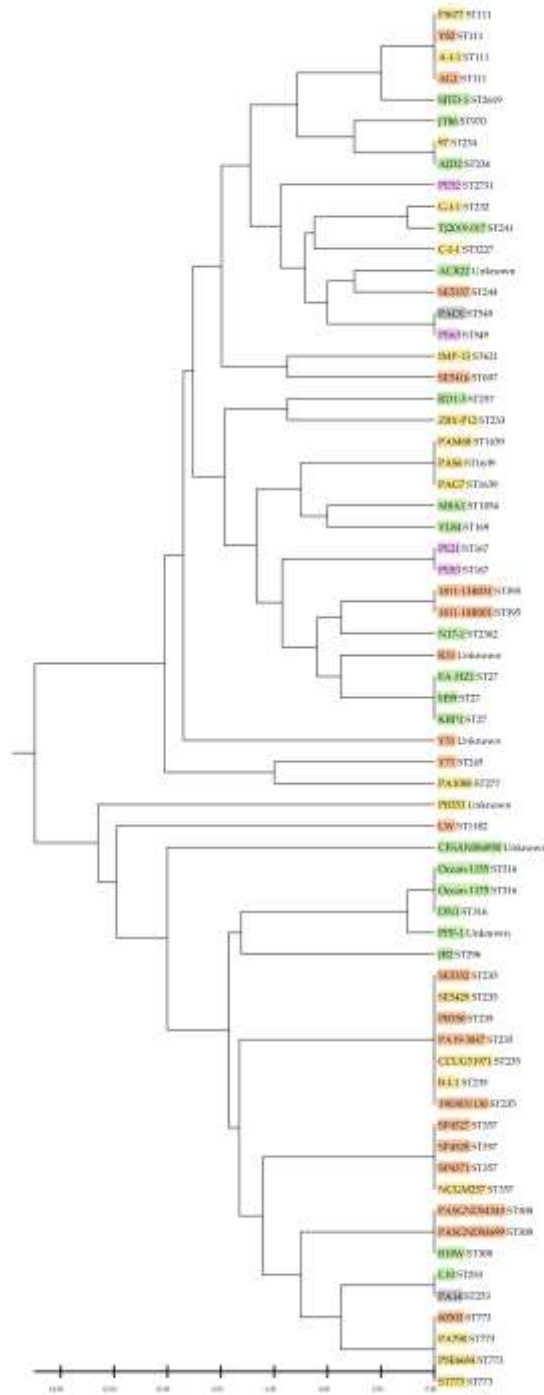
All statistics are based on contigs of size >= 500 bp, unless otherwise noted (e.g., "# contigs (>= 0 bp)" and "Total length (>= 0 bp)" include all contigs).

Anexo figura V. Dendrograma generado a partir del genoma core de cepas de *P. aeruginosa*.



Los nombres de las cepas se colorearon según la fuente de aislamiento. Amarillo: cepas urinarias; Naranja: cepas de esputo; Verde: cepas ambientales; Rosa: Cepas mexicanas; Gris: Cepas de referencia. El archivo newick de Roary fue visualizado con iTOL.

Anexo figura VI. Árbol filogenético basado en secuencias concatenadas del MLST de genomas de *P. aeruginosa*.



El dendrograma se construyó con MEGA 11 utilizando el algoritmo UPGMA. Las distancias se indican en la escala de la parte inferior. Los nombres de las cepas se colorearon según la fuente de aislamiento. Amarillo: cepas urinarias; Naranja: cepas de esputo; Verde: cepas ambientales; Rosa: Cepas mexicanas; Gris: Cepas de referencia. El archivo newick de Roary fue visualizado con iTOL.

Anexo tabla I. Características de los plásmidos incluidos en el árbol filogenético de las proteínas RepA.

Nombre del plásmido	Cepa	No. de acceso	País	Tamaño (pb)	Genes de resistencia	Replicasa	Familia	Grupo de incompatibilidad
unnamed1	AR_0353	NZ_CP027173.1	-	41,559	<i>bla_{GES-1}</i>	RepA	PriCT-1 superfamily	ND
unnamed1	AR_0356	NZ_CP027168.1	-	57,053	<i>bla_{KPC-2}</i>	RepA	Rep_3 superfamily	ND
unnamed2	AR_0356	NZ_CP027170.1	-	438,531	<i>aadA16, tet(G), qacEΔ1, aac(6')-Ib4</i>	RepA	Rep_3 superfamily	ND
unnamed3	AR441	NZ_CP029094.1	-	438,529	<i>aac(6')-Ib4, aadA16, tet(G), sul1, qacEΔ1</i>	RepA	Rep_3 superfamily	ND
p1	C79	NZ_CP040685.1	China	40,180	<i>bla_{KPC-2}</i>	RepA	HTH superfamily	IncP-6
pF092021-2	F092021	NZ_CP081289.1	China: Henan	32,558	<i>aac(6')-II, bla_{IMP-10}</i>	RepA	Rep_3 superfamily	ND
unnamed1	P8W	CP081478.1	China: Tianjin	232,884	<i>sul1, cmIA6, qacE, ant(2'')-Ia</i>	RepA	Rep_3 superfamily	ND
pOZ176	PA96	NC_022344.1	Guangzhou, China	500,839	<i>aac(6')-Ib4, aac(6')-Ib4, aph(3')-II, sul1, catB8a, bla_{OXA-10}, bla_{IMP-9}, qacEΔ1</i>	RepA	Rep_3 superfamily	IncP-2
pMATVIM-7	P07-406	AM778842.1	USA: Texas	24,179	<i>bla_{VIM-7}</i>	RepA	HTH superfamily	ND
pNOR-2000	COL-1	NC_020452.1	Francia	21,880	<i>qacEΔ1, sul1, bla_{VIM-2}</i>	RepA	Rep_3 superfamily	ND
pCOL-1	ST308	NC_022346.1	Colombia	31,529	<i>bla_{KPC-2}</i>	RepA	HTH superfamily	IncP-6

unnamed	FDAARGOS_570	CP033834.1	USA	36,032	<i>aac(6')-lb3, aph(6)-ld, aph(3'')-lb, aac(6')-lb3, sul1, bla_{OXA-10}, bla_{VIM-6}, bla_{OXA-10}, qacED1, cmx</i>	RepA	HTH superfamily	ND
p10265-KPC	10265	NZ_KU578314.1	China	38,939	<i>bla_{TEM}, bla_{KPC-2}</i>	RepA	HTH superfamily	IncP-6
pCB58	-	NZ_KY630469.1	Porto, Portugal	32,207	<i>aac(6')-lb4, aac(3)-la, aac(6')-ll, aph(6)-ld, aph(3'')-lb, qacED1, sul1, bla_{VIM-2}</i>	RepA	Rep_3 superfamily	ND
pAMBL2	PAO1	NZ_KP873171.1	Madrid	24,133	<i>aadA1, aac(6')-lb4, sul1, bla_{VIM-1}, bla_{VIM-1}, bla_{VIM-1}, qacED1</i>	RepA	Rep_3 superfamily	ND
pJB37	FFU NA P_PS_37	NZ_KY494864.1	Porto, Portugal	464,804	<i>aac(6')-ll, aac(3)-la, aac(6')-lb4, qacED1, sul1, bla_{VIM-2}</i>	RepA	Rep_3 superfamily	IncP-2
pD5170990	D5170990	KX169264.1	Brasil	32,424	<i>sul1, aac(6')-ll, aph(3'')-lb, aph(6)-ld, qacED1, cmx, bla_{KPC-2}</i>	RepA	HTH superfamily	ND
p243931-IMP	243931	NZ_MN208062.1	China; Zhejiang	392,046	<i>msr(E), armA, aph(3')-la, aac(6')-lb4, ARR-2, mph(E), qnrVC1, sul1, dfrA22, tet(C), bla_{OXA-1}, bla_{IMP-45}, qacED1, catB3</i>	RepAcin	COG5527 superfamily	ND
p60503-DIM	60503	NZ_MN208063.1	China: Beijing	407,628	<i>catB3, qacED1, aac(6')-lla, aac(6')-lla, aac(6')-lb, aph(3'')-lb, aadA1, aph(6)-ld, qnrVC6, sul1, dfrA1, dfrB, bla_{OXA-4}, bla_{DIM}</i>	RepA	AAA_25 ATPase	ND

pJB35	-	NZ_MF168945.1	Portugal	31,166	<i>aac(6')-lb4, aac(6')-ll, qacEΔ1, sul1, bla_{VIM-2}</i>	RepA	Rep_3 superfamily	ND
pCOOP-101	PAcoop101	NZ_MF141039.1	Reino Unido	26,108	<i>dfrA1, sul1, aadA22, aac(6')-ll, qacEΔ1, bla_{VIM-4}</i>	RepA	Rep_3 superfamily	ND
pOXA-198	PA41437	NZ_MG958650.1	Francia	48,978	<i>cmiA1, qacEΔ1, sul1, bla_{OXA-198}, aac(6')-ll</i>	RepA	PriCT-1 superfamily	ND
pPA2047	2047	NZ_MN082782.1	Argentina	43,660	<i>bla_{KPC-2}</i>	RepA	PriCT-1 superfamily	ND
pTROUS1	163940	NZ_MK047610.1	Francia	42,035	<i>aac(6')-lb, qacEΔ1, sul1, bla_{OXA-19}, bla_{IMP-63}</i>	RepA	Rep_3 superfamily	ND
pMRVIM0713	MRSN17623	KP975076.1	USA	36,032	<i>aac(6')-lb3, aac(6')-lb3, aph(6)-ld, aph(3'')-lb, sul1, bla_{OXA-10}, bla_{VIM-6}, qacEΔ1, cmx</i>	RepA	HTH superfamily	ND
pNK546b	NK546	NZ_MN583270.1	China: Tianjin	232,884	<i>sul1, qacE, cmiA6, ant(2'')-la</i>	RepA	Rep_3 superfamily	IncP-7
p1160-VIM	1160	NZ_MF144194.1	China	205,426	<i>msr(E), aph(3'')-lb, aph(6)-ld, aac(6')-lb4, aac(6')-lb, dfrA42, aadA1, mph(E), ere(A), qnrVC6, sul1, bla_{VIM-24}, qacEΔ1, catB3</i>	RepA	Rep_3 superfamily	IncP-7
p2	ZPPH2	NZ_CP077987.1	China: Hangzhou	35,358	<i>tet(A)</i>	RepA	Rep_3 superfamily	ND
p4	ZPPH1	NZ_CP077992.1	China: Hangzhou	35,358	<i>tet(A)</i>	RepA	Rep_3 superfamily	ND
pFAHZU40-KPC	FAHZU40	NZ_CP078008.1	China: Hangzhou	28,700	<i>aac(6')-lbΔ, aac(6')-lbΔ, qnrVC4, cmiA5, bla_{TEM-1C}, bla_{KPC-2}</i>	RepA	Rep_3 superfamily	ND

pQZPH41-KPC	QZPH41	NZ_CP064400.1	China: Quzhou	88,210	<i>bla</i> _{KPC-2}	RepA	Rep_3 superfamily	ND
pPUV-1	NMI804/03	NZ_MT732179.1	Poland	489,508	<i>aadA10, aadA10, aadA10, aadA10, qacEΔ1, sul1, bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>ant(2'')</i> - <i>la</i> , <i>ant(2'')</i> - <i>la</i> , <i>ant(2'')</i> - <i>la</i>	RepA	Rep_3 superfamily	IncP-2

ANEXOS DE PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Anexo I. Soluciones para la extracción de plásmidos mediante el método de lisis alcalina descrito por Kieser.

SDS 10%

NaOH 5 M

$$g = (5M)(40)(0.005 L)$$

$$g = 1$$

Agregar 1g de NaOH en un matraz y disolver en 5 ml de agua destilada. Esterilizar a 15'lb durante 15 min.

Tris-HCl 25mM

$$g = (0.025)(121.14)(0.025 L)$$

$$g = 0.076$$

Agregar los 0.076 g de Tris a un matraz y disolver con 15 ml de agua destilada. Posteriormente ajustar el pH a 8 y aforar a 25mL con agua destilada. Esterilizar a 15'lb durante 15 min.

Sacarosa 0.3 M

$$g = (0.3 M)(312.30)(0.030 L)$$

$$g = 2.8107$$

Agregar los 2.8107 g de sacarosa a un matraz y disolver en 30 ml de agua destilada. Se esteriliza por filtración; previamente se esteriliza el filtro y la membrana.

EDTA 25 mM

$$g = (0.025 M)(372.24)(0.025 L)$$

$$g = 0.233$$

Agregar los 0.233g a un matraz y disolver en 15 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 8 y aforar a 25 ml con agua destilada. Esterilizar a 15'lb durante 15 min.

Lisozima

$$C1 = 10 \text{ mg}/\mu\text{l}$$

$$V = 40 \mu\text{l}$$

$$C2 = ?$$

$$V2 = 270 \mu\text{l}$$

$$C2 = (10 \text{ mg}/\mu\text{l})(40 \mu\text{l}) / (270 \mu\text{l}) = 1.5 \text{ mg}/\mu\text{l}$$

$$1.5 \text{ mg}/\mu\text{l} - 1 \text{ ml}$$

$$X = 0.2 \text{ ml}$$

$$X = 0.3 \text{ mg} = 0.0003\text{g}$$

- Preparación de 50 ml de la solución 1:

Agregar a un frasco estéril 15 ml de sacarosa 0.3M, 1.25 ml de Tris 25 mM, 2.5 ml de EDTA 25 mM y 31.25 ml de agua tridestilada estéril.

- Preparación de 5 ml de la solución 2:

Agregar a un frasco estéril 300 μl de NaOH 5M, 1 ml de SDS 10% y 3.7 ml de agua tridestilada estéril.

Anexo II. Soluciones Electroforesis en gel de Campos Pulsados (PFGE-S1)

Soluciones stock

EDTA 0.5 M (50 ml)

$$g = (0.5 \text{ M})(372.27)(0.05 \text{ L})$$

$$g = 9.30675$$

Se agregan los 9.30675 g al matraz y sólo se adicionan 20 ml de agua; destilada se pone en agitación con una bala magnética y se agregan hojuelas de NaOH (el EDTA se empieza disolver hasta que alcance un pH alcalino) hasta que empiece a aclararse el EDTA y alcance un pH de 8, posteriormente se agrega a un matraz aforado y se adiciona agua destilada hasta alcanzar un volumen de 50 ml.

Tris 1 M (50 ml)

$$g = (1 \text{ M})(121.17)(0.05 \text{ L})$$

$$g = 6.0585$$

Se agregan los 6.0585g de Tris a 20 ml de agua, no es necesario agitar con bala magnética. Posteriormente se adiciona HCl 0.1 N hasta que alcance un pH de 8, se pasa la solución a un matraz aforado y se agrega agua destilada hasta alcanzar un volumen de 50 ml. Esterilizar a 10'lb por 10 min.

TE 10:1

Tris 10 mM (25 ml)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = (0.01 \text{ M})(0.025 \text{ L})/1 \text{ M} = 0.00025 \text{ L}$$

$$V_1 = 250 \mu\text{L}$$

EDTA 1 mM

$$V_1 = (0.001 \text{ M})(0.025 \text{ L})/0.5 \text{ M} = 0.00005 \text{ L}$$

$$V_1 = 50 \mu\text{L}$$

Agregar a un matraz 250 μL de Tris 1 M y 50 μL de EDTA 0.5 M y aforar a 25 ml con agua destilada. Esterilizar a 10'lb por 10 min.

Solución de lisis

Tris 50 mM (25 ml)

$$V_1 = (0.05 \text{ M})(0.025 \text{ L})/0.5 \text{ M} = 0.0025 \text{ L}$$

$$V_1 = 2.5 \text{ ml}$$

EDTA 50 mM

$$V_1 = (0.05 \text{ M})(0.025 \text{ L})/0.5 \text{ M} = 0.001 \text{ L}$$

$$V_1 = 1 \text{ ml}$$

Agregar a un matraz 2.5 ml de Tris 1 M y 1 ml de EDTA 0.5 M y aforar a 25 ml destilada. Esterilizar a 15'lb por 15 min.

TBE 10X

Tris 0.89 M

$$g = (0.89 \text{ M})(121.14)(0.2 \text{ L})$$

$$g = 21.563$$

EDTA 0.02 M

$$g = (0.02 \text{ M})(372.24)(0.2 \text{ L})$$

$$g = 1.5$$

Ácido bórico 0.89 M

$$g = (0.89 \text{ M})(61.83)(0.2 \text{ L})$$

$$g = 11.005$$

Agregar los 21.563 g de Tris a 100 ml de agua destilada y disolver. Posteriormente agregar los 11.005 g de ácido bórico y agitar con una bala magnética hasta que se disuelva y por último agregar los 1.5 g de EDTA y disolver. Ajustar a un pH de 8 y aforar a 200 ml con agua destilada. Esterilizar a 15lb durante 15 min.

Tabla 1. Cantidades para preparar TBE 0.5X

VOLUMEN FINAL	TBE 10X	Agua destilada
100 ml	5 ml	95 ml
300 ml	15 ml	285 ml
500 ml	25 ml	475 ml
700 ml	35 ml	665 ml
1000 ml	50 ml	950 ml

Anexo III. Bitácora de comandos para el análisis bioinformático

1. Calidad de las lecturas

```
fastqc lectura.fastq.gz -o nombre-carpeta
```

2. Ensamble con spades

```
spades.py --careful --cov_cutoff auto -1 lectura1.fastq.gz -2 lectura2.fastq.gz -k21,33,55,77,99,127 -o nombre-carpeta -t 4
```

3. Ensamble con velvet utilizando lecturas trimmadas

```
velveth Velvet21_SE 21 -fastq -short lectura1_val_1.fq lectura2_val_2.fq
```

```
velvetg Velvet21_SE -cov_cutoff auto -exp_cov auto -ins_length 250
```

el archivo que diga contigs.fa es el ensamble

4. Ensamble híbrido con Unicycler

```
unicycler -1 lectura_illumina_1.fastq.gz -2 lectura_illumina_2.fastq.gz -l lectura_larga.fastq.gz -o directorio_de_salida
```

*NOTA: Si el proceso se interrumpe y marca el siguiente error: Error: SPAdes encountered an error. Se puede solucionar sustituyendo los kmers default por otros de mayor longitud, siempre y cuando no sobrepases el tamaño del kmer promedio. Unicycler por default utiliza 8 kmers y lo ideal es sustituir por 8 kmers, quedando la línea de comando de la siguiente manera:

```
unicycler -1 lectura_illumina_1.fastq.gz -2 lectura_illumina_2.fastq.gz -l lectura_larga.fastq.gz --kmers 21,29,33,49,55,61,67,71 -o nombre-carpeta
```

5. Trimming

```
trim_galore --fastqc --paired lectura1.fastq.gz lectura2.fastq.gz -o nombre_directorio
```

El directorio de salida debe ser previamente creado y en la línea de comandos indicar el nombre de dicho directorio.

Genera las lecturas “trimados” y el archivo del reporte.

6. Calidad de los ensambles

```
quast.py "nombre del o los archivos" -o "nombre de la carpeta"
```

Abres el archivo report.txt o el pdf

NOTA: elegir el ensamble con menor número de contigs y lecturas más largas (N50)

7. PLACNETw

Las lecturas comprimidas (. fastq.gz) se cargan en la plataforma de placnetw (<https://castillo.dicom.unican.es/upload/>) y esperar a que se haga el análisis. Si la carga falla, intentar trimmar las lecturas y volver a subirlas.

8. Anotacion con prokka

```
prokka --outdir prokka_PE83_2 --genus Pseudomonas --species aeruginosa --strain PE83 --addgenes --locustag PE83 --centre X --compliant ensamble.fasta
```

*NOTA: se le agrega --centre X --compliant cuando el head de los contigs es largo

9. Opción plasmid de SPAdes

```
spades.py --plasmid -1 lectura1_R1.fastq -2 lectura2_R2.fastq -o nombre-de-carpeta
```

10. Roary

Primero se copian los archivos “.gff” a una nueva carpeta

Cambiar el nombre de los archivos

```
mv PROKKA_05202021.gff PE21.gff
```

-Línea de comando para ROARY

```
nohup roary -f pangenoma_new -e -n -v -qc *.gff &
```

*nohup se puede omitir, se agrega a la línea de comando para mantener la ejecución del comando pese a salir de la terminal.

-Después dar la instrucción:

```
FastTree -gtr -nt core_gene_alignment.aln > core_gene_alignment.nwk
```

-Para desplegar los gráficos, se copia el programa de la página [https://github.com/sanger-](https://github.com/sanger-pathogens/Roary/blob/master/contrib/roary_plots/roary_plots.py)

pathogens/Roary/blob/master/contrib/roary_plots/roary_plots.py roary_plots.py y se pega en la carpeta donde se va a realizar el análisis. Después correr la siguiente línea de comandos:

```
python roary_plots.py core_gene_alignment.nwk gene_presence_absence.csv  
*genes core con presencia y ausencia*
```

11. Parsnp

```
parsnp -r genoma-de-referencia -c -d carpeta-con-genomas -p número-núcleos
```

*la flag -c permite incluir todos los archivos en el análisis sin hacer omisiones.

