



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

---

**Análisis de las plataformas genéticas de  
movilización de genes de resistencia en el clon  
de *Pseudomonas aeruginosa* ST235 causante de  
infecciones en Colombia**

**Deisy Julieth Abril Riaño**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología  
Bogotá D.C., Colombia

2016

# **Análisis de las plataformas genéticas de movilización de genes de resistencia en el clon de *Pseudomonas aeruginosa* ST235 causante de infecciones en Colombia**

**Deisy Julieth Abril Riaño**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar por el título de:  
**Magister en Ciencias - Microbiología**

Directora:

PhD(c). MSc. Betsy Castro Cardozo

Codirector

PhD. Jaime Eduardo Castellanos Parra

Línea de investigación:

Biología molecular de agentes infecciosos

Grupo de investigación:

Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana- Universidad El Bosque

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología

Bogotá D.C., Colombia

2016

# Agradecimientos

Gracias a Dios por permitirme culminar mi formación a este nivel académico, a mis padres Adriana Riaño Buitrago y Eder Ensuncho Díaz por brindarme las bases personales y académicas para llevar a buen término este proceso y a mis abuelos, especialmente a Pedro Pablo Abril Abril y Eulalia Sánchez de Abril, por sus esfuerzos y su apoyo incondicional en cada uno de mis niveles educativos incluyendo mi posgrado. Gracias también a Néstor Alberto Saray Franco y a su familia, quienes me han acompañado estos años y han sido fundamentales para la realización y culminación de este proyecto.

Agradezco a mis tutores por el tiempo dedicado para la realización de este trabajo de grado, de manera especial a mi directora Betsy Castro Cardozo, quien con su ejemplo, enseñanza y dedicación me ha orientado y apoyado a lo largo de mi proceso de formación académica y permitió mi vinculación en este proyecto.

Gracias a cada uno de los integrantes del Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana (LGMB), los cuales han aportado su conocimiento en cada uno de los objetivos de este trabajo, especialmente a Javier Escobar Pérez por su ayuda y guía para el cumplimiento de mis objetivos y Alejandro Márquez Ortiz por brindarme las herramientas metodológicas y su disposición en solucionar cada una de mis dudas.

Agradezco al Dr. Emiliano Barreto del Centro de Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia por permitirme el uso de su servidor para procesar los resultados de relación filogenética y a Hermes Pérez Cardona por su ayuda durante el proceso. Gracias también a Socorro Prieto Franco por su acompañamiento y ayuda en estos dos años de formación y a cada uno de mis docentes de los cuales aprendí nuevos conocimientos que fueron esenciales para la realización de este trabajo.

Este trabajo no hubiera sido posible sin la participación de los investigadores, médicos y monitores de las instituciones y los laboratorios clínicos participantes y la financiación del proyecto “Análisis genómico comparativo y evaluación de la capacidad patogénica de 9 especies bacterianas de alto impacto clínico en Colombia” financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación COLCIENCIAS Código 130865741107- 607-2014 y la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad El Bosque.



## Resumen

**Introducción:** El clon de *Pseudomonas aeruginosa* con tipo de secuencia 235 (ST235) es uno de los clones con resistencia a múltiples antibióticos y de mayor diseminación mundial. Este clon tiene una extraordinaria capacidad de adquirir elementos genéticos móviles, lo cual está asociado a la adquisición de genes de resistencia.

**Objetivo:** Comparar la estructura genética de las plataformas de movilización de genes de resistencia del clon de *Pseudomonas aeruginosa* ST235, causantes de infecciones en Colombia respecto a los clones reportados a nivel mundial.

**Materiales y Métodos:** Se analizaron aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de infecciones en cinco UCI de cinco ciudades de Colombia. Se evaluó su perfil de resistencia y la presencia de 32 determinantes de resistencia asociados a los principales antibióticos de uso clínico. La relación genética se determinó por PFGE y MLST. De estos, se seleccionó un aislamiento representativo del clon ST235 (24pae112), se secuenció su genoma por PacBio-RS-II, se identificaron y analizaron sus plataformas de movilización de genes de resistencia y se comparó con 44 genomas ST235 reportados.