Article

A Plasmid Carrying *bla*_{IMP-56} in *Pseudomonas aeruginosa* Belonging to a Novel Resistance Plasmid Family

Jessica Gómez-Martínez ¹, Rosa del Carmen Rocha-Gracia ¹ , Elena Bello-López ², Miguel Angel Cevallos ², Miguel Castañeda-Lucio ¹, Alma López-García ³ , Yolanda Sáenz ⁴ , Guadalupe Jiménez-Flores ⁵, Gerardo Cortés-Cortés ^{1,6} and Patricia Lozano-Zarain ^{1,4} 

¹ Posgrado en Microbiología, Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, Mexico

² Programa de Genómica Evolutiva, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca 62210, Mexico

³ Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, Mexico

⁴ Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), 26006 Logroño, Spain

⁵ Laboratorio Clínico, Área de Microbiología, Hospital Regional Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, Puebla 72570, Mexico

⁶ Department of Microbiology and Environmental Toxicology, University of California at Santa Cruz, Santa Cruz, CA 95064, USA

* Correspondence: plozano_zarain@hotmail.com; Tel.: +52-222-2-29-55-00 (ext. 2543)



Citation: Gómez-Martínez, J.; Rocha-Gracia, R.d.C.; Bello-López, E.; Cevallos, M.A.; Castañeda-Lucio, M.; López-García, A.; Sáenz, Y.; Jiménez-Flores, G.; Cortés-Cortés, G.; Lozano-Zarain, P.A. Plasmid Carrying *bla*_{IMP-56} in *Pseudomonas aeruginosa* Belonging to a Novel Resistance Plasmid Family. *Microorganisms* **2022**, *10*, 1863. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091863>

Academic Editors: Carlo Pazzani and Maria Scrascia

Received: 9 August 2022

Accepted: 13 September 2022

Published: 17 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM} are the most detected plasmid-encoded carbapenemase genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Previous studies have reported plasmid sequences carrying *bla*_{IMP} variants, except *bla*_{IMP-56}. In this study, we aimed to characterize a plasmid carrying *bla*_{IMP-56} in a *P. aeruginosa* strain isolated from a Mexican hospital. The whole genome of *P. aeruginosa* strain PE52 was sequenced using Illumina Miseq 2 × 150 bp, with 5 million paired-end reads. We characterized a 27 kb plasmid (pPE52IMP) that carried *bla*_{IMP-56}. The phylogenetic analysis of RepA in pPE52IMP and 33 *P. aeruginosa* plasmids carrying resistance genes reported in the GenBank revealed that pPE52IMP and four plasmids (pMATVIM-7, unnamed (FDAARGOS_570), pD5170990, and pMRVIM0713) were in the same clade. These closely related plasmids belonged to the MOB_{P11} subfamily and had similar backbones. Another plasmid (p4130-KPC) had a similar backbone to pPE52IMP; however, its RepA was truncated. In these plasmids, the resistance genes *bla*_{KPC-2}, *bla*_{VIM} variants, *aac*(6′)-Ib4, *bla*_{OXA} variants, and *bla*_{IMP-56} were inserted between *pluI* and *resolvase* genes. This study describes a new family of plasmids carrying resistance genes, with a similar backbone, the same RepA, and belonging to the MOB_{P11} subfamily in *P. aeruginosa*. In addition, our characterized plasmid harboring *bla*_{IMP-56} (pPE52IMP) belongs to this family.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; antimicrobial resistance; plasmids; *bla*_{IMP-56}

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen causing nosocomial infections such as ventilator-associated pneumonia, urinary tract infections, blood-associated infections, and skin and soft tissue infections [1–3]. Infections with this microorganism are challenging to treat due to its natural resistance and the accelerated emergence of strains resistant to almost all antibiotics, including carbapenems (last-resort treatments) [1]. Therefore, the World Health Organization in 2017 included *P. aeruginosa* in the critical-level priority pathogens group, along with *Acinetobacter baumannii* and carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* [4].

The main mechanisms involved in carbapenem resistance in *P. aeruginosa* are loss of the OprD porin, overexpression of efflux pumps, overexpression of the chromosomal beta-lactamase AmpC, and acquisition of carbapenem resistance genes through mobile genetic elements such as plasmids [5,6]. Class A, B, and D carbapenemases have been reported in *P. aeruginosa* strains; however, class B (Metallo- β -lactamases) are the most prevalent, of which VIM enzyme is the most frequent, followed by IMP [7]. There are currently 90 IMP metalloenzyme variants reported in the beta-lactamase database [8], including IMP-56, which varies from IMP-18 in a single amino acid (Ser214Gly) (99.59% identity). IMP-18 was reported for the first time in a *P. aeruginosa* isolated from bronchial aspirate in the southwestern United States [9]. IMP-18 has been found in Mexico, Puerto Rico, and France [10–15] and is commonly associated with chromosomal class 1 integrons containing other antibiotic resistance genes such as acetylases and oxacillinases [15–17].

The *bla*_{IMP-56} sequence was reported in January 2016 in a *P. aeruginosa* strain from Guatemala (GenBank accession no. NG_049218.1) and by our research group (GenBank accession no. KY646161) in a strain from Mexico [15]. In addition, this variant was reported in a class 1 integron and located by Southern blot in a plasmid [15]. IMP and VIM Metallo- β -lactamases are the most detected carbapenemases in plasmids of *Pseudomonas aeruginosa* [18–22] as well as the KPC-2 serine carbapenemase [3,23,24]. The plasmid sizes carrying these carbapenemases vary widely; the range reported in GenBank is between 2 kb and 500 kb. According to the GenBank database, one to two plasmids in *P. aeruginosa* strains have been reported, although five strains carry up to four plasmids (GenBank accession no. CP077988.1, CP077971.1, CP086010.1, LT969520.1, CP065412.1).

Until now, fourteen incompatibility groups have been recognized in *P. aeruginosa* plasmids (IncP-1–IncP-14) [25]. Incompatibility groups IncP-2, IncP-6, and IncP-7 are the most associated with plasmids carrying carbapenem resistance genes in *P. aeruginosa* [7]. However, contrary to *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter*, a PCR-Based Replicon Typing (PBRT) to classify *P. aeruginosa* plasmids has not been reported [26,27]. On the other hand, the degenerate primer MOB typing (DPMT) method, which allows the classification of gamma-proteobacteria plasmids [28], has been used in some studies to classify *P. aeruginosa* plasmids [15].

Previous studies have reported different plasmid-borne *bla*_{IMP} variants in clinical strains of *P. aeruginosa*. For example, *bla*_{IMP-4} was reported in a 51,207 bp conjugative plasmid and possesses the conserved IncN1-type backbone regions (*repA*, iterons, conjugal transfer genes, and maintenance genes) [20]. On the other hand, *bla*_{IMP-9} and *bla*_{IMP-45} were reported in 500,839 and 513,322 bp megaplasmids, respectively, with a highly similar backbone [18,29].

Our laboratory reported the *P. aeruginosa* strain PE52 isolated from a Mexican hospital and harboring a class 1 integron carrying *bla*_{IMP-56}, detected in a plasmid by Southern blot [15]. Therefore, in this study, we aimed to characterize the plasmid carrying *bla*_{IMP-56} in *P. aeruginosa* strain PE52.

2. Materials and Methods

2.1. Characteristics of *P. aeruginosa* PE52

For the characterization of the *bla*_{IMP-56}-carrying plasmid, we used the *P. aeruginosa* strain PE52, which was isolated from the urinary culture of a patient admitted to the Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, Mexico. The mechanisms of resistance and the presence of plasmids were previously described [15]. Furthermore, this strain carried *bla*_{IMP-56} in a new class 1 integron arrangement and we experimentally observed that *bla*_{IMP-56} was probably present in a plasmid [15].

2.2. Genome Sequencing

Genomic DNA from strain PE52 was extracted using the Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA). The whole-genome sequenc-

ing was executed by Illumina Miseq 2×150 bp, with 5 million paired-end reads in the SNPSaurus Genomics to Genotype [30].

2.3. Plasmid Analysis

The quality of the paired-end reads was measured by FastQC version 3.9.0 [31], BLASTn [32], PLACNETw [33], and the plasmid SPAdes version 3.9.0 (St. Petersburg State University, St Petersburg, Russia) [34] were used to differentiate the nodes of plasmids. The genome sequences were annotated with Rapid Annotations using Subsystem Technology (RAST) [35]. Plasmids were drawn using Proksee [36]. Finally, oriFinder was used to identify the origin of the transfer site in pPE52IMP [37].

2.4. Plasmid Characterization

The MOBScan web application [38] was used to identify relaxases and classify the plasmids into any of the nine MOB families. For in silico classification by the replicon method, we used PlasmidFinder [39].

To determine the phylogenetic relationship of RepA protein in pPE52IMP and plasmids from *P. aeruginosa*, we analyzed the RepA of plasmids carrying resistance genes and constructed a phylogenetic tree. A total of 164 nucleotide sequences of complete and partial plasmids from the GenBank database were obtained (until October 2021). The plasmid sequences were annotated with Rapid Annotations using Subsystem Technology (RAST) [35] and ResFinder version 4.1 [40] for the detection of antibiotic resistance genes in all plasmids. It is essential to point out that plasmids that did not carry resistance genes were not included. RepA amino acid sequences of the plasmids carrying resistance genes were searched in the annotations using the keywords “replicase”, “repA”, and “helix-turn-helix domain-containing protein”, and their replicase A domains were corroborated with Pfam [41]. In addition, RepA with premature stop codons or ORF changes were discarded. Finally, 33 RepA proteins of plasmids (Table S1) (including pPE52IMP) were used to construct the phylogenetic tree. The Molecular Evolutionary Genetics Analysis tool, MEGA version 11.0.10 [42], was used to infer RepA proteins’ phylogeny using the UPGMA method (the parameters used were amino acid substitution type, no. of differences method, and 100 bootstrap replicates).

2.5. Comparative Analysis of Plasmids Obtained from GenBank and pPE52IMP

For the comparative analysis of plasmids, we selected the complete sequences of the plasmids that shared 100% identity with *repA* of pPE52IMP and were in the same clade in the phylogenetic tree. To align and compare the sequences, we used MAUVE version 20150226 [43] and CLC Sequence Viewer version 8.0 (CLC bio A/S, Aarhus N, Denmark). To represent the comparison of plasmids, EASYFIG 2.2.5 was used [44].

3. Results

3.1. Structural Features of the pPE52IMP Plasmid

Whole-genome sequencing revealed the presence of a single plasmid, pPE52IMP, that carries the *bla*_{IMP-56} variant (GenBank accession no. CP102481.1). The pPE52IMP plasmid had a size of 27,635 bp, 39 open reading frames (ORFs), and guanine–cytosine (G+C) content of 62.2%. Moreover, 32 of the 39 open reading frames had a predicted function: 1 of replication, 6 of stability, 7 of transfer, 13 of adaptation, and 5 transposon-related genes. We could not determine the functional domain of seven hypothetical proteins (Figure 1).

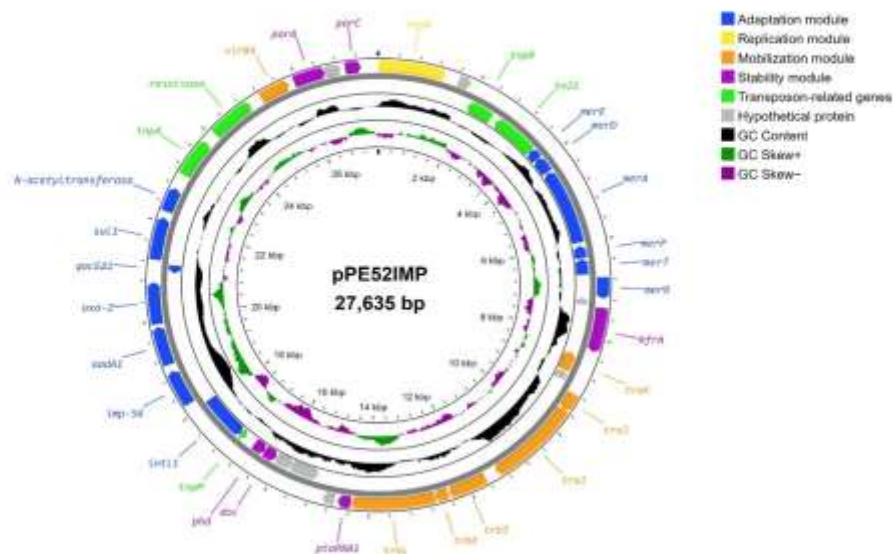


Figure 1. Structure of the pPE52IMP plasmid of *P. aeruginosa* strain PE52. Plasmid modules are represented with different colors. Blue: adaptation; yellow: replication; orange: mobilization; purple: stability; green: transposons; gray: hypothetical proteins. GC content, GC skew+ and GC skew- are represented in colors black, purple and green, respectively on the inner map.

The transfer module consisted of the genes *traI*, *traK*, *trbL*, *trbK*, *trbJ*, *virB4*, and a relaxase *traI* belonging to the MOB_{P11} subfamily. The *oriT* was located upstream of *traK* and consisted of 113 bp. The stability module involves the partitioning genes *parA* and *parC*; however, the *parB* gene was not found. In addition, the toxin-antitoxin genes *phd/doc* and *krfA* gene were identified. The *repA* was part of the replication module, and no iterons or replication origins close to the *repA* gene were found (Figure 1).

The adaptation module contained a class 1 integron carrying *bla_{IMP-56}*, *mda11*, and *bla_{CXA-2}* genes. In addition, the Tn3 family transposon carrying a mercury resistance operon (*merR*, *merT*, *merP*, *merA*, *merD*, and *merE* genes) was located (Figure 1).

3.2. Phylogenetic Analysis of RepA

To infer a possible phylogenetic relationship between pPE52IMP and other plasmids from *P. aeruginosa*, we used RepA to build a phylogenetic tree. For analysis, we included the amino acid sequence of 33 RepA from plasmids carrying antibiotic resistance genes (Table S1) (including RepA of pPE52IMP). The analysis showed a wide diversity of replicases among *P. aeruginosa* plasmids grouped in 11 clades (Figure 2). Furthermore, RepA proteins of plasmids with the same incompatibility group were clustered in the same clade such as IncP-2 (pOZ176, pJB37, pPUV-1), IncP-6 (C79, p10265-KPC, pCOL-1), and IncP-7 (p1160-VIM and pNK546b); however, the incompatibility group of one plasmid within the IncP-7 clade (unnamed1 P8W) was not reported (Figure 2). On the other hand, it is important to note that RepA proteins from pPE52IMP, pMATVIM-7, unnamed1 (FDAARGOS_570), pD5170990, and pMRVIM0713 were in the same clade (Figure 2).

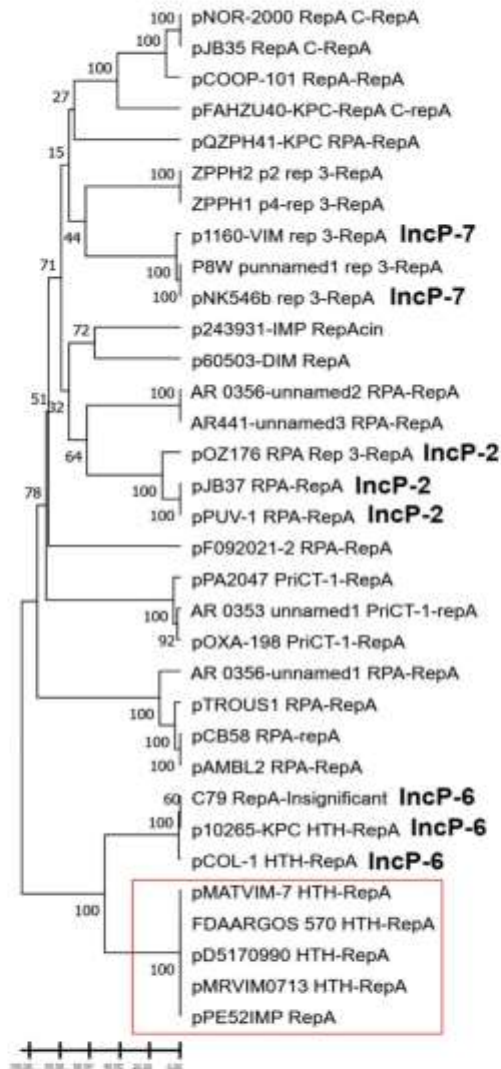


Figure 2. UPGMA phylogenetic tree of replicase A proteins in plasmids carrying resistance genes. The incompatibility groups of the plasmids are in bold type. Replicases in the same clade as pPE52IMP RepA are enclosed in a red box.

3.3. Comparative Analysis of pPE52IMP and Plasmids with Same RepA and Similar Structure

pPE52IMP structure was compared with closed plasmids from the GenBank, which clustered in the same clade of the RepA phylogenetic tree (Figure 2): pMATVIM-7 (GenBank accession no. AM778842.1), plasmid unnamed (GenBank accession no. CP033834.1), pD5170990 (GenBank accession no. KX169264.1), and pMRVIM0713 (GenBank accession no. KP975076.1). In addition, we found the plasmid p4130-KPC (GenBank accession no. MN336501.1) in GenBank, which had a similar backbone to pPE52IMP. However, it

was not included in the phylogenetic analysis because its RepA was truncated, but it was incorporated in the comparative analysis of the structure (Figure 2). These plasmids ranged from 24 kb to approximately 58 kb, and were isolated in the USA, Brazil, and France. The characteristics of these plasmids are shown in Table S2.

The comparative analysis showed that these six plasmids shared a similar backbone, including genes for replication (*repA*), partition (*parA*, *parC*), and transfer (*tra* and *virB4*); however, we found some differences. *traJ*, *traK*, and *kfrA* genes were absent of pD517099. *trbJ* gene in p4130-KPC was interrupted by a transposon, the N-terminus of TraK in pMATVIM-7 is absent, and RepA of p4130-KPC lacks the C-terminus (Figure 3).

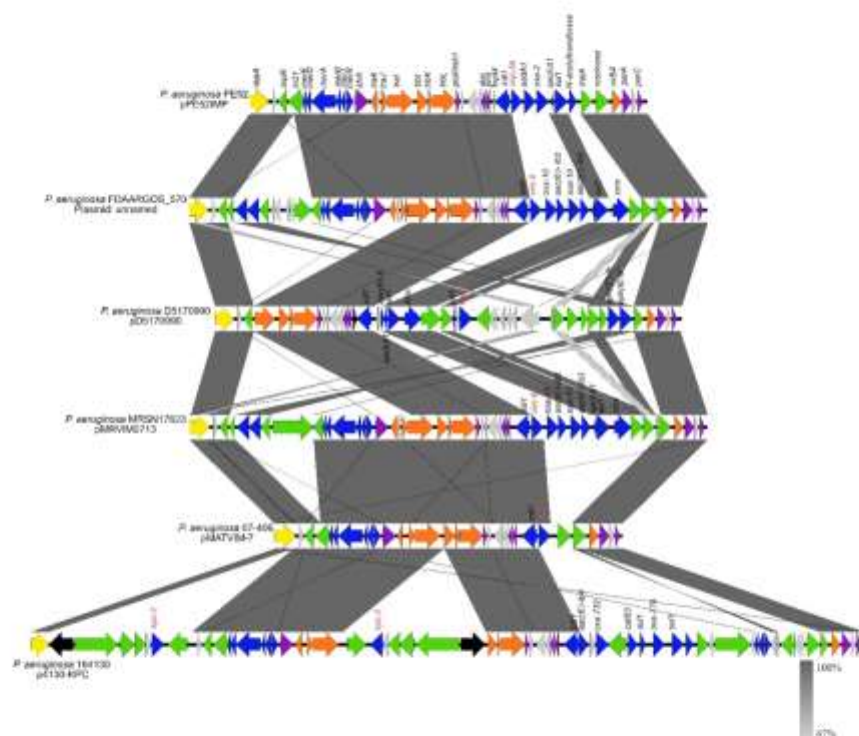


Figure 3. Structural comparison of plasmid pPE52IMP and plasmids with similar backbones and RepA from clinical *P. aeruginosa*. The figure was built with Easyfig. Plasmid modules were represented with different colors. Yellow: replication; purple: stability; orange: mobilization; blue: adaptation; green: transposons; gray: hypothetical proteins; black: other genes. The gray color level indicates the percentage of BLAST identity of the plasmids. Plasmid unnamed (accession no. CP033834.1); pD5170990 (accession no. KX169264.1); pMARVIM0713 (accession no. KP975076.1); pMATVIM-7 (accession no. AM778842.1); p4130-KPC (accession no. MN336501.1).

Figure 3 illustrates that the variable region was found downstream of the *phd* gene and upstream of the resolvase gene and consisted of genes for adaptation such as carbapenemases type *bla*_{IMP-56} (pPE52IMP) and *bla*_{VIM-6} (plasmid unnamed and pMRVIM0713) carried by a class 1 integron, *bla*_{VIM-7} (pMATVIM-7) carried by a partial class 1 integron, *bla*_{KPC-2} (pD5170990) carried by a transposon, and *bla*_{OXA-779}, *bla*_{OXA-732}, and *bla*_{KPC-2} brought by a class 1 integron and a transposon, respectively (p4130-KPC) (Figure 3).

As previously mentioned, pPE52IMP was classified into the MOB_{P11} subfamily [28] but was not classifiable by replicon typing. In silico analysis revealed that plasmids pMATVIM-7, unnamed (FDAARGOS_570), pD5170990, pMRVIM0713, and p4130-KPC were classified into the MOB_{P11} subfamily but were not classifiable according to the replicon typing scheme [26,45]. These plasmids shared some characteristics, such as having a same replicase and similar backbone, and were classified as MOB_{P11}, but were not classifiable by the incompatibility group.

3.4. Plasmids with Similar Backbone as pPE52IMP Present in Other Bacterial Genera

By searching GenBank using the *repA* gene from pPE52IMP, we found two plasmids with the same *repA* and similar backbones in *Achromobacter ruhlandii* (plasmid p138R) and *Serratia marcescens* (plasmid pSMC1). The sizes of the plasmids were 34 and 41.5 kb and they were isolated from Argentina and Japan, respectively (Table 53). Comparing the complete sequence of the plasmids, we determined that these two plasmids shared a conserved backbone with pPE52IMP. Furthermore, we found that almost all backbone genes shared 100% identity and coverage, except for *repA* of p138R, which was truncated, and *tnl* of pSMC1, which shared 97.65% nucleotide similarity and 100% coverage. In addition, the variable region of these plasmids carried different carbapenemases (*bla*_{IMP-1}, *bla*_{CMY-8}) and other resistance genes such as *aac(6')-Ib4* and *aadA2*, commonly found in enterobacteria (Figure S1).

4. Discussion

The emergence of beta-lactamases with activity against carbapenems has compromised the clinical utility of this class of antibiotics [46]. In *P. aeruginosa*, class A and B β-lactamases with carbapenemase activity are reported, including VIM, IMP, SPM, NDM, GIM, GES, and KPC [47,48]. IMP, VIM, NDM, and GES types comprise several variants, whereas only one variant for SPM-1 and GIM-1 have been reported [49]. These enzymes are carried in plasmids, integrons, and transposons, which play an important role in their dissemination [49]. Recently, carbapenemases mobilized by mobile genetic elements in *Pseudomonas aeruginosa* were reviewed and it was found that *bla*_{KPC-2}, *bla*_{VIM-1}, and *bla*_{IMP-45} are carried by plasmids belonging to different incompatibility groups [7]. In addition, other carbapenemases such as *bla*_{VIM-2}, *bla*_{IMP-65}, and *bla*_{IMP-9} are carried by plasmids [18,21,50,51]. Little is known about *P. aeruginosa* plasmids and their role in resistance gene dissemination; therefore, characterizing plasmids will help better understand this dissemination mechanism.

In this work, we determined the structure of the plasmid pPE52IMP carrying *bla*_{IMP-56} (Figure 1), finding that it has lower G+C content (62.2%) than the *P. aeruginosa* chromosome (approximately 66.6%) [52]; however, it is consistent with the GC content reported in other *P. aeruginosa* plasmids (from 45.8% to 63.8%) [25]. A previous study revealed that the average GC content of plasmids was 10% lower than their host's chromosome, which suggests that plasmids with very different GC content could not be maintained in their host [53].

The stability module comprises a partitioning system that contributes to the segregation of the plasmid, an addiction system that ensures the killing of plasmid-free cells, and multimer resolution systems that prevent the formation of plasmid multimers [54]. The partitioning system consists of ATPase (*parA*), centromere-like DNA sequence (*parC*), and DNA-binding protein (*parB*) [55]; the latter is composed of a central HTH DNA binding domain flanked by a C-terminal dimer domain and an N-terminal region necessary for protein oligomerization [56]. In the case of pPE52IMP, we found only the *parA* and *parC* genes, while the *parB* gene was absent, and none of the hypothetical proteins present in the plasmid had domains *parB*-like (Figure 1).

On the other hand, the *kfrA* gene has been shown to act as a transcriptional autoregulator and participates in plasmid stability [57–59], suggesting that this gene could be involved in pPE52IMP stability; however, other studies are necessary to understand how

the segregation process is carried out in this plasmid. In addition, the addiction system is composed of the Doc toxin (death on curing) and Phd antitoxin (prevents host death) (Figure 1) that belongs to type II systems, where the toxin is directly blocked by the antitoxin [60]; besides, this toxin/antitoxin system plays an important role in plasmid stability persistence, programmed cell death, and stress response [61].

Conjugative plasmids carry two sets of genes; the first allows DNA processing (DNA transfer and replication (Dtr) genes), and the second is a membrane-associated mating pair formation (Mpf) complex (a form of type 4 secretion system). In contrast, mobilizable plasmids use the Mpf of another genetic element in the same cell [62,63]. The transfer module of pPE52IMP consists of IncP-like plasmid genes *traK*, *traJ*, and *traI*, which are essential for relaxosome formation, and the conjugative transfer genes *trbJ*, *trbK*, and *trbL* are involved in the formation of the Mpf system; however, the genes *traH* (chaperone activity), *traG* (coupling protein), *traA*, *traB*, *traD*, and *traE* (not essential for conjugation) and the genes *trbCDEFGHI* (necessary for the formation of the Mpf system) are absent in pPE52IMP [64], suggesting that it could be a mobilizable plasmid. Furthermore, the lack of transconjugants in the conjugation experiment reinforces this analysis (data not shown).

Mercury operons comprise mercury resistance-conferring genes (*merEDAPTR*) and are commonly located on transposons and integrons carried by plasmids [65]. pPE52IMP carry the *mer* operon located next to the *tn21* and *tnpR* genes (Figure 1) that are part of transposable elements of the Tn3 family [66].

On the other hand, some authors have used features of the plasmid backbone to design classification schemes such as PCR-based replicon typing (PBRT) [26] and degenerate primer MOB typing (DPMT) [28] based on plasmid replication and mobility functions, respectively [67]. Plasmids of *P. aeruginosa* with a similar backbone to pPE52IMP have a MOB_{P11} subfamily relaxase according to MOB typing [28]; this is consistent with findings reported by Lopez-García [15]. The MOB_{P11} subfamily belongs to the MOBP superfamily, one of the most abundant in plasmids among gammaproteobacterial (including *Pseudomonas*) [68].

pPE52IMP and plasmids with similar backbone could not be classified by PBRT [26], which may be related to the fact that this scheme is focused on classifying plasmids from Enterobacteriaceae but not from other bacterial families. pPE52IMP does not belong to any of the 14 incompatibility groups (IncP-1 to IncP-14) described in *P. aeruginosa*; this is consistent with Shintani et al., 2015 [25], who found that only 21 of 183 *Pseudomonadales* plasmids analyzed could be classified into the IncP group. The above reflects the need to develop a technique to classify *P. aeruginosa* plasmids; however, classifying plasmids using MOB typing could help in some cases.

A classification based on replicase sequence homology was designed by Bertini for *Acinetobacter baumannii* plasmids, identifying 19 homology groups (GRs) [27]. Rep genes that shared at least 74% of identity were in the same group. Other authors have added more groups using the same identity criteria, reporting, to date, 33 GRs [69]. Therefore, we used similar parameters to know the distribution and behavior of RepA in pPE52IMP and plasmids of *Pseudomonas aeruginosa* reported in the GenBank (Table S1 and Figure 2). It is important to highlight that we included only plasmids carrying resistance genes in the analysis. RepA of plasmids belonging to the same incompatibility group (IncP-2, IncP-7, IncP-6) were clustered in three clades, likely because plasmids belonging to the same incompatibility group have the same or related replication/partitioning system [70]. On the other hand, the RepA of pPE52IMP and plasmids with a similar backbone were clustered together in a separated clade, indicating that they are closely related genetically and are probably a new family of plasmids.

According to the information available in the GenBank, the strains of *P. aeruginosa* and the other genera that carried plasmids similar to pPE52IMP were isolated from the USA (mainly), Brazil, France, Argentina, and Japan (Tables S2 and S3), which would indicate that these plasmids are circulating in different countries and acting as vehicles for the dissemination of antibiotic resistance genes.

Closely related plasmids commonly have a core called the “backbone” associated with plasmid-specific functions such as replication initiation, conjugation, and stability. In addition, the backbone can include virulence genes and antibiotic- and heavy metal-resistance genes that confer adaptive advantages to the bacterium [71]. In the analysis of the phylogenetic tree, we found four plasmids of *P. aeruginosa* strains, and one plasmid of a strain reported in the GenBank with a backbone similar to pPE52IMP. In addition, the plasmids had a variable region with carbapenem resistance genes such as *bla*_{VIM-6}, *bla*_{VIM-7}, *bla*_{KPC-2}, and other beta-lactamase encoding genes such as *bla*_{OXA-779}, *bla*_{OXA-732}, and *bla*_{OXA-10} (Table S2 and Figure 3) carried by class 1 integrons and transposons. Our working group reported that pPE52IMP carries *bla*_{IMP-56} in a class 1 integron (GenBank accession no. KY646161) [15]; nevertheless, in this study, we report the structure of the plasmid carrying *bla*_{IMP-56}, which belongs to a new family of plasmids.

Plasmids with a conserved backbone carrying resistance genes inserted into hotspot sites have been reported, and the *repA* gene serves as a hotspot in some of them [72–74]. However, in the plasmids analyzed, the resistance genes are inserted between *phd* and a resolvase gene so that it could be a potential hotspot for integrating the resistance genes in these plasmids, but more studies are necessary.

We also found two plasmids with backbone similar to pPE52IMP in bacteria not closely related to *P. aeruginosa*, such as p138R from *A. ruhlandii*, and pSMC1 from *S. marcescens* (Table S3 and Figure S1). These plasmids carried the *nadA1*, *nac(6′)-lb4* acetylase, *bla*_{CMY-8}, and *bla*_{IMP-1} genes. These observations could indicate that plasmids of this type could be of a broad host range [73], allowing the dissemination of resistance genes between bacteria different from *P. aeruginosa*. However, transformation experiments with hosts of other bacterial genera are needed to confirm the host range of this plasmid.

5. Conclusions

In this study, we described a new family of plasmids carrying resistance genes with the same RepA, a similar backbone, and belonging to the MOB_{F11} subfamily in *P. aeruginosa*. In addition, we characterized the first plasmid harboring *bla*_{IMP-56} (pPE52IMP), isolated from a Mexican hospital, belonging to this family. This study contributes to understanding how these plasmids encoding carbapenemases spread among bacteria.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms10091863/s1>, Table S1: Characteristics of the plasmids included in the phylogenetic tree of the RepA proteins. Table S2: Characteristics of *P. aeruginosa* plasmids with similar structure to pPE52IMP. Table S3: Characteristics of plasmids from other bacterial genera with similar structure to pPE52IMP. Figure S1: Comparison of pPE52IMP with plasmids from other bacterial genera with a similar backbone.

Author Contributions: Conceptualization, P.L.-Z., J.G.-M. and Y.S.; methodology, J.G.-M., A.L.-G., G.J.-F. and M.C.-L.; software, E.B.-L. and M.A.C.; investigation, J.G.-M., P.L.-Z. and R.d.C.R.-G.; resources, P.L.-Z. and R.d.C.R.-G.; writing—original draft preparation, J.G.-M., P.L.-Z., and R.d.C.R.-G.; writing—review and editing, P.L.-Z., R.d.C.R.-G., G.C.-C. and E.B.-L.; supervision, P.L.-Z. and R.d.C.R.-G.; project administration, P.L.-Z. and R.d.C.R.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by 100031833/VIIEP2019, VIIEP/CONACyT2497/16, and 100031833/VIIEP2020.

Data Availability Statement: *P. aeruginosa* PE52 strain was recovered from routine culture and informed patient consent was not required. The protocol to perform this study was approved by the Ethical Committee of Hospital Regional del ISSSTE, Puebla, under number 188-2018.

Acknowledgments: We would like to thank Margarita Maria de la Paz Arenas-Hernández from Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, BUAP, and Edwin Barrios Villa from Universidad de Sonora, Campus Caborca, for their kind help during the study. J.G.-M received doctoral fellowships from CONACyT México with CVU number 613250. This work was supported by 100031833/VIIEP2019, VIIEP/CONACyT2497/16, and 100031833/VIIEP2020.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Moradali, M.F.; Ghods, S.; Rehm, B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 39. [CrossRef] [PubMed]
- Pang, Z.; Raudonis, R.; Glick, B.R.; Lin, T.J.; Cheng, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 177–192. [CrossRef] [PubMed]
- Hu, Y.Y.; Wang, Q.; Sun, Q.L.; Chen, G.X.; Zhang, R. A novel plasmid carrying carbapenem-resistant gene blaKPC-2 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *12*, 1285–1288. [CrossRef] [PubMed]
- Tacconelli, E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; Harbarth, S.; Mendelson, M.; Monnet, D.L.; Pulcini, C.; Kahlmeter, G.; Kluytmans, J.; Carmeli, Y.; et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 318–327. [CrossRef]
- Ruiz-Garbajosa, P.; Cantón, R. Epidemiology of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Implications for empiric and definitive therapy. *Rev. Esp. Quimioter.* **2017**, *30* (Suppl. 1), 8–12. [PubMed]
- Botelho, J.; Grosso, F.; Peixe, L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*—Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist. Updat.* **2019**, *44*, 100640. [CrossRef] [PubMed]
- Yoon, E.J.; Jeong, S.H. Mobile carbapenemase genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 614058. [CrossRef]
- Naas, T.; Oueslati, S.; Bonnin, R.A.; Dabos, M.L.; Zavala, A.; Dortet, L.; Retailleau, P.; Iorga, B.I. Beta-lactamase database (BLDB)—structure and function. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32*, 917–919. [CrossRef]
- Hanson, N.D.; Hossain, A.; Buck, L.; Moland, E.S.; Thomson, K.S. First occurrence of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in the United States producing an IMP metallo- β -lactamase, IMP-18. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 2272–2273. [CrossRef]
- Garza-Ramos, U.; Tinoco, P.; Silva-Sanchez, J.; Morfin-Otero, R.; Rodriguez-Noriega, E.; Leon-Garnica, G.; Sader, H.S.; Jones, R.N. Metallo- β -lactamase IMP-18 is located in a class 1 integron (In96) in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa* from Mexico. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2008**, *31*, 78–80. [CrossRef]
- Sánchez-Martínez, G.; Garza-Ramos, U.J.; Reyna-Flores, F.L.; Gaytán-Martínez, J.; Lorenzo-Bautista, I.G.; Silva-Sanchez, J. In 169, A New Class 1 Integron that Encoded blaIMP-18 in a Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolate from Mexico. *Arch. Med. Res.* **2010**, *41*, 235–239. [CrossRef]
- Wolter, D.J.; Khalaf, N.; Robledo, I.E.; Vázquez, J.G.; Santé, I.M.; Aquino, E.E.; Goering, R.V.; Hanson, N.D. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: Dissemination of KPC and IMP-18 β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 1660–1664. [CrossRef]
- Hocquet, D.; Plésiat, P.; Dehecq, B.; Mariotte, P.; Talon, D.; Bertrand, X. Nationwide investigation of extended-spectrum β -lactamases, metallo- β -lactamases, and extended-spectrum oxacillinases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 3512–3515. [CrossRef]
- Martínez, T.; Vázquez, G.J.; Aquino, E.E.; Ramírez-Ronda, R.; Robledo, I.E. First report of a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate co-harboring KPC-2 and IMP-18 carbapenemases. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2012**, *39*, 542–543. [CrossRef]
- López-García, A.; del Carmen Rocha-Gracia, R.; Bello-López, E.; Juárez-Zelocualtecal, C.; Sáenz, Y.; Castañeda-Lucio, M.; López-Pliego, L.; Cristina González-Vázquez, M.; Torres, C.; Ayala-Núñez, T.; et al. Characterization of antimicrobial resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying IMP variants recovered from a Mexican hospital. *Infect Drug Resist* **2018**, *11*, 1523–1536. [CrossRef]
- Zhao, W.H.; Hu, Z.Q. IMP-type metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli: Distribution, phylogeny, and association with integrons. *Crit. Rev. Microbiol.* **2011**, *37*, 214–226. [CrossRef]
- Hong, D.J.; Bae, I.K.; Jang, I.H.; Jeong, S.H.; Kang, H.K.; Lee, K. Epidemiology and characteristics of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother.* **2015**, *47*, 81–97. [CrossRef]
- Xiong, J.; Alexander, D.C.; Jennifer, H.M.; Dérasp, M.; Low, D.E.; Jamieson, F.B.; Roy, P.H. Complete sequence of pOZ176, a 500-kilobase IncP-2 plasmid encoding imp-9-mediated carbapenem resistance, from outbreak isolate *Pseudomonas aeruginosa* 96. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 3775–3782. [CrossRef]
- San Millán, A.; Toll-Riera, M.; Escudero, J.A.; Cantón, R.; Coque, T.M.; Craig MacLean, R. Sequencing of plasmids pAMBL1 and pAMBL2 from *Pseudomonas aeruginosa* reveals a blaVIM-1 amplification causing high-level carbapenem resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70*, 3000–3003. [CrossRef]
- Feng, W.; Zhou, D.; Wang, Q.; Luo, W.; Zhang, D.; Sun, Q.; Tong, Y.; Chen, W.; Sun, F.; Xia, P. Dissemination of IMP-4-encoding pIMP-HZ1-related plasmids among *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in a Chinese teaching hospital. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33419. [CrossRef]
- Botelho, J.; Grosso, F.; Peixe, L. Characterization of the pJB12 plasmid from *Pseudomonas aeruginosa* reveals Tn6352, a novel putative transposon associated with mobilization of the blaVIM-2-harboring In58 integron. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e02532-16. [CrossRef]
- Elena, A.; Quinteros, M.; di Conza, J.; Gutkind, G.; Cejas, D.; Radice, M.A. Full characterization of an IncR plasmid harboring qnrS1 recovered from a VIM-11-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Argent. Microbiol.* **2020**, *52*, 298–304. [CrossRef]
- Dai, X.; Zhou, D.; Xiong, W.; Feng, J.; Luo, W.; Luo, G.; Wang, H.; Sun, F.; Zhou, X. The IncP-6 plasmid p10265-KPC from *Pseudomonas aeruginosa* carries a novel Δ ISEc33-associated blaKPC-2 gene cluster. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 310. [CrossRef]

24. Yuan, M.; Guan, H.; Sha, D.; Cao, W.; Song, X.; Che, J.; Kan, B.; Li, J. Characterization of blaKPC-2-carrying plasmid pR31-kpc from a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated in china. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1234. [CrossRef]
25. Shintani, M.; Sanchez, Z.K.; Kimbara, K. Genomics of microbial plasmids: Classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 242. [CrossRef]
26. Carattoli, A.; Bertini, A.; Villa, L.; Falbo, V.; Hopkins, K.L.; Threlfall, E.J. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* **2005**, *63*, 219–228. [CrossRef]
27. Bertini, A.; Poirel, L.; Mugnier, P.D.; Villa, L.; Nordmann, P.; Carattoli, A. Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 4168–4177. [CrossRef]
28. Alvarado, A.; Garcillán-Barcia, M.P.; de la Cruz, F. A Degenerate Primer MOB Typing (DPMT) Method to Classify Gamma-Proteobacterial Plasmids in Clinical and Environmental Settings. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e40438. [CrossRef] [PubMed]
29. Zhang, Y.; Meng, L.; Guan, C.; Zhou, Y.; Peng, J.; Liang, H. Genomic characterisation of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolate PAG5 with a multidrug-resistant megaplasmid from China. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2020**, *21*, 130–131. [CrossRef] [PubMed]
30. SNPsaurus | GENOMES to GENOTYPES. Available online: <https://www.snpsaurus.com/> (accessed on 31 January 2021).
31. Andrews, S. FastQC—A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Available online: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed on 28 February 2021).
32. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Available online: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed on 6 June 2021).
33. Vielva, L.; de Toro, M.; Lanza, V.F.; de La Cruz, F. PLACNETw: A web-based tool for plasmid reconstruction from bacterial genomes. *Bioinformatics* **2017**, *33*, 3796–3798. [CrossRef] [PubMed]
34. Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulkov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Pribelski, A.D.; et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* **2012**, *19*, 455–477. [CrossRef]
35. Aziz, R.K.; Bartels, D.; Best, A.; DeJongh, M.; Disz, T.; Edwards, R.A.; Formsma, K.; Gerdes, S.; Glass, E.M.; Kubal, M.; et al. The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genom.* **2008**, *9*, 75. [CrossRef]
36. Proksee. Available online: <https://proksee.ca/projects/new> (accessed on 6 August 2021).
37. Li, X.; Xie, Y.; Liu, M.; Tai, C.; Sun, J.; Deng, Z.; Ou, H.Y. OriTfinder: A web-based tool for the identification of origin of transfers in DNA sequences of bacterial mobile genetic elements. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W229–W234. [CrossRef]
38. Garcillán-Barcia, M.P.; Redondo-Salvo, S.; Vielva, L.; de la Cruz, F. MOBscan: Automated Annotation of MOB Relaxases. *Methods Mol. Biol.* **2020**, *2075*, 295–308. [CrossRef]
39. Carattoli, A.; Zankari, E.; García-Fernández, A.; Larsen, M.V.; Lund, O.; Villa, L.; Aarestrup, F.M.; Hasman, H. In Silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 3895–3903. [CrossRef]
40. Zankari, E.; Hasman, H.; Cosentino, S.; Vestergaard, M.; Rasmussen, S.; Lund, O.; Aarestrup, F.M.; Larsen, M.V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 2640–2644. [CrossRef]
41. Finn, R.D.; Mistry, J.; Tate, J.; Coggill, P.; Heger, A.; Pollington, J.E.; Gavin, O.L.; Gunasekaran, P.; Ceric, G.; Forslund, K.; et al. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *38*, D211–D222. [CrossRef]
42. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 3022–3027. [CrossRef]
43. Darling, A.C.E.; Mau, B.; Blattner, F.R.; Perna, N.T. Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res.* **2004**, *14*, 1394–1403. [CrossRef]
44. Sullivan, M.J.; Petty, N.K.; Beatson, S.A. Easyfig: A genome comparison visualizer. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 1009–1010. [CrossRef]
45. Villa, L.; García-Fernández, A.; Fortini, D.; Carattoli, A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, *65*, 2518–2529. [CrossRef]
46. Nagshetty, K.; Shilpa, B.M.; Patil, S.A.; Shivannavar, C.T.; Manjula, N.G. An Overview of Extended Spectrum Beta Lactamases and Metallo Beta Lactamases. *Adv. Microbiol.* **2021**, *11*, 37–62. [CrossRef]
47. Oliver, A.; Mulet, X.; López-Causapé, C.; Juan, C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist. Updat.* **2015**, *21*–22, 41–59. [CrossRef]
48. Tenover, F.C.; Nicolau, D.P.; Gill, C.M. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* –an emerging challenge. *Emerg. Microbes Infect.* **2022**, *11*, 811–814. [CrossRef]
49. Bassetti, M.; Vena, A.; Croxatto, A.; Righi, E.; Guery, B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs Context* **2018**, *7*, 212527. [CrossRef]
50. Poirel, L.; Naas, T.; Nicolas, D.; Collet, L.; Bellais, S.; Cavallo, J.D.; Nordmann, P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 891–897. [CrossRef]
51. Yano, H.; Kuga, A.; Okamoto, R.; Kitasato, H.; Kobayashi, T.; Inoue, M. Plasmid-encoded metallo- β -lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 1343–1348. [CrossRef]
52. Kung, V.L.; Ozer, E.A.; Hauser, A.R. The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 621–641. [CrossRef] [PubMed]
53. Nishida, H. Comparative Analyses of Base Compositions, DNA Sizes, and Dinucleotide Frequency Profiles in Archaeal and Bacterial Chromosomes and Plasmids. *Int. J. Evol. Biol.* **2012**, *2012*, 1–5. [CrossRef] [PubMed]