**Resultados:** De los 58 aislamientos analizados, 9(15,5%) presentaron un perfil de multiresistencia y 27(46,5%) fueron resistentes a carbapenémicos, de los cuales 6(10,3%) se asociaron a *bla<sub>VIM</sub>* y 4(6,9%) a *bla<sub>KPC-2</sub>*, estos últimos pertenecientes al ST235. El tamaño del genoma de 24pae112 (ST235) fue de 7'097.241pb, en el cual se identificaron 12(0,2%) genes de resistencia, y múltiples EGM que incluyeron: cinco transposones *Tn6162-like* con *aadB*, dos *Tn402-like*, uno con *aadA1* y otro con *bla<sub>OXA-2</sub>*, y dos *Tn4401b* cada uno con *bla<sub>KPC-2</sub>*, siete islas genómicas y seis profagos.

**Conclusión:** La resistencia en el clon de *Pseudomonas aeruginosa* ST235 está dada principalmente por la ganancia de múltiples genes de resistencia a través de la adquisición de diferentes plataformas genéticas (transposones, integrones, profagos e islas genómicas), algunas de ellas en un modelo de "russian doll". Este fenómeno podría ser un factor clave en su alta capacidad de diseminación y persistencia.

**Palabras claves:** *Pseudomonas aeruginosa* ST235, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *Tn4401b*, integrón clase 1, transposón, isla genómica.

## Abstract

**Introduction:** *Pseudomonas aeruginosa* clone with sequence type 235 (ST235) is one of the clones with resistance to multiple antibiotics and of greater worldwide dissemination. This clone has an extraordinary ability to acquire mobile genetic elements (MGE), which is associated with the acquisition of resistance genes.

**Objective:** Compare the genetic structure of the resistance gene mobilization platforms of the *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone, which cause infections in Colombia with respect to the clones reported worldwide.

**Materials and Methods:** *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing infections in five ICUs from five cities in Colombia. Its resistance profile and the presence of 32 resistance determinants associated to the main antibiotics of clinical use were evaluated. The genetic relationship was determined by PFGE and MLST. Of these, a representative isolate of the ST235 clone (24pae112) was selected, its genome was sequenced by PacBio-RS-II, its resistance gene mobilization platforms were identified and analyzed and compared with 44 reported ST235 genomes.

**Results:** Of the 58 isolates analyzed, 9(15.5%) presented a multiresistance profile and 27(46.5%) were carbapenem-resistant, of which 6(10.3%) were associated with *bla<sub>VIM</sub>* and 4(6.9%) to *bla<sub>KPC-2</sub>*, the latter belonging to ST235. The genome size of 24pae112 (ST235) was 7'097.241pb, in which 12(0.2%) resistance genes were identified, and multiple MGEs included: five Tn6162-like transposons with *aadB*, two Tn402-like, One with *aadA1* and one with *bla<sub>OXA-2</sub>*, and two Tn4401b each with *bla<sub>KPC-2</sub>*, seven genomic islands and six prophages.

**Conclusion:** Resistance in the *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone is mainly due to the gain of multiple resistance genes through the acquisition of different genetic platforms (transposons, integrones, prophages and genomic islands), some of them in a model of "russian doll ". This phenomenon could be a key factor in its high capacity for dissemination and persistence.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, ST235, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, Tn4401b, integron class I integron, transposon, genomic island.