54. Norman, A.; Hansen, L.H.; Sørensen, S.J. Conjugative plasmids: Vessels of the communal gene pool. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2009**, *364*, 2275–2289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Kawalek, A.; Wawrzyniak, P.; Bartosik, A.A.; Jagura-Burdzy, G. Rules and exceptions: The role of chromosomal ParB in DNA segregation and other cellular processes. *Microorganisms* **2020**, *8*, 105. [[CrossRef](#)]
56. Funnell, B.E. ParB partition proteins: Complex formation and spreading at bacterial and plasmid centromeres. *Front. Mol. Biosci.* **2016**, *3*, 44. [[CrossRef](#)]
57. Adamczyk, M.; Dolowy, P.; Jonczyk, M.; Thomas, C.M.; Jagura-Burdzy, G. The *kfrA* gene is the first in a tricistronic operon required for survival of IncP-1 plasmid R751. *Microbiology* **2006**, *152*, 1621–1637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Adamczyk, M.; Lewicka, E.; Szatkowska, R.; Nieznanska, H.; Ludwiczak, J.; Jasiński, M.; Dumini-Horkawicz, S.; Sitkiewicz, E.; Swiderska, B.; Goch, G.; et al. Revealing biophysical properties of KfrA-type proteins as a novel class of cytoskeletal, coiled-coil plasmid-encoded proteins. *BMC Microbiol.* **2021**, *21*, 32. [[CrossRef](#)]
59. Lewicka, E.; Mitura, M.; Steczkiewicz, K.; Kieracinska, J.; Skrzynska, K.; Adamczyk, M.; Jagura-Burdzy, G. Unique Properties of the Alpha-Helical DNA-Binding Protein KfrA Encoded by the IncU Incompatibility Group Plasmid RA3 and Its Host-Dependent Role in Plasmid Maintenance. *Appl. Environ. Microbiol.* **2021**, *87*, e01771–20. [[CrossRef](#)]
60. Fernández-García, L.; Blasco, L.; Lopez, M.; Bou, G.; Garcia-Contreras, R.; Wood, T.; Tomas, M. Toxin-antitoxin systems in clinical pathogens. *Toxins* **2016**, *8*, 227. [[CrossRef](#)]
61. Yang, Q.E.; Walsh, T.R. Toxin-antitoxin systems and their role in disseminating and maintaining antimicrobial resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, 343–353. [[CrossRef](#)]
62. Smillie, C.; Garcillán-Barcia, M.P.; Francia, M.V.; Rocha, E.P.; de la Cruz, F. Mobility of Plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 1092–2172. [[CrossRef](#)]
63. Costa, T.R.D.; Harb, L.; Khara, P.; Zeng, L.; Hu, B.; Christie, P.J. Type IV secretion systems: Advances in structure, function, and activation. *Mol. Microbiol.* **2021**, *115*, 436–452. [[CrossRef](#)]
64. Adamczyk, M.; Jagura-Burdzy, G. Spread and survival of promiscuous IncP-1 plasmids. *Acta Biochim. Pol.* **2003**, *50*, 425–453. [[CrossRef](#)]
65. Nascimento, A.M.A.; Chartone-Souza, E.; Nascimento, A.M.A.; Chartone-Souza, E. Operon mer: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genet. Mol. Res.* **2003**, *2*, 92–101. [[PubMed](#)]
66. Ng, S.P.; Davis, B.; Palombo, E.A.; Bhave, M. A Trn5051-like mer-containing transposon identified in a heavy metal tolerant strain *Acinetobacter* sp. AO22. *BMC Res. Notes* **2009**, *2*, 38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Orlek, A.; Stoesser, N.; Anjum, M.F.; Doumith, M.; Ellington, M.J.; Peto, T.; Crook, D.; Woodford, N.; Sarah Walker, A.; Phan, H.; et al. Plasmid classification in an era of whole-genome sequencing: Application in studies of antibiotic resistance epidemiology. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 182. [[CrossRef](#)]
68. Garcillán-Barcia, M.P.; de la Cruz, F. Ordering the bestiary of genetic elements transmissible by conjugation. *Mob. Genet. Elements* **2013**, *3*, e24263. [[CrossRef](#)]
69. Salgado-Camargo, A.D.; Castro-Jaimes, S.; Gutierrez-Rios, R.M.; Lozano, L.F.; Altamirano-Pacheco, L.; Silva-Sanchez, J.; Pérez-Oseguera, Á.; Volkow, P.; Castillo-Ramírez, S.; Cevallos, M.A. Structure and Evolution of *Acinetobacter baumannii* Plasmids. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1283. [[CrossRef](#)]
70. Thomas, C.M. Plasmid Incompatibility. In *Molecular Life Sciences*; Bell, E., Ed.; Springer: New York, NY, USA, 2014; pp. 1–3.
71. Norberg, P.; Bergström, M.; Jethava, V.; Dubhashi, D.; Hermansson, M. The IncP-1 plasmid backbone adapts to different host bacterial species and evolves through homologous recombination. *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 268. [[CrossRef](#)]
72. Naas, T.; Bonnin, R.A.; Cuzon, G.; Villegas, M.V.; Nordmann, P. Complete sequence of two KPC-harboring plasmids from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68*, 1757–1762. [[CrossRef](#)]
73. Jain, A.; Srivastava, P. Broad host range plasmids. *FEMS Microbiol. Lett.* **2013**, *348*, 87–96. [[CrossRef](#)]
74. Bonnin, R.A.; Nordmann, P.; Carattoli, A.; Poirel, L. Comparative genomics of IncL/M-type plasmids: Evolution by acquisition of resistance genes and insertion sequences. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 674–676. [[CrossRef](#)]



Article

Comparative Genomics of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Different Ecological Niches

Jessica Gómez-Martínez ¹, Rosa del Carmen Rocha-Gracia ¹, Elena Bello-López ², Miguel Angel Cevallos ², Miguel Castañeda-Lucio ¹, Yolanda Sáenz ³, Guadalupe Jiménez-Flores ⁴, Gerardo Cortés-Cortés ⁵, Alma López-García ¹ and Patricia Lozano-Zarain ^{1,*}

¹ Posgrado en Microbiología, Centro de Investigaciones de Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, México;

jessica.gomezmar@alumno.buap.mx (J.G.-M.); rosa.rocha@correo.buap.mx (R.d.C.R.-G.);

miguel.castaneda@correo.buap.mx (M.C.-L.); alma.lopez@correo.buap.mx (A.L.-G.)

² Programa de Genómica Evolutiva, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca 62210, México; bellolop@ccg.unam.mx (E.B.-L.); mac@ccg.unam.mx (M.A.C.)

³ Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), 26006 Logroño, Spain; ysaenz@riojasalud.es

⁴ Laboratorio Clínico, Área de Microbiología, Hospital Regional Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, Puebla 72570, México; lupitajf@live.com.mx

⁵ Department of Microbiology and Environmental Toxicology, University of California at Santa Cruz, Santa Cruz, CA 95064, USA; gcortesc@ucsc.edu

* Correspondence: patricia.lozano@correo.buap.mx; Tel: +52-222-2-29-55-00 (ext. 2543)



Citation: Gómez-Martínez, J.; Rocha-Gracia, R.d.C.; Bello-López, E.; Cevallos, M.A.; Castañeda-Lucio, M.; Sáenz, Y.; Jiménez-Flores, G.; Cortés-Cortés, G.; López-García, A.; Lozano-Zarain, P. Comparative Genomics of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Different Ecological Niches. *Antibiotics* **2023**, *12*, 866. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050866>

Academic Editors: Siomar De Castro Soares, Vasco Ariston De Carvalho Azevedo, Arun Kumar Jaiswal, Sandeep Tiwari and Flávia Figueira Albuquerque

Received: 9 March 2023

Revised: 27 April 2023

Accepted: 4 May 2023

Published: 7 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The *Pseudomonas aeruginosa* genome can change to adapt to different ecological niches. We compared four genomes from a Mexican hospital and 59 genomes from GenBank from different niches, such as urine, sputum, and environmental. The ST analysis showed that high-risk STs (ST235, ST773, and ST27) were present in the genomes of the three niches from GenBank, and the STs of Mexican genomes (ST167, ST2731, and ST549) differed from the GenBank genomes. Phylogenetic analysis showed that the genomes were clustering according to their ST and not their niche. When analyzing the genomic content, we observed that environmental genomes had genes involved in adapting to the environment not found in the clinics and that their mechanisms of resistance were mutations in antibiotic resistance-related genes. In contrast, clinical genomes from GenBank had resistance genes, in mobile/mobilizable genetic elements in the chromosome, except for the Mexican genomes that carried them mostly in plasmids. This was related to the presence of CRISPR-Cas and anti-CRISPR; however, Mexican strains only had plasmids and CRISPR-Cas. *bla*_{COXA-488} (a variant of *bla*_{COXA-50}) with higher activity against carbapenems was more prevalent in sputum genomes. The virulome analysis showed that *exoS* was most prevalent in the genomes of urinary samples and *exoU* and *pldA* in sputum samples. This study provides evidence regarding the genetic variability among *P. aeruginosa* isolated from different niches.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; antimicrobial resistance; ecological niches; comparative genomic

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous Gram-negative bacterium that can survive in different environments such as soil, food, and hospitals [1,2]. This opportunistic pathogen is the leading cause of nosocomial infections such as ventilator-associated pneumonia, catheter-associated urinary tract infections, bloodstream infections, and surgical site infections [3].

P. aeruginosa infections are difficult to treat because this bacterium has developed resistance to many antibiotics. As a result, it has been included as one of three bacterial species on the list of “priority pathogens” urgently requiring the development of new antibiotics by the World Health Organization [4]. Many factors are responsible for the

multidrug resistance (MDR) of *P. aeruginosa*, such as low outer-membrane permeability, production of beta-lactamases, chromosomal DNA mutations, and acquisition of resistance genes through mobile genetic elements [5,6].

The pathophysiology of the infections caused by *P. aeruginosa* involves several mechanisms, including adhesion, invasion, evasion of the immune response, and antibiotic resistance, making these infections difficult to treat [7]. Furthermore, the persistence of *P. aeruginosa* in infections is also related to its MDR as well as its virulence. The latter is exhibited as a result of the production of a wide variety of virulence factors, including, lipopolysaccharide, flagella, type IV pili, elastase (LasA, LasB), various exotoxins (ExoY, ExoS, ExoT, ExoU), alkaline protease, phospholipases, small molecules (phenazines, rhamnolipids and cyanide) and siderophores (pyoverdine and pyochelin), which are regulated by cell-to-cell signaling systems [8]. Some studies have reported that the genes associated with virulence are highly conserved among *P. aeruginosa* strains; however, variations in the presence of *exoU* and *exoS* genes (cytotoxins secreted by the type III secretion system) have been reported in some strains because these are acquired by horizontal transfer [9,10].

The genome size of *P. aeruginosa* ranges from 5.5 to 7 Mbp, which is relatively large compared to other bacterial genera [11]. Additionally, *P. aeruginosa* exhibits a mosaic structure composed of conserved genes in all strains, regardless of their origin (clinical or environmental), and variable accessory genes between strains, which are involved in adaptation to different ecological niches. Other authors have suggested that the content of the accessory genome determines environmental adaptability [11–13]. However, most studies have focused on strains isolated from eye and cystic fibrosis infections [14,15]. The authors report that these studies were conducted because *P. aeruginosa* plays an important role in cystic fibrosis infections, whereby, these types of strains have been extensively sequenced [14,15].

Mathee et al. compared the genomes of two strains of *P. aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients and three reference strains, establishing evidence that *P. aeruginosa* modifies its genomic composition to allow expansion and adaptability to different niches [14]. Another study comparing the genomes of *P. aeruginosa* strains isolated from ocular infection with reference strains suggested that the acquisition of resistance and virulence genes (*exoU*) through horizontal gene transfer (HGT) could play an important role in adaptation and pathogenesis in humans [16]. In 2018, Subedi, proposed that genomic diversity not only exists between strains isolated from different anatomical sites (eye and cystic fibrosis) but also between strains isolated from different geographical locations [15]. On the other hand, Dettman and Kassen (2020) studied strains from four unique ecological niches (environment, animal and human infections, and infections from patients with cystic fibrosis). They proposed that strains recovered from any ecological niche can adapt and develop to cause an infection in patients with cystic fibrosis [17].

In this study, we compare genomes of four strains isolated from urine and sputum samples from a hospital in Mexico with genomes from the GenBank database of three sources of isolation (urinary tract, sputum, and environmental) to identify resistance genes, mobile genetic elements, and virulence genes and to explore relationships among them despite their unique niches.

2. Results

2.1. General Features of the Genomes

The results of the de novo assemblies of strains PE21, PE52, PE63, and PE83 from the Mexican Hospital are shown in Supplementary Table S1. We found an average G+C content of 65.9% and genome sizes ranging from 6,235,658 to 7,388,095 bp (Supplementary Table S1). In contrast, the average genome sizes of urinary, sputum, and environmental strains (from different countries) from the GenBank database were 6,831,303 bp, 7,013,391 bp, and 6,627,270 bp, respectively (Table S2). Furthermore, it is important to highlight that the genome size of the PE21 strain is larger than the genomes in GenBank.

2.2. Multilocus Sequence Typing (MLST)

The strains isolated from a Mexican hospital had the following STs: PE21 and PE83 belonged to ST167, while PE52 and PE63 belonged to ST2731 and ST549, respectively (Table S2). Therefore, we investigated the clonal relationship between these STs and high-risk STs, and none of these were high-risk.

We observed different ST distributions between clinical (urinary and sputum) and environmental genomes. High-risk ST235 and ST773 (3 and 3 genomes, respectively) were found in urine-derived genomes. In sputum-derived genomes, we found ST235 and ST357 (4 and 3, respectively). On the other hand, ST27 (high-risk clone) and ST316 were found in environmental genomes (3 genomes each). It is important to highlight that ST235 and ST773 were exclusively found in clinical genomes, while ST27 was found only in environmental genomes (Figure S1). Lastly, one environmental genome (L10) belonged to ST253, which is the same ST as the reference strain and highly virulent PA14.

2.3. Genomic Comparison of Strains Recovered from Mexican Hospital

Pangenome analysis with Roary of PE21 isolated from sputum and PE52, PE63, and PE83 isolated from urine identified a total of 7793 genes, of which 5327 genes belong to the core, 0 to the soft core, 2466 to shell genes, and 0 to cloud genes, based on the classification given by Collins and Higgs, 2012 [18]. We also identified the number of shared and unique genes among the genomes of the strains using a Venn diagram (Figure 1). The results showed that strain PE83 shared 1068 genes with strain PE21, while strain PE63 shared 141 genes with the reference strain PAO1. In contrast, PE21, PE52, and PE83 shared one, four, and zero genes, respectively, with the strain PAO1 (Figure 1).

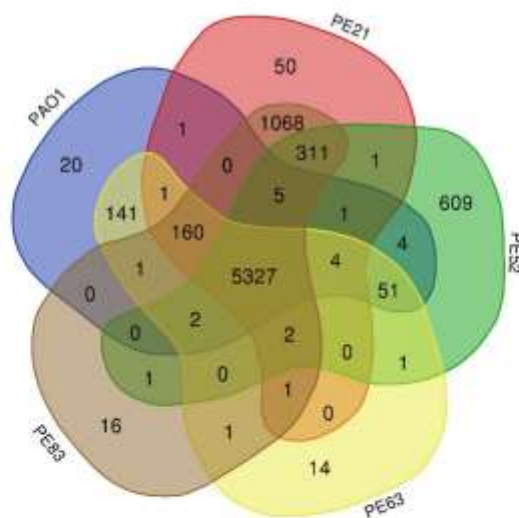


Figure 1. Genomic comparison of *P. aeruginosa* strains. The pan-genome analysis by Roary predicted the number of genes. The figure was created using Calculate and Draw Custom Venn Diagrams. The Venn diagram shows the number of unique and shared genes among the genomes of five strains: PAO1, PE21, PE52, PE63, and PE83 from the Mexican hospital.

On the other hand, the PE52 strain carried the most significant number of unique genes (609 genes), including some genes that shape the conjugation machinery (*trnC*, *virB11*, *virB4*, *virB10*, *mobA*), resistance to quaternary ammonium compounds genes (*sugE*), nickel and cobalt resistance genes (*ctrA*), bleomycin resistance genes (*ble*), toxin and antitoxin genes

(*colM*, *parD1*, *ylmV*), genes required for vibriobactin utilization (*viuB*), ATP-dependent DNA helicase gene (*pcrA*), and a large number of hypothetical proteins ($n = 491$ (80.6%)).

2.4. Analysis of the Pan-Genome of the Strains from the Mexican Hospital and of the GenBank

The pangenome analysis identified a total of 20,911 pan-genes, of which 4246 were core genes (genes present in 99–100% of the genomes), 898 were soft core genes (genes present in 95–99% of the genomes), 1709 were shell genes (genes present in 15–95% of the genomes), and 14,058 were cloud genes (genes present in 0–15% of the genomes) (Figure 2).

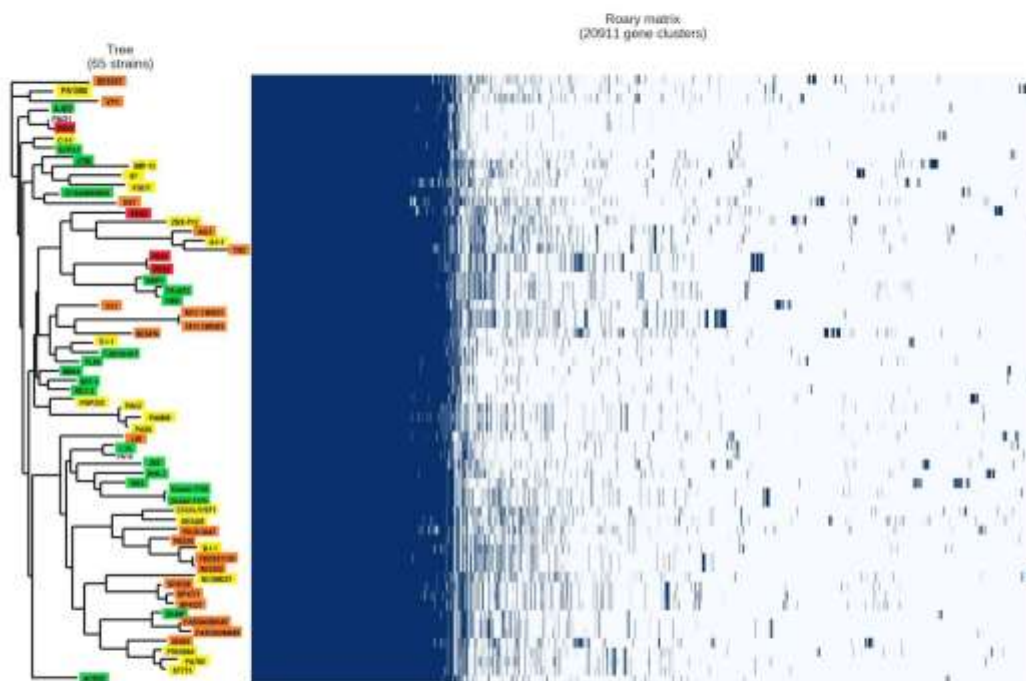


Figure 2. Graphical representation of the pangenome analysis of the 65 strains. The phylogenetic tree was constructed based on the accessory genomes of the sixty-five strains. Strain names were colored according to the isolation source. Yellow: urinary genomes; orange: sputum genomes; green: environmental genomes; red: Mexican genomes; reference genomes are in black.

The dendrogram based on the accessory genome shows the clustering of the genomes belonging to the same ST but from different niches (Figures 2 and S2). Two exceptions were found: one genome belonging to ST111 (F5677) was clustered in a clade with different ST, and the genomes with ST234 (97 and AJD2) were not clustered in the same clade (Figures 2 and S2). This was also found in the phylogenetic trees based on the core genome, SNPs, and MLST (Figures S3–S5).

The genome of PPF-1 (ST unknown) was clustered with ST316 genomes (Figures S3–S5), and we found that the ST of PPF-1 varied only in one allele compared to ST316 (*aroE_13* and *aroE_8*, respectively).

It is important to highlight that our analysis revealed that the genomes of environmental strains (HS9, DN1, JB2, JT86, N17-1, and SJTD-1) had genes in the soft core that some clinical strains do not have. These genes could be related to the survival of *P. aeruginosa* in the environment, such as genes of p-hydroxybenzoic acid efflux pump, methyl-accepting

chemotaxis protein (*pctB*), serine/threonine protein kinase (*rdoA*), nitrite reductase, alkanesulfonate monooxygenase, multidrug/solvent efflux pump outer membrane protein (*mepC*), lactose transport system permease protein (*lacF*), glycogen synthase.

2.5. Antibiotic Resistance Genes

We screened the genomes of the strains to detect antibiotic-resistance genes. The genes *bla*_{OXA-50} and *bla*_{PAO}, which confer beta-lactam resistance, *fosA* to fosfomycin, and *aph(3)-Ib* to aminoglycoside, were identified in all genomes studied, including the reference strains PAO1, PA14 (Figure 3). However, the *catB7* gene that confers resistance to chloramphenicol was found in all genomes except for the genomes B-1-1 and 60,503 (Figure 3).

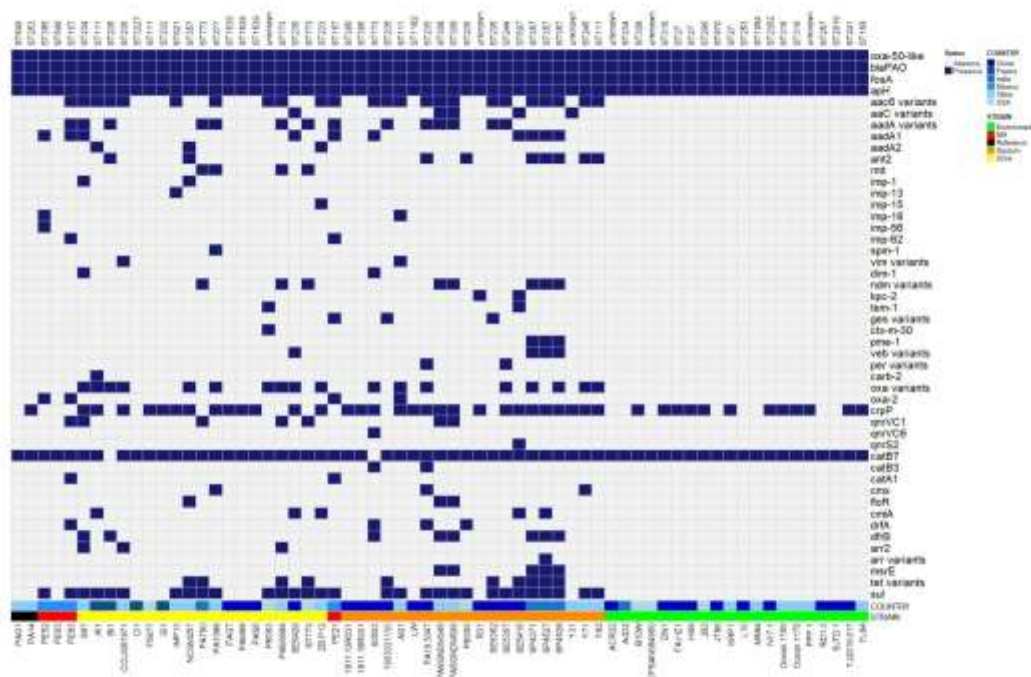


Figure 3. Presence and absence of resistance genes in urinary, sputum, and environmental genomes. Representation of resistance genes present and absent in the 65 genomes from urinary, sputum, and environmental. *P. aeruginosa* PAO1 and PA14 were used for comparison. ResFinder detected a total of 47 genes. The heatmap was constructed with the Bioconductor package in Rstudio. MH means Mexican Hospital.

Because *bla*_{OXA-50} was present in all genomes, an analysis of the variants of this family was carried out. We found that the most common variants in the urinary and environmental strains were *bla*_{OXA-50} and *bla*_{OXA-494}, respectively, and *bla*_{OXA-488} was the most common in sputum genomes (Figure S6).

On the other hand, we found genes encoding antibiotic resistance only in urinary genomes, such as *bla*_{SPM-1}, *bla*_{CARB-2}, and *bla*_{CTX-M-30}, which confer beta-lactam resistance, and *arr2* and *arr7*, which confer rifampicin resistance. Additionally, we found variants of *aadA2* and *rmt* (*rmtB4*, *rmtB4*, *rmtB4*, *rmtD1*) that confer aminoglycoside resistance (Figure 3). Furthermore, we identified unique genes in sputum genomes, such as *bla*_{KPC-2}, *bla*_{CES}, *bla*_{PME}, and *bla*_{PER}, which confers beta-lactam resistance, *catB3*, which confer chlo-

ramphenicol resistance; *rrr3* (rifampicin resistance); *msrE* (erythromycin resistance); *qnrVC6*, *qnrS2* (quinolone resistance); *aac(2)-Iia* (aminoglycoside resistance); and *tet(A)* (efflux pump conferring resistance to tetracyclines) (Figure 3).

qnrVC1, *tet(G)*, *cmiA*, and variants of the *bla_{IMP}* and *bla_{OXA}* genes were found to be more prevalent in urinary genomes compared to sputum genomes. In contrast, *ant2*, *aadA1*, *crpP*, *dfrB*, *dfrA*, *floR*, *cmx*, and variants of the *bla_{NDM}* and *bla_{VEB}* were predominant in sputum genomes. *crpP* was the only acquired resistance gene found in environmental genomes (Figure 3).

All resistance genes found in the genomes of strains isolated from the Mexican hospital are shown in supplementary Table S2. However, it is important to note that PE21 and PE83 were the only genomes carrying the *catA1* gene (chloramphenicol resistance) (Figure 3).

2.6. Gene Mutations Associated with Drug Resistance

Chromosomal antibiotic resistance mutations were searched in 81 genes. The analysis showed nine genes with antibiotic resistance-related mutations. All genomes showed polymorphisms in the *ampC* gene. Seven urinary genomes, three from sputum, and five from environmental showed mutations in the *ampD* gene. In addition, one urinary genome had a mutation in the *ampR* regulator gene, which is involved in the overproduction of the chromosomal AmpC β -lactamase (Figure 4).

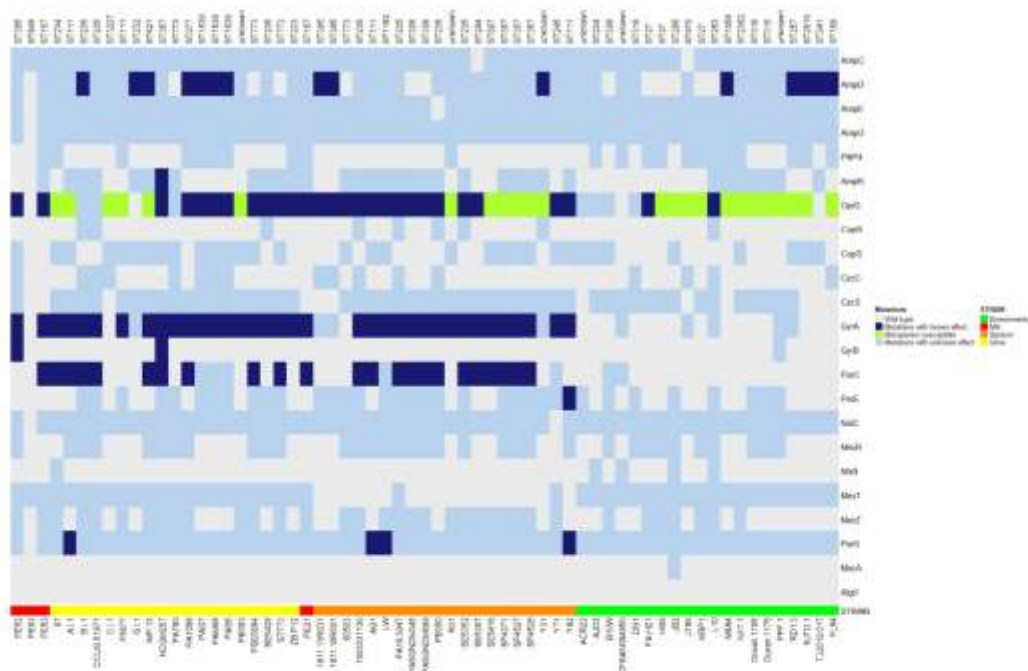


Figure 4. Mutational resistance of the 65 urinary, sputum, and environmental genomes. Graphical representation of mutations associated with antibiotic resistance (navy color), mutations with an unknown effect on antibiotic resistance (blue light), and mutations in *qprD* associated with susceptibility to meropenem (green) and wild-type genes (gray). *P. aeruginosa* PAO1 and PA14 were used as reference genomes. The heatmap was constructed with the Bioconductor package in Rstudio. MH means Mexican Hospital.

The *oprD* gene and regulators that reduce OprD expression had mutations and premature stop codons in eleven urinary genomes, fifteen from sputum, and two environmental genomes. In addition, six genomes from sputum, seven from urine, and twelve from environmental samples had a loop L7-short that causes increased susceptibility to meropenem (Figure 4).

Mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV genes (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE*) associated with reduced susceptibility to quinolones were found only in urinary and sputum genomes (Figure 4).

The analysis of mutations in the four efflux pumps' regulators showed only mutations with unknown effects on antibiotic resistance. Finally, mutations in the *parS* gene were found in only one urinary and three sputum genomes (Figure 4).

In the genomes of strains PE21, PE52, and PE83 were identified antibiotic resistance-related mutations in the *oprD* and *gyrA* genes. In addition, PE52 showed resistance-related mutations in the *gyrB* gene and PE21 and PE83 genomes in the *parC* gene (Figure 4).

2.7. Mobilome

The accessory genome comprises mobile genetic elements that are associated with bacterial environmental adaptation. We analyzed all genomes for the presence of insertion sequences (IS), simple transposons (Tn), composite transposons (CTn), integrative conjugative elements (ICEs), integrative mobilizable elements (IMEs), and plasmids. We found that urinary genomes had a higher number of IS, IMEs, and plasmids (216, 11, and 5), while sputum genomes had a higher number of Tn, CTn, and ICEs (13, 49, and 56, respectively). The environmental genomes showed fewer mobile genetic elements (Figure 5).

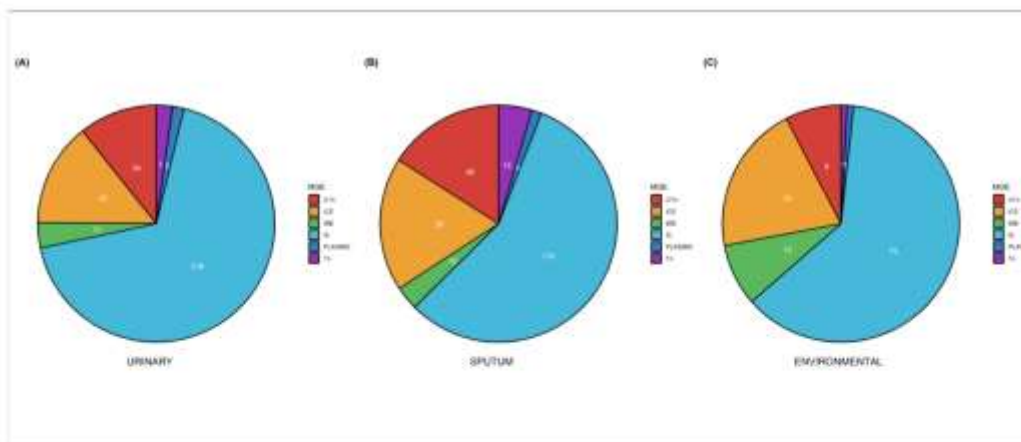


Figure 5. Mobile Genetic Elements (MGEs) are distributed in the 65 genomes of urinary (A), sputum (B), and environmental (C) strains. Each pie graphic represents the distribution of mobile genetic elements in each group of strains, and the numbers within the pie graphic represent the number of MGEs found. Tn (transposons), CTn (composite transposons), IS (insertion sequence), IMEs (integrative mobilizable elements), ICEs (integrative conjugative elements), and plasmids.

The genes *bla_{IMP}*, *bla_{DEM}*, *bla_{OXA}*, *bla_{GES}*, and *bla_{VIM}* were associated with classical and partial class 1 integrons, while genes *bla_{KPC}* and *bla_{NDM}*, *bla_{SPM}* were associated with transposons. Furthermore, transposons carrying the *bla_{KPC-2}* were found in two plasmids from two genomes from sputum (R31 and SE5416) (Figure S7). The transposons and integrons carrying *bla_{OXA-101}*, *bla_{CTX-M-30}*, and *bla_{TEM-1b}* were found in a plasmid from a urinary genome (PB353), and *bla_{DEM-1}* was found in a plasmid from sputum (60503)

(Figure S7). On the contrary, transposons or integrons carrying *bla*_{GES-15}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{GES-1}, *bla*_{PME-1}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-50}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{CARB-2}, *bla*_{OXA-35}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{VIM-4}, *bla*_{OXA-56}, and *bla*_{IMP-13} were found in integrative conjugative elements (ICEs) with a complete type 4 secretion system (T4SS) in urinary and sputum genomes (Figure S8). Lastly, the *catB7* gene was found in ICEs with T4SS from urinary and sputum genomes, while *crpP* was carried by ICEs in all genomes. In the Mexican hospital genomes, the *bla*_{IMP} gene was carried on plasmids.

2.8. Correlation between the Presence of Plasmids, Relaxases MOB, CRISPR-Cas, and Anti-CRISPR Systems

MOB_P and MOB_H were found in clinical (urine and sputum) and environmental strain genomes. On the other hand, MOB_C was only found in the clinical genomes and MOB_C in one urinary genome (Figure S9). In the Mexican hospital genomes, we found MOB₁₂ in all genomes, MOB₁₁ in PE21, PE52, and PE83 genomes, and MOB₁₄ in PE63 (Figure S9).

CRISPR-Cas systems were found in 18 urinary, nine sputum, and eight environmental genomes, including genomes from the Mexican Hospital. CRISPR-Cas systems and plasmids were present in seven genomes (PE21, PE52, PE63, PE83, IMP-13, 60503, and SE5416) (Figure S9). On the other hand, anti-CRISPR, CRISPR-Cas systems, and plasmids were identified in only three genomes (one from urinary and two from sputum) (Figure S9).

The search for CRISPR-Cas systems in plasmids revealed their presence in the plasmid pPYO_TB (from the IMP-13 urinary genome) and the plasmid unnamed1 (from the DN1 environmental genome) (Figure S9). However, no such systems were found in the genomes of PE21, PE52, PE63, and PE83.

2.9. Virulence Genes

We analyzed 116 virulence genes associated with alginate biosynthesis and regulation, rhamnolipid biosynthesis, iron uptake, quorum sensing, proteases, and toxins using the Virulence Factor Database (VFDB). However, we included only thirteen virulence factors associated with urinary tract and lung infections in the heatmap. In addition, we used the virulence genes of the PAO1 strain as a reference, and the *exoU* gene of the PA14 strain was taken as a reference.

The genes for effector proteins of the type 3 secretion system analyzed were *exoS*, *exoT*, *exoU*, and *exoY*. Our results showed that the *exoS* gene was more prevalent in urinary genomes, whereas *exoU* was found mainly in sputum genomes, and *exoY* was predominant in both urinary and environmental genomes. Finally, the *exoT* gene was present in all genomes. The *exoS* y *exoU* genes are almost always mutually exclusive; however, in this study, both were present in sputum and an environmental genome (R31 and JT86). The *pvdE* gene (involved in pyoverdine synthesis), the exotoxin A gene (*toxA*), the elastase A gene (*lasA*), and the elastase B gene (*lasB*) were found in all genomes. The *aprA* gene, encoding an alkaline protease, was present in all genomes except PE52 and JB2 (urinary and environmental, respectively). The phospholipase genes *plcB* and *plcH* were found in all genomes, and the *plcN* gene was absent in only one urinary strain. On the contrary, the *pldA* gene was more frequently observed in sputum (Figure 6).

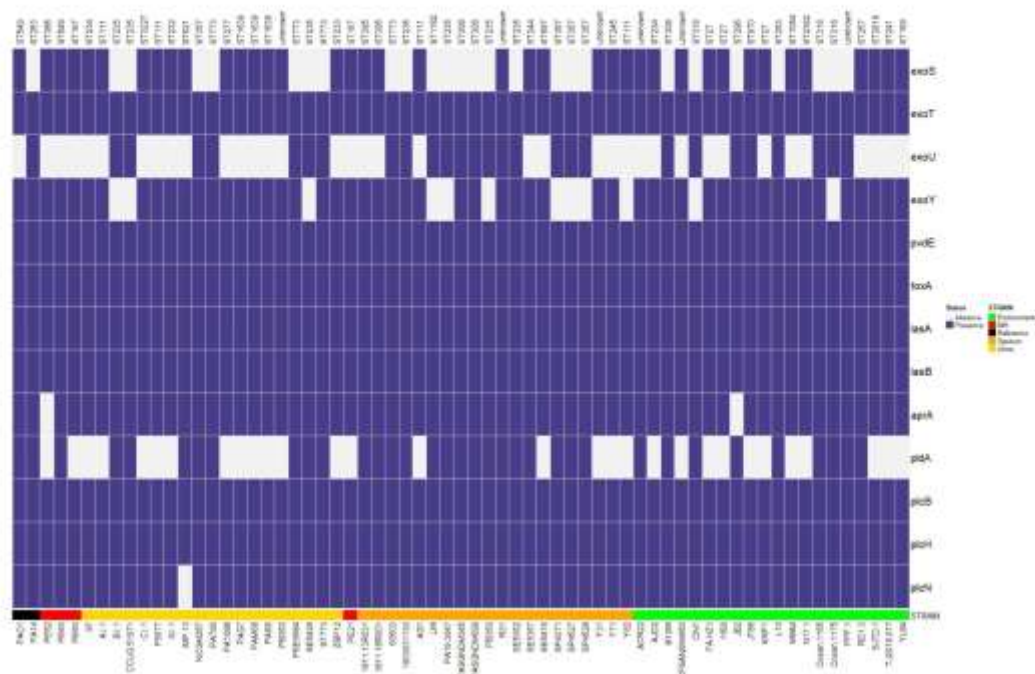


Figure 6. Presence and absence of virulence genes. Heatmap representation of virulence genes associated with urinary and lung infections. Purple represents presence, and gray color represents absence. The genes were identified with VFDB, and the heatmap was constructed with the Bioconductor package in Rstudio. MH means Mexican Hospital.

3. Discussion

P. aeruginosa is a versatile opportunistic pathogen capable of adapting to different ecological niches due to its variable arsenal of virulence factors and antibiotic resistance determinants [19], but also to the acquisition of genes by horizontal transfer. In fact, Kung and collaborators suggest that the content of the accessory genome determines environmental adaptability [12]. In this study, we compared the genomes of strains from a Mexican hospital with GenBank genomes of urine, sputum, and environmental isolates from different cities. First, we wanted to know the distribution of STs among the different niches. The ST is determined by combining the allelic variation of 7 *P. aeruginosa* housekeeping genes (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA*, and *trpE*) [20]. The high-risk clones are known to cause outbreaks of nosocomial infections worldwide, which are associated with poor clinical outcomes. This is due to their high levels of antibiotic resistance, pathogenicity, and virulence, as well as their enhanced ability to colonize and persist in a host [21]. In our analysis, we observed a high occurrence of high-risk ST235 and ST773 [22] in urinary and sputum strains, consistent with other studies in clinical strains recovered from various types of infections, including urinary and respiratory tract [23–25].

On the other hand, the high-risk ST27 [22] in this study was only found in environmental strains, which has also been reported in other studies and the MLST database [26–28], and in strains from humans and animals with lower frequencies [26,29,30].