# Contenido

Resumen.....	VII
Abstract.....	VIII
Lista de figuras.....	XI
Lista de tablas.....	XIII
Lista de abreviaturas.....	XIV
1 Introducción.....	1
2 Marco teórico.....	3
Generalidades.....	3
Principales mecanismos de resistencia a antibióticos de uso clínico.....	4
2.1.1 Resistencia a $\beta$ -lactámicos.....	4
2.1.2 Resistencia a fluoroquinolonas.....	8
2.1.3 Resistencia a aminoglicósidos.....	9
2.1.4 Resistencia a polimixinas.....	9
Plataformas genéticas móviles.....	10
2.1.5 Secuencias de inserción y transposones.....	10
2.1.6 Islas genómicas.....	12
2.1.7 Plásmidos.....	13
2.1.8 Profagos.....	14
Epidemiología y clones.....	15
Epidemiología en América Latina.....	16
3 Justificación.....	18
4 Objetivos.....	21
Objetivo general.....	21
Objetivos específicos.....	21
5 Materiales y métodos.....	22
Tipo de estudio y obtención de los aislamientos bacterianos.....	22
Extracción de ADN bacteriano para caracterización molecular y secuenciación genómica.....	23
Confirmación molecular de género y especie.....	24
Determinación de la concentración inhibitoria mínima.....	24
Determinación molecular de genes de resistencia.....	25
5.1.1 Determinación de genes de resistencia a antibióticos $\beta$ -lactámicos: $\beta$ -lactamasas de espectro extendido y AmpC plasmídico.....	25
5.1.2 Determinación de genes de resistencia a aminoglicósidos.....	26
5.1.3 Amplificación de genes de resistencia a quinolonas y sulfonamidas.....	27

Determinación de integrasas clase 1, 2 y 3.....	27
Determinación de la relación genética en los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> .....	27
Secuenciación y ensamblaje del genoma de <i>P. aeruginosa</i> ST235 .....	29
Análisis de genómica comparativa de <i>P. aeruginosa</i> ST235.....	30
5.1.4 Creación del árbol filogenético .....	30
5.1.5 Identificación del resistoma .....	31
5.1.6 Identificación de elementos genéticos móviles.....	31
6 Resultados .....	33
Origen de los aislamientos.....	33
Determinación del perfil de resistencia.....	34
Identificación de determinantes de resistencia.....	36
Identificación de integrasas.....	37
Relación genética .....	39
Secuenciación del aislamiento 24pae112 perteneciente al clon de <i>P. aeruginosa</i> ST235.....	40
Relación filogenética de 24pae112 con otros genomas ST235.....	42
6.1.1 Relación filogenética del genoma “core”.....	42
6.1.2 Relación genética del genoma accesorio .....	44
Resistoma de <i>P. aeruginosa</i> ST235.....	46
Elementos genéticos móviles de 24pae112 .....	49
6.1.3 Tn6162-like .....	52
6.1.4 Tn402-like .....	53
6.1.5 Tn4401b.....	55
6.1.6 Otros elementos genéticos móviles de 24pae112 .....	58
7 Discusión.....	60
8 Conclusiones y recomendaciones .....	65
9 Anexos .....	66
Anexo A: Características generales de las secuencias de <i>P. aeruginosa</i> ST235 ...	66
Anexo B: Concentración inhibitoria mínima y determinantes de resistencia de los aislamientos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	68
Anexo C: Identificación de la región variable de los integrones clase 1 en los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> .....	70
Anexo D: Circularización del genoma de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 24pae112.....	71
Anexo E: Zona de “circularización” del genoma de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 24pae112.....	72
Anexo F: Certificado de presentación de resultados en congreso internacional....	73
Anexo G: Certificado de presentación de resultados en congreso nacional. ....	74
10 Referencias bibliográficas .....	75