The strains isolated from the Mexican hospital had different STs than strains from GenBank (ST167, ST2731, and ST549). eBURST analysis showed that ST2731 and ST549 of strains PE52 and PE63, respectively, did not have a relationship with the international

high-risk clones. On the other hand, ST167 (strains PE21 and PE83) is derived from group 0, where high-risk ST111 is also found; however, they are not within the same clonal complex because they only shared two alleles [31].

To know the worldwide dissemination of the ST167, we consulted the MLST database, founding four strains, of which two were clinical strains from Mexico (Accession numbers: GCF_000795625.1 and GCF_000794515.1) carrying *bla*_{IMP-15} and *bla*_{IMP-62}; one strain from the United States (Accession number: GCF_000480475.1) and one strain from a country not reported (Accession number: GCA_021693455.1) (Table S3). Based on the criteria for defining a high-risk clone, ST167 could be considered as a “local high-risk clone”, because while it has not been reported causing infections worldwide, it is associated with nosocomial infections in Mexico [32].

The pangenome represents the total number of genes in a study group [33] and based on the persistence of genes in the genome, it was divided into four classes: (1) core genome, (2) soft-core genome, (3) shell genome, and (4) cloud genome [18,34]. The pangenome of the sixty-five genomes analyzed consists of 20,911 genes. In other studies that included 17, 23, and 18 genomes, the pangenome size was smaller (9344, 9786, and 12,775 genes, respectively) [15,35,36], while the analysis of the pangenome with a size of 54,272 genes used 1311 genomes [37].

These differences may be influenced by the number of genomes analyzed in each study because the pangenome increases with the number and diversity of strains added to the analysis [15]. On the other hand, the core genome comprises genes involved in bacterial survival, and its size decreases concurrently with the addition of genomes to the analysis [33]. In our study, the core genome size comprised 4246 genes; in contrast, other studies have reported larger core genomes 5233 [35], 4910 [15], and 5109 [38] genes in strains isolated from different sources. Other factors that could influence this are the diverse nature of the strains and the different annotation tools used [15].

The soft-core, shell, and cloud genomes showed 898, 1709, and 14,058 genes, respectively, which was different compared with other studies that included strains isolated from various infection sites [39,40].

The accessory genome is composed of genes acquired through horizontal transfer due to exposure of the bacterium to its host, environment, or other bacteria, providing adaptive advantages to the bacterium [41]. Therefore, we constructed a dendrogram based on the accessory genome and did not observe any correlation with the isolation site; these genomes were clustered based on their ST. However, since the tree’s construction was based on the presence or absence of accessory genome genes, it could indicate that strains grouped in the same clade also carry similar acquired genes in their accessory genome. To corroborate this, we constructed phylogenetic trees based on the core genome, SNPs, and MLST, where we could observe that strains clustered again concerning their ST; this was also reported in another study [42].

Comparing the genome of the strains from the Mexican Hospital revealed that each strain had strain-specific genes, with strain PE52 holding the largest number of these genes. These strain-specific genes are typically involved in niche adaptation [43]. On the other hand, previous studies have reported that strains PE21 and PE83 exhibit similar phenotypic profiles of resistance and genotypic characteristics [44]. In the genome comparison, we observed that they also shared many genes.

We analyzed antimicrobial resistance and virulence genes because the accessory genome is often composed of these genes [45]. We found that the genes *bla*_{OXA-50} and *bla*_{PAC} (beta-lactam resistance), *fosA* (fosfomycin resistance), and *aph(3’)-IIB* (aminoglycoside resistance) were present on the chromosome of all strains studied, including reference strains PAO1 and PA14; in other studies, these genes have also been identified in all strains included [15,46], suggesting that they are conserved genes in *P. aeruginosa*.

On the other hand, the *catB7* gene (responsible for chloramphenicol resistance) was absent in only two genomes. This gene has been found exclusively in the chromosome of *P.*

aeruginosa strains but not in other bacteria [15,47]; however, in other studies, the absence of this gene has already been reported in some strains of *P. aeruginosa* [36,48].

OXA-50 is an intrinsic class D oxacillinase of *P. aeruginosa* that has a narrow-spectrum hydrolysis profile against antibiotics such as ampicillin, benzylpenicillin, cephaloridine, cephalothin, nitrocefin, piperacillin, and imipenem [49]. The OXA-50 family consists of 43 variants according to the Beta-lactamase Database (until August 1 2022) [50]. In this study, we searched for the distribution of these variants among the three genomes groups; *bla*_{OXA-50} and *bla*_{OXA-494} were the most prevalent in the genomes of urinary and environmental strains, respectively. However, *bla*_{OXA-488} was the most frequently found in the genomes of sputum strains. Compared to OXA-50, OXA-488 is three times more efficient against benzylpenicillin and twice more efficient hydrolyzing imipenem [51]. This could be due to the continuous selection pressure caused by the indiscriminate use of beta-lactams, which has led to the emergence of OXA-50 variants with an improved hydrolysis spectrum against imipenem.

P. aeruginosa is also capable of acquiring antibiotic-resistance genes. In this study, we did not observe any correlation between the presence of these acquired resistance genes and the site of isolation of the clinical strains. However, some clinical genomes exhibited antibiotic-resistance genes that are commonly found in genera other than *Pseudomonas* [52–54]. This may be due to the fact that urinary tract and pulmonary infections are often polymicrobial [55,56], and the close contact and interaction with other species may have facilitated genetic exchange between bacteria coexisting in the same niche. These results support the findings of Freschi and collaborators [37], who showed that horizontal gene transfer events are involved in the acquisition of antibiotic resistance genes. Although this study provides knowledge about the behavior and dynamics of *P. aeruginosa* in different niches, a more significant number of genomes from other niches could be included for a better understanding.

It is important to highlight that *bla*_{IMP} was more predominant in strains isolated from urine, especially in strains isolated from the Mexican Hospital. This notable difference could be related to selection pressure within the hospital and the consequent selection of carbapenem-resistant strains carrying this resistance gene. In fact, this hospital reported *bla*_{IMP} as the most prevalent carbapenem-resistance gene [44]. In addition, bacteria in the same niche could be influencing the acquisition of this resistance gene.

On the other hand, *crpP* was found in both clinical and environmental genomes. However, it was the only acquired resistance gene identified in environmental strains, which is consistent with another study [57]. In addition, this gene was previously associated with resistance to the antibiotic ciprofloxacin [58]. However, a recent study has concluded that CrpP is not responsible for ciprofloxacin resistance in *E. coli* [59].

Interestingly, some antibiotic-resistance genes were associated with mobile/mobilizable genetic elements. Such as *bla*_{IMP}, *bla*_{DIM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM} genes that were associated with classical and partial class 1 integrons, consistent with other studies [42,60,61]; while *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM}, *bla*_{SPM} were associated with insertion sequences and transposons, similar to reported by other authors [62–64]. Commonly, transposons and integrons are localized within plasmids and integrative conjugative elements [65], which coincides with our findings. Notably, the *crpP* gene was initially identified on a plasmid [58]; however, in this and another study, it was localized in ICEs [66]. Similarly, *catB7* was identified in ICEs, which could be related to the loss of this gene in some genomes. The identification of antibiotic-resistance genes carried by mobile/mobilizable genetic elements suggests an increased possibility of horizontal gene transfer within or between different isolates, species, and environments [67]. On the other hand, the low number of MGEs in the genomes of environmental strains compared to the genomes of clinical strains, could be related to the fact that they did not have horizontally acquired resistance genes since these are regularly carried by MGEs.

The number of plasmids in *P. aeruginosa* found in this study is lower than in other bacteria, such as Enterobacteriales [68]. However, the urinary strains carried more plasmids,

highlighting the strains from the Mexican hospital. This result suggests that plasmid-mediated resistance could be the main mechanism of resistance in this hospital.

CRISPR-Cas systems have been found to play an important role in shaping the accessory genome [69] because they restrict horizontal gene transfer and bacteriophage infection [70]. To know whether CRISPR-Cas systems would play a role in plasmid acquisition, we correlated their presence and absence with the presence of plasmids. Although most genomes presented CRISPR-Cas systems but not plasmids, some genomes carried both, which may be due to the presence of anti-CRISPR-Cas proteins whose function is to inhibit the activity of these systems [71] or because the spacers could be targeted to other mobile genetic elements. However, we did not analyze CRISPR spacer sequences. In contrast, the Mexican strains had plasmids and CRISPR-Cas systems but did not present anti-CRISPR.

On the other hand, CRISPR-Cas systems have been associated with small genome sizes and reduced abundance of ICEs [72]. In contrast, the genomes of environmental strains had fewer CRISPR-Cas systems, a smaller genome size, and a reduced number of ICEs in comparison with the genomes of sputum and urinary strains.

Additionally, two plasmids carried CRISPR-Cas, which seemed interesting to us, so we searched for the type of system it had, finding that it was system type IV. This type of CRISPR-Cas has only been found in plasmids and other mobile genetic elements, and it has been hypothesized that its main function is to eliminate competing plasmids [73,74]. The above has been studied in archaeal and bacterial plasmids (including the *Gammaproteobacteria*), finding that many spacers of type IV CRISPR-Cas systems carried by plasmids matched sequences from other plasmids [74]. In plasmids of *Klebsiella pneumoniae*, something similar was found [75]; however, this remains unclear in *P. aeruginosa*.

It is important to note that some genomes only had orphan CRISPR arrays (lacking Cas), which are usually considered vestigial. However, it has been found that some CRISPR of this type in *E. coli* could be functional [76]; in *P. aeruginosa*, this remains unclear.

P. aeruginosa can also acquire resistance through chromosomal mutations. In this study, we found antibiotic resistance-related mutations in *ampD*, *ampR*, *oprD*, *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, and *parS* genes. OprD is an outer membrane protein involved in the diffusion of small peptides, basic amino acids, and carbapenems into the cell [77]. However, alterations in the structure/expression or loss of OprD cause decreases in susceptibility to carbapenems [78]. Analysis of *oprD* revealed that carbapenem resistance-related mutations were mostly found in the genomes of urine and sputum strains, as reported in other studies with clinical strains [44,79]. In contrast, deletions in the *oprD* sequence can generate Loop L7-short, which is associated with meropenem susceptibility phenotype [79,80]; interestingly, this *oprD* genotype was mostly found in the genomes of environmental strains.

The resistance to fluoroquinolones may be due to mutations in quinolone resistance determinant regions (QRDRs) in DNA gyrase (*gyrA* and *gyrB*) and topoisomerase IV (*parC* and *parE*) subunits [81], which were observed in the genomes of urine and sputum strains but not in the genomes of environmental strains. The absence of these mutations in environmental strains could suggest that they were not exposed to selection pressure since, although the environment may suffer antibiotic contamination because of human activity [82], they are not exposed to the same strong selection pressure for antibiotics as the hospital bacteria.

The production of the cephalosporinase AmpC is an intrinsic mechanism of resistance to beta-lactam antibiotics in *P. aeruginosa*. However, it can be potentiated by mutations in *ampR* (transcription factor) and *ampD* (cytosolic amidase) that cause *ampC* derepression [78]. We observed that mutations in AmpD, which lead to AmpC derepression, were most prevalent in genomes of urinary strains ($n = 7$), followed by environmental ($n = 5$), and to a lesser extent in genomes of sputum strains ($n = 3$). In contrast, only one genome from a urinary strain carried a mutation in the *ampR* gene leading to AmpC derepression. On the other hand, *ampC* polymorphisms caused by mutations increase its hydrolytic activity towards cephalosporins [83]. AmpC polymorphisms were observed in almost all

studied genomes except for two (one sputum strain and one environmental strain). To date, 533 *Pseudomonas* derived cephalosporinase (PDC) variants have been described (until December 2022) [50]. However, this study did not focus on searching for variants, and we do not know if their distribution could be related to the isolation sites of the studied genomes.

Some mutations in ParS (the sensor kinase of the dual-component ParR/S system) are related to colistin resistance and were observed only in clinical strains, being more prevalent in sputum strain genomes ($n = 3$). It is important to mention that our study has some limitations, such as the fact that we do not know the phenotypic profile of antibiotic resistance and cannot relate it to its resistance genotype.

It is important to note that environmental strains only carried intrinsic resistome genes, and some mutations in these genes were identified, which may indicate that mutations in resistance-related genes are the main mechanisms in environmental strains and not the acquisition of genes through horizontal transfer.

P. aeruginosa uses a type 3 secretion system to release effector toxins (ExoS, ExoT, ExoU, and ExoY) directly into host cells, which aid colonization and immune evasion. In this study, variation in the presence and absence of virulence genes was most evident in these effector proteins. *exoS* encodes a cytotoxin with GTPase activating protein (GAP) activity and adenosine diphosphate ribosyl transferase (ADPRT) activity [84] and is mostly found in the genomes of urinary tract strains.

On the other hand, ExoU is a cytotoxin with phospholipase A2 activity that causes lysis and necroptosis in epithelial cells, macrophages, and neutrophils [85]. ExoU production has been shown to contribute to the developing of severe pneumonia in a mouse model [86] and poor outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia [87]. *exoU* was primarily found in strains isolated from sputum; however, in other studies, it has also been found in eye isolates [15,88]. Similarly, it has been suggested that because the *exoU* gene is absent in PAO1 and is carried by genomic islands, it may have been acquired through horizontal transfer [10] to provide adaptive advantages in its ecological niche.

For reasons that are not entirely clear, *exoU* and *exoS* are mutually exclusive. However, strains carrying both cytotoxins have been found in this and other studies [89,90]. One possible explanation suggested is that they provide enhanced fitness in distinct ecological niches [91].

ExoY is an adenyl cyclase whose action disrupts the actin cytoskeleton, inhibits bacterial uptake by host cells, and increases endothelial permeability; however, the significance of ExoY in infections remains unclear [92]. The *exoY* gene was mostly observed in genomes of both urinary and environmental strains. However, other studies have also observed it in strains isolated from the eye and cystic fibrosis [15]. ExoT is the most prevalent effector in genomes of clinical and environmental strains of *P. aeruginosa* [19,93]. This study found it in 100% of the genomes analyzed.

On the other hand, the prevalence of *plcN*, *plcH*, *lasB*, and *toxA* genes was 100% (except for *plcN*) in the three isolation sources, contrary to what was observed by Hassuna et al. (2020) in isolates from respiratory tract infections [90]. On the other hand, *plcB* and *plcH* were detected in 98.7% (153/155) and 96.1% (149/155) of strains recovered from nosocomial infections and community-acquired infections [94], indicating that they are highly conserved in the *P. aeruginosa* genome. The reason for the differences in the distribution of these genes in different studies remains unclear. Finally, *pldA* was mostly found in the genomes of sputum strains. In another study, it was also mostly found in isolates responsible for an acute lung infection and, to a lesser extent, in urinary tract infection isolates [95]. In addition, it has been suggested to play a role in chronic lung infection in rats [96].

It is important to note that although virulence genes were more prevalent in clinical strains, they were also present in lower amounts in genomes of environmental strains, as has been observed by another author [97]. This would reinforce the understanding that environmental strains can also cause infections [17] and be a potential risk factor for human

health [98] and highlights the prevalence of virulence genes that could vary about the isolation site.

4. Materials and Methods

4.1. Bacterial Genomes

Four strains of *P. aeruginosa* multidrug-resistant and carbapenem resistant recovered from a Mexican Hospital, were included in this study: strains PE52 (Accession number: JARDUU000000000), PE63 (Accession number: JARDUW000000000), and PE83 (Accession number: JARDUX000000000) were isolated from urine, and strain PE21 (Accession number: JARDUV000000000) was isolated from sputum. The phenotype of sensibility and some molecular resistance mechanisms were previously described [44]. Genomic DNA was extracted using the Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Ma, USA), and whole genome sequencing was made by Illumina Miseq 2 × 150 bp, with 5 million paired end reads in the ‘SNPSaurus Genomics to Genotype’ <https://www.snpsaurus.com/> (accessed on 1 September 2019). The quality of the paired-end reads it was measured by FastQC version 3.9.0 [99]. SPAdes version 3.9.0 [100] was used to generate the de novo assemblies, and the quality was analyzed with QUAST (Quality Assessment Tool for Genome Assemblies) [101]. Finally, the genome sequences were annotated with Prokka version 1.12 [102].

In addition, 59 complete genomes from the GenBank database were downloaded in order of appearance available until June 2021, and the sources of isolation were obtained from the submitters’ information in GenBank. For the comparison, we included 19 genomes from strains isolated from urinary samples, 20 from sputum samples (non-cystic fibrosis patients), and 20 isolated from the environment. In addition, the genomes of the reference strain *P. aeruginosa* PAO1 (Accession number: NC_002516.2) and PA14 (Accession number: CP000438.1) were included.

4.2. MLST (Multilocus Sequence Typing)

The sequence type (ST) of 65 genomes was identified using the MLST tool from the Center for Genomic Epidemiology <https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/> (accessed on 1 February 2020) [103], which utilizes the MLST allele sequence and profile data from PubMLST.org. The ST is determined by combining the allelic variation of 7 *P. aeruginosa* housekeeping genes (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA*, and *trpE*). The clonal complex of sequence types (ST) was determined with PHYLOVIZ [104] using goeBURST (a refinement of the eBURST algorithm) to generate a complete minimal spanning tree (MST).

4.3. Genome Comparison of Strains Isolated from the Mexican Hospital

The genomes of strains PE21 isolated from sputum, PE52, PE63, and PE83 isolated from urine, and the reference strain PAO1, were included in this analysis. Roary version 3.12.0 [105] was used to identify genes shared between strains and unique genes. The Roary file ‘gene_presence_absence.csv’ was used to generate the Venn diagram, and the Venn diagram was performed with the online tool ‘calculate and draw custom Venn diagrams’ [106].

4.4. Comparative Analysis of Strains from Three Isolation Sources

Sixty-five strain genomes were included in the pangenome analysis. Roary version 3.12.0 [105] was used to perform pangenome analysis, which uses the GFF3 files generated by Prokka to identify the core genome, soft core, shell genes, and cloud genes. Roary_plots.py script was used to visualize the pangenome. The phylogenetic tree based on single nucleotide polymorphisms (SNPs) was built using Parsnp v1.2 [107] with the ‘-c’ flag enabled, including the previous 65 strain genomes and PA7 as the outlier strain. iTOL v6.5 [108] was used to visualize the ‘newick’ files generated by Roary and parsnp. Seven concatenated sequences of the STs were obtained for the MLST database. MEGA version 11.0.10 was used to construct the MLST dendrogram using the UPGMA method.

4.5. Resistome Analysis

ResFinder version 4.1 was used to detect antibiotic resistance genes using default parameters. Mutations associated with antibiotic resistance leading to amino acid changes were identified using cluster OMEGA [109]. Amino acid changes were searched manually using *P. aeruginosa* PAO1 genes as a reference. Heatmaps and graphs were constructed using the Bioconductor and ggplot2 packages, respectively [110,111] from RStudio version 1.4.1106 [112].

4.6. Virulence Analysis

Virulence-associated genes were identified using the Virulence Factor of Pathogenic Bacteria database (VFDB) [113]. The *P. aeruginosa* PA14 strain was used as a reference because it is *exoU* positive, which is considered highly virulent.

4.7. Mobile Genetic Elements (MGEs)

Integrative Conjugative Elements (ICE) and Integrative and Mobilizable Elements (IMEs) were identified with the Web tool for ICE/IME detection of bacterial genomes: ICEfinder [114]. Furthermore, mobile genetic elements such as simple transposons (Tn), composite transposons (CTn), and insertion sequences (IS) were analyzed with Mobile Element Finder version 1.0.3 [115]. Placnetw [116] was used to determine plasmid sequences, and MOBscan [117] was used to search the relaxase MOB families in the genomes. In addition, the online tool CrisprCasFinder [118] was used to identify “clustered regularly interspaced short palindromic repeats” and CRISPR-associated proteins (CRISPR-cas) on both chromosomes and plasmids of all genomes. Finally, Acrfinder was used to search anti-CRISPR systems [119].

5. Conclusions

In the present work, we compare the genomes of strains isolated from urine, lungs, and environment. When performing the phylogenetic analysis of genomes from a Mexican hospital and from the GenBank from different niches, we observed that the genomes were clustering according to their ST and not the niche. The high-risk STs (ST235, ST773, and ST27) were present in genomes from the three niches except for the Mexican genomes, and these last three (ST167, ST2731, and ST549) differed from the GenBank genomes. However, the analysis of the genomic content showed that environmental genomes had genes involved in adaptation to the environment that were not present in clinical genomes besides, these genomes had mutations in antibiotic resistance-related genes as the main resistance mechanism. In contrast, clinical genomes had resistance genes reported in *Pseudomonas* and *Enterobacteria*, and these genes were in mobile/mobilizable genetic elements in the chromosome, except for the Mexican genomes, which carried them mostly in plasmids. This was in concordance with the presence of CRISPR-Cas and anti-CRISPR, except in the Mexican genomes that only had plasmids and CRISPR-Cas. On the other hand, when analyzing the *bla*_{CXA-50} variants, we found *bla*_{CXA-488}, which has higher activity against carbapenems, was more prevalent in sputum genomes. The virulome analysis showed *exo5* was most prevalent in the urinary genomes and *exoU* and *pldA* in sputum. This study evidences the variability of genetic content among *P. aeruginosa* isolates from different niches.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics12050866/s1>, Table S1: General features of the drafts of four *P. aeruginosa* strains from the Mexican Hospital. Table S2: General features of *P. aeruginosa* genomes included in this study. Table S3: Strains with ST167 reported in the MLST database. Figure S1: Dendrogram generated from the core genome. Figure S2: Phylogenetic tree based on presence and absence of accessory genome from 65 strains. Figure S3: Phylogenetic tree generated based on SNPs. Figure S4: ST of the genomes of urinary, sputum and environmental strains. Figure S5: *bla*_{CXA-50} family variants of strain genomes of urinary, sputum and environmental. Figure S6: Presence and absence of MOB relaxases, chromosomal CRISPR-Cas systems, plasmid CRISPR-Cas systems and anti-CRISPR systems. Figure S7: Mobile Genetic Elements carrying beta-lactams resistance genes

found in plasmids. Figure S8: Mobile Genetic Elements carrying beta-lactams resistance genes found in Integrative Conjugative Elements with type 4 secretion systems complete. Figure S9: Presence and absence of MOB relaxases, chromosomal CRISPR-Cas systems, plasmid CRISPR-Cas systems, and anti-CRISPR systems.

Author Contributions: Conceptualization, P.L.-Z., J.G.-M. and Y.S.; methodology, J.G.-M., A.L.-G., G.J.-F. and M.C.-L.; software, E.B.-L. and M.A.C.; investigation, J.G.-M., P.L.-Z. and R.d.C.R.-G.; resources, P.L.-Z. and R.d.C.R.-G.; writing—original draft preparation, J.G.-M., P.L.-Z. and R.d.C.R.-G.; writing—review and editing, P.L.-Z., R.d.C.R.-G., G.C.-C. and E.B.-L.; supervision, P.L.-Z. and R.d.C.R.-G.; project administration, P.L.-Z. and R.d.C.R.-G.; funding acquisition, P.L.-Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by 100031833/VIEP2019, VIEP (2497/16).

Institutional Review Board Statement: The protocol to perform this study was approved by the Ethical Committee of Hospital Regional del ISSSTE, Puebla, under number 188-2018.

Informed Consent Statement: *P. aeruginosa* strains PE21, PE52, PE63 and PE83 were recovered from routine culture and informed patient consent was not required.

Data Availability Statement: The genomes of PE21, PE52, PE63 and PE83 have been deposited in NCBI's GenBank under accession numbers JARDUV000000000, JARDUU000000000, JARDUW000000000, JARDUX000000000.

Acknowledgments: J.G.-M. received doctoral fellowships from CONACyT México with CVU number 613250. The authors thank Amanda Carbajal from the University of California, Santa Cruz for help in revision of the English manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Zarei, O.; Shokoohizadeh, L.; Hossainpour, H.; Alikhani, M.Y. Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical, environmental and cockroach sources by ERIC-PCR. *BMC Res. Notes* **2018**, *11*, 668. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Pang, Z.; Raudonis, R.; Glick, B.R.; Lin, T.J.; Cheng, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 177–192. [\[CrossRef\]](#)
- Wilson, M.G.; Pandey, S. *Pseudomonas aeruginosa*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2022.
- Tacconelli, E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; Harbarth, S.; Mendelson, M.; Monnet, D.L.; Pulcini, C.; Kahlmeter, G.; Kluytmans, J.; Carmeli, Y.; et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 318–327. [\[CrossRef\]](#)
- Breidenstein, E.B.M.; de la Fuente-Núñez, C.; Hancock, R.E.W. *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* **2011**, *19*, 419–426. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Botelho, J.; Grosso, F.; Peixe, L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*—Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist. Updat.* **2019**, *44*, 100640. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Liao, C.; Huang, X.; Wang, Q.; Yao, D.; Lu, W. Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 926758. [\[CrossRef\]](#)
- Shehabi, A.A.; Kamal, A.M. *Pseudomonas aeruginosa* a common opportunistic pathogen in Jordan: A review article. *Int. Arab. J. Antimicrob. Agents* **2019**, *9*, 1–8. [\[CrossRef\]](#)
- Wolfgang, M.C.; Kulasekara, B.R.; Liang, X.; Boyd, D.; Wu, K.; Yang, Q.; Miyada, C.G.; Lory, S. Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 8484–8489. [\[CrossRef\]](#)
- Sawa, T.; Shimizu, M.; Moriyama, K.; Wiener-Kronish, J.P. Association between *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion, Antibiotic Resistance, and Clinical Outcome: A Review. *Crit. Care* **2014**, *18*, 668. [\[CrossRef\]](#)
- Sawa, T.; Momiyama, K.; Mihara, T.; Kainuma, A.; Kinoshita, M.; Moriyama, K. Molecular epidemiology of clinically high-risk *Pseudomonas aeruginosa* strains: Practical overview. *Microbiol. Immunol.* **2020**, *64*, 331–344. [\[CrossRef\]](#)
- Kung, V.L.; Ozer, E.A.; Hauser, A.R. The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 621–641. [\[CrossRef\]](#)
- Silby, M.W.; Winstanley, C.; Godfrey, S.A.C.; Levy, S.B.; Jackson, R.W. *Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable. *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, *35*, 652–680. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Mathoe, K.; Narasimhan, G.; Valdes, C.; Qiu, X.; Matewish, J.M.; Koehrsen, M.; Rokas, A.; Yandava, C.N.; Engels, R.; Zeng, E.; et al. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *105*, 3100–3105. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Subedi, D.; Vijay, A.K.; Kohli, G.S.; Rice, S.A.; Willcox, M. Comparative genomics of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different geographic sites. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 15668. [\[CrossRef\]](#)

16. Subedi, D.; Kohli, G.S.; Vijay, A.K.; Willcox, M.; Rice, S.A. Accessory genome of the multi-drug resistant ocular isolate of *Pseudomonas aeruginosa* PA34. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0215038. [CrossRef] [PubMed]
17. Dettman, J.R.; Kassen, R. Evolutionary genomics of niche-specific adaptation to the cystic fibrosis lung in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 663–675. [CrossRef] [PubMed]
18. Collins, R.E.; Higgs, P.G. Testing the infinitely many genes model for the evolution of the bacterial core genome and pangenome. *Mol. Biol. Evol.* **2012**, *29*, 3413–3425. [CrossRef] [PubMed]
19. Jurado-Martin, I.; Sainz-Mejías, M.; McClean, S. *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3128. [CrossRef]
20. Curran, B.; Jonas, D.; Grundmann, H.; Pitt, T.; Dowson, C.G. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 5644–5649. [CrossRef]
21. Oliver, A.; Mulet, X.; López-Causapé, C.; Juan, C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist. Uplat.* **2015**, *21–22*, 41–59. [CrossRef]
22. del Barrio-Tofiño, E.; López-Causapé, C.; Oliver, A. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with horizontally-acquired β -lactamases: 2020 update. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2020**, *56*, 106196. [CrossRef] [PubMed]
23. Guzvinec, M.; Izdebski, R.; Butic, I.; Jelic, M.; Abram, M.; Koscak, I.; Baraniak, A.; Hryniewicz, W.; Cniadkowski, M.; Andrasevic, A.T. Sequence types 235, 111, and 132 Predominate among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Croatia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 6277–6283. [CrossRef] [PubMed]
24. Wright, L.L.; Turton, J.F.; Livermore, D.M.; Hopkins, K.L.; Woodford, N. Dominance of international “high-risk clones” among metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70*, 103–110. [CrossRef] [PubMed]
25. Hong, J.S.; Song, W.; Park, M.J.; Jeong, S.; Lee, N.; Jeong, S.H. Molecular Characterization of the First Emerged NDM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in South Korea. *Microbiol. Drug Resist.* **2021**, *27*, 1063–1070. [CrossRef] [PubMed]
26. Kidd, T.J.; Ritchie, S.R.; Ramsay, K.A.; Grimwood, K.; Bell, S.C.; Rainey, P.B. *Pseudomonas aeruginosa* Exhibits Frequent Recombination, but Only a Limited Association between Genotype and Ecological Setting. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44199. [CrossRef]
27. Moloney, E.M.; Deasy, E.C.; Swan, J.S.; Brennan, G.I.; O’Donnell, M.J.; Coleman, D.C. Whole-genome sequencing identifies highly related *Pseudomonas aeruginosa* strains in multiple washbasin U-bends at several locations in one hospital: Evidence for trafficking of potential pathogens via wastewater pipes. *J. Hosp. Infect.* **2020**, *104*, 484–491. [CrossRef]
28. *Pseudomonas aeruginosa* | PubMLST. Available online: <https://pubmlst.org/organisms/pseudomonas-aeruginosa> (accessed on 5 March 2023).
29. Haenni, M.; Hocquet, D.; Ponsin, C.; Chollet, P.; Guyeux, C.; Madec, J.Y.; Bertrand, X. Population structure and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from animal infections in France. *BMC Vet. Res.* **2015**, *11*, 9. [CrossRef]
30. Ruiz-Roldán, L.; Bellés, A.; Bueno, J.; Azcona-Gutiérrez, J.M.; Rojo-Bezares, B.; Torres, C.; Castillo, F.J.; Sáenz, Y.; Seral, C. *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Spanish Children: Occurrence in Faecal Samples, Antimicrobial Resistance, Virulence, and Molecular Typing. *Biomed Res. Int.* **2018**, *2018*, 8060178. [CrossRef] [PubMed]
31. Seidl, K.; Leimer, N.; Palheiros Marques, M.; Furrer, A.; Holzmann-Bürgel, A.; Senn, G.; Zbinden, R.; Zinkernagel, A.S. Clonality and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at the University Hospital Zurich, Switzerland between 2012 and 2014. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2015**, *14*, 14. [CrossRef] [PubMed]
32. Baquero, F.; Tedim, A.P.; Coque, T.M. Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. *Front. Microbiol.* **2013**, *4*, 15. [CrossRef] [PubMed]
33. Costa, S.S.; Guimarães, L.C.; Silva, A.; Soares, S.C.; Baraúna, R.A. First Steps in the Analysis of Prokaryotic Pan-Genomes. *Bioinform. Biol. Insights* **2020**, *14*, 1177932220938064. [CrossRef] [PubMed]
34. Gautreau, G.; Bazin, A.; Gachet, M.; Planel, R.; Burlot, L.; Dubois, M.; Perrin, A.; Médigue, C.; Calteau, A.; Cruveiller, S.; et al. PPanGGOLIN: Depicting microbial diversity via a partitioned pangenome graph. *PLoS Comput. Biol.* **2020**, *16*, e1007732. [CrossRef] [PubMed]
35. Valot, B.; Guyeux, C.; Rolland, J.Y.; Mazouzi, K.; Bertrand, X.; Hocquet, D. What it takes to be a *Pseudomonas aeruginosa*? The core genome of the opportunistic pathogen updated. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0126468. [CrossRef] [PubMed]
36. Kandasamy, K.; Thirumalmuthu, K.; Prajna, N.V.; Lalitha, P.; Mohankumar, V.; Devarajan, B. Comparative genomics of ocular *Pseudomonas aeruginosa* strains from keratitis patients with different clinical outcomes. *Genomics* **2020**, *112*, 4769–4776. [CrossRef] [PubMed]
37. Freschi, L.; Vincent, A.T.; Jeukens, J.; Emond-Rheault, J.G.; Kukavica-Ibrulj, I.; Dupont, M.J.; Charette, S.J.; Boyle, B.; Levesque, R.C. The *Pseudomonas aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on Its Population Structure, Horizontal Gene Transfer, and Pathogenicity. *Genome Biol. Evol.* **2019**, *11*, 109–120. [CrossRef]
38. Poulsen, B.E.; Yang, R.; Clatworthy, A.E.; White, T.; Osmulski, S.J.; Li, L.; Penaranda, C.; Lander, E.S.; Shores, N.; Hung, D.T. Defining the core essential genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 10072–10080. [CrossRef]
39. Bianconi, I.; Jeukens, J.; Freschi, L.; Alcalá-Franco, B.; Facchini, M.; Boyle, B.; Molinaro, A.; Kukavica-Ibrulj, I.; Tümmler, B.; Levesque, R.C.; et al. Comparative genomics and biological characterization of sequential *Pseudomonas aeruginosa* isolates from persistent airways infection. *BMC Genom.* **2015**, *16*, 1105. [CrossRef]

40. Muthukumarasamy, U.; Preusse, M.; Kordes, A.; Koska, M.; Schniederjans, M.; Khaledi, A.; Häussler, S. Single-nucleotide polymorphism-based genetic diversity analysis of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Genome Biol. Evol.* **2020**, *12*, 396–406. [CrossRef]
41. Jackson, R.W.; Vinatzer, B.; Arnold, D.L.; Dorus, S.; Murillo, J. The influence of the accessory genome on bacterial pathogen evolution. *Mob. Genet. Elem.* **2011**, *1*, 55–65. [CrossRef]
42. Janice, J.; Agyepong, N.; Owusu-Ofori, A.; Govinden, U.; Essack, S.Y.; Samuelsen, Ø.; Sundsfjord, A.; Pedersen, T. Carbapenem resistance determinants acquired through novel chromosomal integrations in extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2021**, *65*, e00289–21. [CrossRef]
43. Guimarães, L.C.; Benevides De Jesus, L.; Vinícius, M.; Viana, C.; Silva, A.; Thiago, R.; Ramos, J.; De, S.; Soares, C.; Azevedo, V. Inside the Pan-genome-Methods and Software Overview. *Curr. Genom.* **2015**, *16*, 245–252. [CrossRef] [PubMed]
44. López-García, A.; del Carmen Rocha-Gracia, R.; Bello-López, E.; Juárez-Zelocualtecal, C.; Sáenz, Y.; Castañeda-Lucio, M.; López-Pliego, L.; Cristina González-Vázquez, M.; Torres, C.; Ayala-Núñez, T.; et al. Characterization of antimicrobial resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying IMP variants recovered from a Mexican hospital. *Infect. Drug Resist.* **2018**, *11*, 1523–1536. [CrossRef] [PubMed]
45. Yoon, E.J.; Jeong, S.H. Mobile carbapenemase genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 614058. [CrossRef]
46. Khan, M.; Stapleton, F.; Summers, S.; Rice, S.A.; Willcox, M.D.P. Antibiotic resistance characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from keratitis in Australia and India. *Antibiotics* **2020**, *9*, 600. [CrossRef] [PubMed]
47. Irum, S.; Naz, K.; Ullah, N.; Mustafa, Z.; Ali, A.; Arslan, M.; Khalid, K.; Andleeb, S. Antimicrobial resistance and genomic characterization of six new sequence types in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Pakistan. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1386. [CrossRef]
48. Diorio-Toth, L.; Irum, S.; Potter, R.F.; Wallace, M.A.; Arslan, M.; Munir, T.; Andleeb, S.; Burnham, C.-A.D.; Dantas, G. Genomic Surveillance of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Reveals an Additive Effect of Carbapenemase Production on Carbapenem Resistance. *Microbiol. Spectr.* **2022**, *10*, e00766–22. [CrossRef]
49. Girlich, D.; Naas, T.; Nordmann, P. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 2043–2048. [CrossRef]
50. Naas, T.; Oueslati, S.; Bonnin, R.A.; Dabos, M.L.; Zavala, A.; Dortet, L.; Retaillieu, P.; Iorga, B.I. Beta-lactamase database (BLDB)-structure and function. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32*, 917–919. [CrossRef]
51. Streling, A.P.; Cayó, R.; Nodari, C.S.; Almeida, L.G.P.; Bronze, F.; Siqueira, A.V.; Matos, A.P.; Oliveira, V.; Vasconcelos, A.T.R.; Marcondes, M.F.M.; et al. Kinetics Analysis of β -Lactams Hydrolysis by OXA-50 Variants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Drug Resist.* **2022**, *28*, 849–852. [CrossRef]
52. Cantón, R.; González-Alba, J.M.; Galán, J.C. CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 110. [CrossRef]
53. Bathoorn, E.; Tsioutis, C.; da Silva Voorham, J.M.; Scoulica, E.V.; Ioannidou, E.; Zhou, K.; Rossen, J.W.; Gikas, A.; Friedrich, A.W.; Grundmann, H. Emergence of pan-resistance in KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Crete, Greece: A close call. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71*, 1207–1212. [CrossRef] [PubMed]
54. Falco, A.; Ramos, Y.; Franco, E.; Guzmán, A.; Takiff, H. A cluster of KPC-2 and VIM-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST833 isolates from the pediatric service of a Venezuelan Hospital. *BMC Infect. Dis.* **2016**, *16*, 595. [CrossRef] [PubMed]
55. Bisht, K.; Baishya, J.; Wakeman, C.A. *Pseudomonas aeruginosa* polymicrobial interactions during lung infection. *Curr. Opin. Microbiol.* **2020**, *53*, 1–8. [CrossRef] [PubMed]
56. Gaston, J.R.; Johnson, A.O.; Bair, K.L.; White, A.N.; Armbruster, C.E. Polymicrobial interactions in the urinary tract: Is the enemy of my enemy my friend? *Infect. Immun.* **2021**, *89*, e00652–20. [CrossRef]
57. Ramsay, K.A.; Wardell, S.J.T.; Patrick, W.M.; Brockway, B.; Reid, D.W.; Winstanley, C.; Bell, S.C.; Lamont, I.L. Genomic and phenotypic comparison of environmental and patient-derived isolates of *Pseudomonas aeruginosa* suggest that antimicrobial resistance is rare within the environment. *J. Med. Microbiol.* **2019**, *68*, 1591–1595. [CrossRef] [PubMed]
58. Chávez-Jacobo, V.M.; Hernández-Ramírez, K.C.; Romo-Rodríguez, P.; Viridiana Pérez-Gallardo, R.; Campos-García, J.; Félix Gutiérrez-Corona, J.; Pablo García-Merinos, J.; Meza-Carmen, V.; Silva-Sánchez, J.; Ramírez-Díaz, M.I. CrpP Is a Novel Ciprofloxacin-Modifying Enzyme Encoded by the *Pseudomonas aeruginosa* pUM505 Plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e02629–17. [CrossRef]
59. Zubyk, H.L.; Wright, G.D. Crpp is not a fluoroquinolone-inactivating enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2021**, *65*, e00773–21. [CrossRef]
60. Sánchez-Martínez, G.; Garza-Ramos, U.J.; Reyna-Flores, F.L.; Gaytán-Martínez, J.; Lorenzo-Bautista, I.G.; Silva-Sánchez, J. In169, A New Class I Integron that Encoded blaIMP-18 in a Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolate from Mexico. *Arch. Med. Res.* **2010**, *41*, 235–239. [CrossRef]
61. Touati, M.; Diene, S.M.; Dekhil, M.; Djahoudi, A.; Racherache, A.; Rolain, J.M. Dissemination of a class I integron carrying VIM-2 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital intensive care unit in Annaba Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 2426–2427. [CrossRef]
62. el Salabi, A.; Toleman, M.A.; Weeks, J.; Bruderer, T.; Frei, R.; Walsh, T.R. First report of the metallo- β -lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 582. [CrossRef]
63. Ramirez, D.G.; Nicola, F.; Zarate, S.; Rellosa, S.; Smayevsky, J.; Arduino, S. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* with KPC-type carbapenemase in a teaching hospital: An 8-year study. *J. Med. Microbiol.* **2013**, *62*, 1565–1570. [CrossRef]