## Lista de figuras

	Pag.
<b>Figura 1.</b> Estructura general de las secuencias de inserción, transposones e integrones.	11
<b>Figura 2.</b> Distribución internacional de los clones de alto riesgo epidemiológico de <i>P. aeruginosa</i> .	16
<b>Figura 3:</b> Diagrama de flujo de la metodología empleada en el estudio.	23
<b>Figura 4.</b> Perfil de resistencia de los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> causantes de infección en UCI.	35
<b>Figura 5.</b> Perfil de co-resistencia de los 35 aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> por grupo de antibióticos.	36
<b>Figura 6:</b> Porcentaje de resistencia a las principales familias de antibióticos y su correlación genotípica en los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i>	37
<b>Figura 7.</b> Determinación de genes de resistencia en integrones de <i>P. aeruginosa</i>	38
<b>Figura 8:</b> Dendograma de los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> .	40
<b>Figura 9:</b> Árbol filogenético de aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> ST235 obtenido a partir del core-genoma por el método de máxima parsimonia (MP).	43
<b>Figura 10:</b> Árbol filogenético del genoma accesorio de aislamientos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ST235 obtenido a partir del método de máxima verosimilitud (ML).	45
<b>Figura 11:</b> Resistoma de <i>P. aeruginosa</i> ST235.	48
<b>Figura 12:</b> Islas genómicas, profagos y plataformas de movilización de genes de resistencia de <i>24pae112</i> .	51
<b>Figura 13:</b> Estructura de transposón Tn6162-like de <i>P. aeruginosa</i> <i>24pae112</i> .	52
<b>Figura 14:</b> Estructura general del ambiente genómico de los genes de resistencia <i>aadB</i> y <i>sul1</i> de <i>24pae112</i> .	53
<b>Figura 15:</b> Estructura de los transposones Tn402-like de <i>P. aeruginosa</i> <i>24pae112</i> .	54
<b>Figura 16:</b> Estructura genética del transposón Tn402.	54
<b>Figura 17:</b> Estructura general del ambiente genómico de los genes de resistencia <i>aadA1</i> , <i>sul1</i> , <i>bla<sub>OXA-2</sub></i> de <i>24pae112</i>	55
<b>Figura 18:</b> Estructura de los transposones Tn4401b de <i>P. aeruginosa</i>	56

24pae112.

**Figura 19:** Estructura general del ambiente genómico de las dos copias del gen de resistencia *bla*<sub>KPC-2</sub> de 24pae112. 56

**Figura 20:** Identificación del sitio de inserción de la isla genómica GI-4 en *P. aeruginosa* DK2 y 24pae112 y del transposón *Tn4401b* en GI-4. 57

**Figura 21:** Mapa lineal del plásmido de 70,6kb aislado de *K. pneumoniae* S9. 63

**Figura anexo D:** Circularización del genoma de *Pseudomonas aeruginosa* 24pae112 71

**Figura anexo E:** Zona de “circularización” del genoma de *P. aeruginosa* 24pae112. 72

## Lista de tablas

	Pag.
<b>Tabla 1.</b> Clasificación de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido según nomenclatura de Ambler y Bush.	6
<b>Tabla 2.</b> Islas genómicas más frecuentes en <i>P. aeruginosa</i> .	13
<b>Tabla 3.</b> Bacteriófagos frecuentes de <i>P. aeruginosa</i> .	14
<b>Tabla 4.</b> Características generales de la población de estudio.	33
<b>Tabla 5.</b> Características del genoma ensamblado de 24pae112.	41
<b>Tabla 6.</b> Elementos genéticos móviles de 24pae112.	49
<b>Tabla anexo A:</b> Características generales de las secuencias de <i>P. aeruginosa</i> ST235	66
<b>Tabla Anexo B:</b> Concentración inhibitoria mínima y determinantes de resistencia de los aislamientos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68
<b>Tabla Anexo C:</b> Identificación de la región variable de los integrones clase 1 en los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> .	70

## Lista de abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
AAC	Aminoglicósido-acetil-transferasa
AAD	Aminoglicósido-adenilil-transferasa
ACT	Tipo AmpC
ACC	Clase C de Ambler
ATCC	Del inglés “ <i>American Type Culture Collection</i> ”
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AK	Amikacina
ANT	Aminoglicósido-nucleotidil-transferasa
APH	Aminoglicósido-fosforil-transferasa
AR	Argentina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNt	ARN de transferencia
ARNr	ARN ribosómico
AU	Australia
BHI	Medio de cultivo corazón-cerebro
<i>bla</i>	$\beta$ -lactamasa
$\beta$ LEE	$\beta$ -lactamasas de espectro extendido
CAZ	Ceftazidima
CDC	Centro de Control de Enfermedades
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Instituto de estándares clínicos y de laboratorio
CMY	Cefamicina
CO	Colombia
CTX-M	$\beta$ -lactamasa con capacidad de hidrolizar cefotaxime
DE	Alemania
DHA	Dhahran Hospital
DOR	Doripenem
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y Control de la enfermedad
EGM	Elementos genéticos móviles
ES	España
FOX	Cefoxitin
FR	Francia
GEN	Gentamicina
GES	$\beta$ -lactamasa de espectro extendido de Guyana
GR	Grecia
HR	Croacia
IAAS	Infecciones asociadas a la atención en salud
IBC	Cefalosporinasa transportada por integrón
GI	Isla genómica
IMP	Imipenem
	$\beta$ -lactamasa con capacidad de hidrolizar imipenem
IN	India
IT	Italia
JP	Japón
KPC	Carbapenemasa de <i>Klebsiella pneumoniae</i>

---

LAra4N	4-amino-4-desoxi-L-arabinosa
LB	Medio de cultivo Lurio-Bertani
LPS	Lipopolisacárido
M $\beta$ L	Metalo- $\beta$ -lactamasa
MDR	Multirresistentes
MEM	Meropenem
MLST	Tipificación de secuencias de múltiples loci
MOX	Moxalactam
MX	México
NDM	Metalo- $\beta$ -lactamasa de Nueva Delhi
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco abierto de lectura
OXA	$\beta$ -lactamasa con capacidad de hidrolizar oxacilina
PAGI	Isla genómica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDC	Cefalosporinasa derivada de <i>Pseudomonas</i>
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsado
PH	Filipinas
QRDR	Región determinante de resistencia a quinolonas
RND	Resistencia a división por nodulación
rpm	Revoluciones por minuto
RO	Rumania
SHV	Variable sulfidrilo
SI	Secuencia de inserción
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SPM	Metalo- $\beta$ -lactamasa de San Pablo
ST	Tipo de secuencia
SXT	Trimetoprim-sulfametoxazol
TEM	Temoneira
TZP	Piperacilina tazobactam
UCI	Unidad de cuidado intensivo
US	Estados Unidos
VEB	$\beta$ -lactamasa de espectro extendido de Vietnam
VIM	Metalo- $\beta$ -lactamasa de Verona codificada por integrón
XDR	Extremadamente resistentes



---

# 1 Introducción

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria oportunista Gram negativa, anteriormente nombrada como *Bacillus pyocyaneus*. Desde 1862 ha sido reportada como agente causal de infecciones en seres humanos, actualmente a nivel mundial, en las unidades de cuidados intensivos (UCI) puede causar aproximadamente del 10 al 20% de las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) y en Colombia es el tercer patógeno más frecuente causante de infección en UCI de adultos. Puede afectar a pacientes con compromisos hematológicos, enfermedades pulmonares crónicas, trasplantados o en etapa posquirúrgica [1].

Además de su alta prevalencia, la adquisición de genes de resistencia limita la efectividad de los antibióticos utilizados para su tratamiento, incluyendo los de última opción terapéutica como los carbapenémicos. Haciendo que las estancias hospitalarias se prolonguen entre seis a doce días, incrementando el riesgo de mortalidad. A nivel mundial, cerca del 30% de los aislamientos resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactámicos presentan co-resistencia a más de tres familias de antibióticos, siendo las más frecuentes: aminoglicósidos, quinolonas y tetraciclinas [1, 2].