64. Tohya, M.; Tada, T.; Watanabe, S.; Kuwahara-Arai, K.; Zin, K.N.; Zaw, N.N.; Aung, M.Y.; Mya, S.; Zan, K.N.; Kirikae, T.; et al. Emergence of carbapenem-resistant *Pseudomonas asiatica* producing NDM-1 and VIM-2 Metallo-Lactamases in Myanmar. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e00475-19. [CrossRef] [PubMed]
65. Partridge, S.R.; Kwong, S.M.; Firth, N.; Jensen, S.O. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **2018**, *31*, e00088-17. [CrossRef] [PubMed]
66. López, M.; Rojo-Bezares, B.; Chichón, G.; Sáenz, Y. Resistance to Fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa* from Human, Animal, Food and Environmental Origin: The Role of CrpP and Mobilizable ICs. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1271. [CrossRef] [PubMed]
67. Ramsamy, Y.; Mlisana, K.P.; Amoako, D.G.; Abia, A.L.K.; Ismail, A.; Allam, M.; Mbanga, J.; Singh, R.; Essack, S.Y. Mobile genetic elements-mediated Enterobacterales-associated carbapenemase antibiotic resistance genes propagation between the environment and humans: A One Health South African study. *Sci. Total Environ.* **2022**, *806*, 150641. [CrossRef]
68. Shintani, M.; Sanchez, Z.K.; Kimbara, K. Genomics of microbial plasmids: Classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 242. [CrossRef] [PubMed]
69. van Belkum, A.; Soriaga, L.B.; LaFave, M.C.; Akella, S.; Veyrieras, J.B.; Barbu, E.M.; Shortridge, D.; Blanc, B.; Hannum, G.; Zambardi, G.; et al. Phylogenetic distribution of CRISPR-Cas systems in antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* **2015**, *6*, e01796-15. [CrossRef]
70. Shehreen, S.; Chyou, T.Y.; Fineran, P.C.; Brown, C.M. Genome-wide correlation analysis suggests different roles of CRISPR-Cas systems in the acquisition of antibiotic resistance genes in diverse species. *Phil. Trans. R. Soc. B* **2019**, *374*, 20180384. [CrossRef]
71. Bondy-Denomy, J.; Garcia, B.; Strum, S.; Du, M.; Rollins, M.F.; Hidalgo-Reyes, Y.; Wiedenheft, B.; Maxwell, K.L.; Davidson, A.R. Multiple mechanisms for CRISPR-Cas inhibition by anti-CRISPR proteins. *Nature* **2015**, *526*, 136–139. [CrossRef]
72. Wheatley, R.M.; MacLean, R.C. CRISPR-Cas systems restrict horizontal gene transfer in *Pseudomonas aeruginosa*. *ISME J.* **2021**, *15*, 1420–1433. [CrossRef]
73. Pinilla-Redondo, R.; Mayo-Muñoz, D.; Russel, J.; Garrett, R.A.; Randau, L.; Sørensen, S.J.; Shah, S.A. Type IV CRISPR-Cas systems are highly diverse and involved in competition between plasmids. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 2000–2012. [CrossRef] [PubMed]
74. Pinilla-Redondo, R.; Russel, J.; Mayo-Muñoz, D.; Shah, S.A.; Garrett, R.A.; Nesme, J.; Madsen, J.S.; Fineran, P.C.; Sørensen, S.J. CRISPR-Cas systems are widespread accessory elements across bacterial and archaeal plasmids. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, 4315–4328. [CrossRef] [PubMed]
75. Kamruzzaman, M.; Iredell, J.R. CRISPR-Cas System in Antibiotic Resistance Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol.* **2020**, *10*, 2934. [CrossRef]
76. Almendros, C.; Guzmán, N.M.; García-Martínez, J.; Mojica, F.J.M. Anti-cas spacers in orphan CRISPR4 arrays prevent uptake of active CRISPR-Cas I-F systems. *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, 16081. [CrossRef] [PubMed]
77. Li, H.; Luo, Y.F.; Williams, B.J.; Blackwell, T.S.; Xie, C.M. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies. *Int. J. Med. Microbiol.* **2012**, *302*, 63–68. [CrossRef]
78. Lister, P.D.; Wolter, D.J.; Hanson, N.D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22*, 582–610. [CrossRef] [PubMed]
79. González-Vázquez, M.C.; Rocha-Gracia, R.D.C.; Carabarin-Lima, A.; Bello-López, E.; Huerta-Romano, F.; Martínez-Laguna, Y.; Lozano-Zarain, P. Location of OprD porin in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *APMIS* **2021**, *129*, 213–224. [CrossRef]
80. Epp, S.F.; Köhler, T.; Plésiat, P.; Michéa-Hamzehpour, M.; Frey, J.; Pechère, J.C. C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 1780–1787. [CrossRef]
81. López-Causapé, C.; Sommer, L.M.; Cabot, G.; Rubio, R.; Ocampo-Sosa, A.A.; Johansen, H.K.; Figuerola, J.; Cantón, R.; Kidd, T.J.; Molin, S.; et al. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* mutational resistome in an international Cystic Fibrosis clone. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5555. [CrossRef]
82. Martínez, J.L. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc. Biol. Sci.* **2009**, *276*, 2521–2530. [CrossRef]
83. Berrazeg, M.; Jeannot, K.; Ntsogo Enguéné, V.Y.; Broutin, I.; Loeffert, S.; Fournier, D.; Plésiat, P. Mutations in β -lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 6248–6255. [CrossRef] [PubMed]
84. Jouault, A.; Saliba, A.M.; Touqui, L. Modulation of the immune response by the *Pseudomonas aeruginosa* type-III secretion system. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 1806. [CrossRef] [PubMed]
85. Foulkes, D.M.; McLean, K.; Haneef, A.S.; Fernig, D.G.; Winstanley, C.; Berry, N.; Kaye, S.B. *Pseudomonas aeruginosa* toxin ExoU as a therapeutic target in the treatment of bacterial infections. *Microorganisms* **2019**, *7*, 707. [CrossRef]
86. Diaz, M.H.; Shaver, C.M.; King, J.D.; Musunuri, S.; Kazzaz, J.A.; Hauser, A.R. *Pseudomonas aeruginosa* induces localized immunosuppression during pneumonia. *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 4414–4421. [CrossRef]
87. Hauser, A.R.; Cobb, E.; Bodí, M.; Mariscal, D.; Vallés, J.; Engel, J.N.; Rello, J. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit. Care Med.* **2002**, *30*, 521–528. [CrossRef] [PubMed]
88. Stewart, R.M.K.; Wiehlmann, L.; Ashelford, K.E.; Preston, S.J.; Frimmersdorf, E.; Campbell, B.J.; Neal, T.J.; Hall, N.; Tuft, S.; Kaye, S.B.; et al. Genetic characterization indicates that a specific subpopulation of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with keratitis infections. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 993–1003. [CrossRef]

89. Yousefi-Avarvand, A.; Khashei, R.; Sedigh Ebrahim-Saraie, H.; Emami, A.; Zomorodian, K.; Motamedifar, M. The Frequency of Exotoxin A and Exoenzymes S and U Genes Among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Shiraz, Iran. *Int. J. Mol. Cell Med.* **2015**, *4*, 167–173.
90. Hassuna, N.A.; Mandour, S.A.; Mohamed, E.S. Virulence constitution of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in upper Egypt. *Infect. Drug Resist.* **2020**, *13*, 587–595. [CrossRef]
91. Horna, G.; Amaro, C.; Palacios, A.; Guerra, H.; Ruiz, J. High frequency of the *exoU+*/*exoS+* genotype associated with multidrug-resistant “high-risk clones” of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Peruvian hospitals. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10874. [CrossRef]
92. Hauser, A.R. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by injection. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 654–665. [CrossRef]
93. Feltman, H.; Schuler, G.; Khan, S.; Jain, M.; Peterson, L.; Hauser, A.R. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **2001**, *147*, 2659–2669. [CrossRef] [PubMed]
94. Elmouaden, C.; Laglaoui, A.; Ennane, L.; Bakkali, M.; Abid, M. Virulence genes and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in the Northwestern of Morocco. *J. Infect. Dev. Ctries* **2019**, *13*, 892–898. [CrossRef] [PubMed]
95. Boulant, T.; Boudehen, Y.M.; Filloux, A.; Plesiat, P.; Naas, T.; Dortet, L. Higher Prevalence of PldA, a *Pseudomonas aeruginosa* Trans-Kingdom H2-Type VI Secretion System Effector, in Clinical Isolates Responsible for Acute Infections and in Multidrug Resistant Strains. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2578. [CrossRef] [PubMed]
96. Wilderman, P.J.; Vasil, A.I.; Johnson, Z.; Vasil, M.L. Genetic and biochemical analyses of a eukaryotic-like phospholipase D of *Pseudomonas aeruginosa* suggest horizontal acquisition and a role for persistence in a chronic pulmonary infection model. *Mol. Microbiol.* **2001**, *39*, 291–304. [CrossRef] [PubMed]
97. Alva, P.P.; Raj, J.M.; Karunasagar, I.; Premanath, R. Environmental and clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates with pooled presence of *exo S*, *exo U*, *exo T* and *exo Y* genes. *J. Pure Appl. Microbiol.* **2018**, *12*, 1119–1124. [CrossRef]
98. Radó, J.; Kaszab, E.; Petrovics, T.; Pászti, J.; Kriszt, B.; Szoboszlai, S. Characterization of environmental *Pseudomonas aeruginosa* using multilocus sequence typing scheme. *J. Med. Microbiol.* **2017**, *66*, 1457–1466. [CrossRef]
99. Andrews, S. FastQC—A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed on 28 February 2021).
100. Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Pribelski, A.D.; et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* **2012**, *19*, 455–477. [CrossRef]
101. Gurevich, A.; Saveliev, V.; Vyahhi, N.; Tesler, G. QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 1072–1075. [CrossRef]
102. Seemann, T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2068–2069. [CrossRef]
103. Larsen, M.V.; Cosentino, S.; Rasmussen, S.; Friis, C.; Hasman, H.; Marvig, R.L.; Jelsbak, L.; Sicheritz-Pontén, T.; Ussery, D.W.; Aarestrup, F.M.; et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 1355–1361. [CrossRef]
104. Francisco, A.P.; Vaz, C.; Monteiro, P.T.; Melo-Cristino, J.; Ramirez, M.; Carriço, J.A. SOFTWARE Open Access PHYLOViZ: Phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. *BMC Bioinform.* **2012**, *13*, 87. [CrossRef] [PubMed]
105. Page, A.J.; Cummins, C.A.; Hunt, M.; Wong, V.K.; Reuter, S.; Holden, M.T.G.; Fookes, M.; Falush, D.; Keane, J.A.; Parkhill, J. Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 3691–3693. [CrossRef] [PubMed]
106. Draw Venn Diagram. Available online: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/> (accessed on 5 March 2023).
107. Treangen, T.J.; Ondov, B.D.; Koren, S.; Phillippy, A.M. The harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 87. [CrossRef] [PubMed]
108. Letunic, I.; Bork, P. Interactive tree of life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, W293–W296. [CrossRef] [PubMed]
109. Madeira, F.; Park, Y.M.; Lee, J.; Buso, N.; Gur, T.; Madhusoodanan, N.; Basutkar, P.; Tivey, A.R.N.; Potter, S.C.; Finn, R.D.; et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W636–W641. [CrossRef]
110. Gentleman, R.C.; Carey, V.J.; Bates, D.M.; Bolstad, B.; Dettling, M.; Dudoit, S.; Ellis, B.; Gautier, L.; Ge, Y.; Gentry, J.; et al. Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* **2004**, *5*, R80. [CrossRef]
111. Wickham, H. *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*; Springer-Verlag: New York, NY, USA, 2016; ISBN 978-3-319-24277-4.
112. RStudio Team RStudio: Integrated Development for R. Available online: <http://www.rstudio.com/> (accessed on 21 February 2023).
113. Chen, L.; Yang, J.; Yu, J.; Yao, Z.; Sun, L.; Shen, Y.; Jin, Q. VFDB: A reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, D325–D328. [CrossRef]
114. Liu, M.; Li, X.; Xie, Y.; Bi, D.; Sun, J.; Li, J.; Tai, C.; Deng, Z.; Ou, H.Y. ICEberg 2.0: An updated database of bacterial integrative and conjugative elements. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D660–D665. [CrossRef]
115. Johansson, M.H.K.; Bortolaia, V.; Tansirichaiya, S.; Aarestrup, F.M.; Roberts, A.P.; Petersen, T.N. Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *J. Antimicrob. Chemother.* **2021**, *76*, 101–109. [CrossRef]

116. Vielva, L.; de Toro, M.; Lanza, V.F.; de La Cruz, F. PLACNETw: A web-based tool for plasmid reconstruction from bacterial genomes. *Bioinformatics* **2017**, *33*, 3796–3798. [[CrossRef](#)]
117. Garcillán-Barcia, M.P.; Redondo-Salvo, S.; Vielva, L.; de la Cruz, F. MOBscan: Automated Annotation of MOB Relaxases. *Methods Mol. Biol.* **2020**, *2075*, 295–308. [[PubMed](#)]
118. Couvin, D.; Bernheim, A.; Toffano-Nioche, C.; Touchon, M.; Michalik, J.; Néron, B.; Rocha, E.P.C.; Vergnaud, G.; Gautheret, D.; Pourcel, C. CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W246–W251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Yi, H.; Huang, L.; Yang, B.; Gomez, J.; Zhang, H.; Yin, Y. AcrFinder: Genome mining anti-CRISPR operons in prokaryotes and their viruses. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, W358–W365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

ACTIVIDADES DESARROLLADAS DURANTE EL DOCTORADO

Publicaciones

Gómez-Martínez J, Rocha-Gracia RDC, Bello-López E, Cevallos MA, Castañeda-Lucio M, Sáenz Y, Jiménez-Flores G, Cortés-Cortés G, López-García A, Lozano-Zarain P. Comparative Genomics of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Different Ecological Niches. *Antibiotics* (Basel). 2023 May 7;12(5):866. doi: 10.3390/antibiotics12050866. PMID: 37237769; PMCID: PMC10215170.

Gómez-Martínez J, Rocha-Gracia RDC, Bello-López E, Cevallos MA, Castañeda-Lucio M, López-García A, Sáenz Y, Jiménez-Flores G, Cortés-Cortés G, Lozano-Zarain P. A. Plasmid Carrying *bla*_{IMP-56} in *Pseudomonas aeruginosa* Belonging to a Novel Resistance Plasmid Family. *Microorganisms*. 2022 Sep 17;10(9):1863. doi: 10.3390/microorganisms10091863. PMID: 36144465; PMCID: PMC9501424.

Registros en el NCBI

Gomez-Martinez, J., Rocha-Gracia, R.C., Bello-Lopez, E., Cevallos, M.A., Castaneda-Lucio, M., Saenz, Y., Jimenez-Flores, G., Cortes-Cortes, G. and Lozano-Zarain, P. *Pseudomonas aeruginosa* strain PE21, whole genome shotgun sequencing project. Submitted: 27-FEB-2023. Número de acceso: JARDUV000000000.1.

Gomez-Martinez, J., Rocha-Gracia, R.C., Bello-Lopez, E., Cevallos, M.A., Castaneda-Lucio, M., Saenz, Y., Jimenez-Flores, G., Cortes-Cortes, G. and Lozano-Zarain, P. *Pseudomonas aeruginosa* strain PE52, whole genome shotgun sequencing project. Submitted: 27-FEB-2023. Número de acceso: JARDUU000000000.

Gomez-Martinez, J., Rocha-Gracia, R.C., Bello-Lopez, E., Cevallos, M.A., Castaneda-Lucio, M., Saenz, Y., Jimenez-Flores, G., Cortes-Cortes, G. and Lozano-Zarain, P. *Pseudomonas aeruginosa* strain PE63, whole genome shotgun sequencing project. Submitted: 27-FEB-2023. Número de acceso: JARDUW000000000.

Gomez-Martinez, J., Rocha-Gracia, R.C., Bello-Lopez, E., Cevallos, M.A., Castaneda-Lucio, M., Saenz, Y., Jimenez-Flores, G., Cortes-Cortes, G. and Lozano-Zarain, P. *Pseudomonas aeruginosa* strain PE83, whole genome shotgun sequencing project. Submitted: 27-FEB-2023. Número de acceso: JARDUX000000000.

Gomez-Martinez, J., Rocha-Gracia, R.C., Bello-Lopez, E., Cevallos, M.A., Castaneda-Lucio, M., Saenz, Y., Jimenez-Flores, G., Cortes-Cortes, G. and Lozano-Zarain, P. *Pseudomonas aeruginosa* strain PE151 subclass B1 metallo-beta-lactamase IMP-99 (blaIMP) gene, blaIMP-99 allele, complete cds. Submitted 25-FEB-2023. Número de acceso: OQ533023.1.

Gomez-Martinez, J., Rocha-Gracia, R.C., Bello-Lopez, E., Cevallos, M.A., Castaneda-Lucio, M., Lopez-Garcia, A., Saenz, Y., Jimenez-Flores, G., Cortes-Cortes, G. and Lozano-Zarain, P. *Pseudomonas aeruginosa* strain PE52 plasmid pPE52IMP, complete sequence. Submitted: 08-AUG-2022. Número de acceso: CP102481.

Presentaciones en congresos

Jessica Gómez-Martínez, Rosa del Carmen Rocha-Gracia, Elena Bello-López, Miguel Castañeda-Lucio, Miguel Cevallos-Gaos, Alma López-García, Yolanda Saenz-Dominguez, Margarita Arenas-Hernández, Guadalupe Jiménez-Flores, Patricia Lozano-Zarain. Comparative genomics and plasmid analysis of strains of *Pseudomonas aeruginosa*. VII Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias. Oral. 8 al 12 de octubre del 2023, San Miguel de Allende, Gto.

Jessica Gómez Martínez, Rosa Del Carmen Rocha Gracia, Elena Bello López, Miguel Castañeda Lucio, Guadalupe Jiménez Flores, Patricia Lozano Zarain. Elementos genéticos móviles implicados en la multidrogorresistencia de *P. aeruginosa*. XLVII congreso nacional de infectología y microbiología clínica. Póster. 24 al 27 de mayo del 2023, Boca del Rio, Veracruz.

Jessica Gómez Martínez, Rosa Del Carmen Rocha Gracia, Miguel Castañeda Lucio, Yolanda Saenz Dominguez, Guadalupe Jiménez Flores, Margarita Maria de la Paz Arenas Hernandez, Patricia Lozano Zarain. Elementos genéticos móviles portadores de genes de resistencia en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de un hospital. Póster. XL Congreso interamericano de infectología pediátrica “Dr. Raúl Romero Cabello”. 17 al 19 de noviembre del 2022, Guadalajara, Jalisco.

Jessica Gómez Martínez, Rosa del Carmen Rocha Gracia, Elena Bello López, Miguel Castañeda Lucio, Miguel Angel Cevallos Gaos, Yolanda Saenz Dominguez, Guadalupe Jimenez Flores, Patricia Lozano Zarain. Análisis genómico de una *Pseudomonas aeruginosa* portando blaIMP-18 y blaIMP-83 aislada de un hospital poblano. Póster. XLVI Congreso nacional de infectología y microbiología clínica. 25 al 28 de mayo del 2022, San Luis Potosí.

Jaime Alberto Jiménez Villalpando, **Jessica Gómez Martínez**, Rosa del Carmen Rocha-Gracia, Elena Bello López, Claudia Fabiola Martínez de la Peña, Patricia

Lozano Zarain. Análisis bioinformático de plásmidos portadores de carbapenemasas *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA-23} y *bla*_{OXA-72} en *Acinetobacter baumannii*. XLVI Congreso nacional de infectología y microbiología clínica. Póster. 25 al 28 de mayo del 2022, San Luis Potosí.

Jessica Gómez Martínez. Presentación oral “Estudio de plásmidos portadores de carbapenemasas de *Pseudomonas aeruginosa*”, en la I Reunión de la red CYTED/Re-Eskape. 19 de abril del 2022, Lima, Perú.

Jessica Gómez Martínez, Rosa del Carmen Rocha Gracia, Miguel Castañeda Lucio, Miguel Angel Cevallos Gaos, Yolanda Saenz Dominguez, Margarita Maria de la Paz Arenas Hernandez, Guadalupe Jimenez Flores, Patricia Lozano Zarain. Estudio de plásmidos portadores de carbapenemasa de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de un hospital poblano. XLV Congreso nacional de infectología y microbiología clínica. 28 de mayo al 4 de junio del 2021. Póster. Obtención del tercer lugar en el concurso de Trabajos Libres, Categoría Investigación Básica.

Jessica Gómez Martínez, Rosa del Carmen Rocha Gracia, Maria Elena Bello López, Miguel Castañeda Lucio, Miguel Angel Cevallos Gaos, Yolanda Saenz Domínguez, Margarita Maria de la Paz Arenas Hernández, Guadalupe Jimenez Flores, Patricia Lozano Zaráin. Análisis comparativo del resistoma y viruloma de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de diferentes nichos ecológicos. XXV Congreso latinoamericano de microbiología. 25 al 28 de agosto del 2021, Asunción, Paraguay. Póster.

Midory Sánchez Rentería, **Jessica Gómez Martínez,** Rosa del Carmen Rocha Gracia, Guadalupe Jiménez Flores, Patricia Lozano Zarain. Estudio de la resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de infecciones nosocomiales. Póster. 3er Congreso nacional de ciencias bioquímicas y XXIV Semana del día del químico. 28 de noviembre, Caborca, Sonora.

Cursos y talleres

1. Introducción a la bioinformática clínica y traslacional (teórico). 2023. Universidad de Buenos Aires.
2. Interpretación del antibiograma: del laboratorio a la práctica clínica. 2023. Consejo mexicano de certificación en infectología, A.C.
3. Taller Ensamble y Anotación de Genomas y Metagenomas. 2020. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
4. Escribe y publica tu trabajo científico. 2020. Instituto Nacional de Medicina Genómica.
5. La resistencia antimicrobiana un problema mundial. 2020.

Programa de Aseguramiento de la Calidad (PACAL).

6. Curso 02. Diseño experimental y análisis de datos genómicos y transcriptómicos. 2019

Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

7. Bacterial genomes: from DNA to protein function using bioinformatic. 2019. WELLCOME GENOME CAMPUS ADVANCED SOURSES AND SCIENTIFIC CONFERENCES.

Actividades de difusión y divulgación

Colaborador en el recorrido "El símbolo de la resistencia: las Superbacterias", durante el Puertas abiertas BUAP 2022. 3 de diciembre del 2022, BUAP, Puebla.

Podcast "Hablemos claro: Resistencia bacteriana a los antibióticos", en el Primer concurso de infografías y podcast de divulgación del ICUAP. Noviembre 2022, BUAP, Puebla.

Participación en el proyecto red CYTED P22ORTO168 "Monitorización de la resistencia a antibióticos en microorganismos del grupo ESKAPE: Comparación pre y post COVID-19). 11 de diciembre del 2020 a diciembre 2024.