Adicionalmente, los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* presentan un comportamiento policlonal debido a la alta recombinación entre las cepas bacterianas, sin embargo, se han reportado complejos clonales o clones epidémicos de gran éxito epidemiológico multiresistentes, algunos de ellos asociados al tipo de secuencia (ST)235 [3]. En Colombia los aislamientos también presentan un comportamiento policlonal y cerca del 75,4% presentan un perfil de multiresistencia mediado en algunos casos por carbapenemasas de tipo VIM-2 y KPC-2. Así mismo, el 86% de los aislamientos asociados a *bla*<sub>VIM-2</sub> han sido relacionados al clon ST111 y el 100% de los aislamientos *bla*<sub>KPC-2</sub> positivos al clon ST235 [4,5].

Cabe resaltar que el ST235 con presencia de KPC se ha reportado únicamente en Colombia y la movilización del gen *bla*<sub>KPC</sub> se asocia a plásmidos que poseen el transposón Tn4401b [6-8]. Así mismo, en aislamientos ST235 de otros países como Australia han sido identificados los transposones Tn6162 y Tn6163 movilizandolos integrones clase 1 con diferentes genes casete de resistencia a aminoglicósidos y carbapenémicos, estos transposones adicionalmente han sido identificados dentro de las islas genómicas 1 y 2, una característica común en esta especie [9]. Con el fin de poder caracterizar mejor los aislamientos locales, es necesario conocer las plataformas de movilización que participan en la diseminación de los genes de

resistencia que circulan en el país, en especial en los clones de alto riesgo epidemiológico como el ST235, puesto que pueden presentar variaciones evolutivas diferentes a las reportadas en otros países favorecidas por las condiciones ambientales. Por tal razón, en el presente trabajo se plantea contribuir en la caracterización de los principales elementos genéticos móviles asociados a resistencia en *P. aeruginosa* ST235.



---

## 2 Marco teórico

### Generalidades

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria patógena oportunista Gram negativa, no fermentadora de glucosa y no considerada parte de la microbiota de los seres humanos. Debido a su capacidad de adaptarse a diferentes condiciones ambientales y sus mecanismos de resistencia intrínsecos a diferentes antibióticos, este patógeno puede colonizar ambientes hospitalarios como ventiladores mecánicos, catéteres, superficies, detergentes, sustancias de uso clínico, entre otros. Este patógeno causa infecciones en pacientes de unidad de cuidados intensivos (UCI), inmunosuprimidos o con enfermedades crónicas [10-12].

Las principales infecciones causadas por este patógeno son las relacionadas con el sistema respiratorio (neumonía asociada a ventilación) con una mortalidad asociada del 30%, seguido de bacteriemia, infecciones de sitio operatorio entre otros [13]. El desarrollo de estas infecciones depende de varios factores como la respuesta inmune del paciente, la capacidad de adhesión e internalización de la bacteria al epitelio del hospedero, para generar el daño tisular. La patogénesis de *P. aeruginosa* inicia con la acción de estructuras bacterianas como el flagelo y pili que permiten motilidad tipo Twitching, Swimming y Swarming, los cuales favorecen la colonización y diseminación. Después de este paso se secretan diferentes toxinas como ExoY, ExoS, ExoT y ExoU (liberadas por el sistema de secreción tipo III), las cuales interrumpen la organización del citoesqueleto y favorecen la degradación en la membrana de la célula del hospedero. En el proceso también pueden actuar proteasas, la exotoxina A, sistemas quórum sensing y la sobreexpresión de alginato y exopolisacárido, polisacáridos involucrados en formación de biopelícula, favoreciendo su supervivencia y replicación bacteriana [10].

Adicional a los factores de virulencia, estas bacterias presentan mecanismos de resistencia intrínsecos y adquiridos que limitan las opciones y efectividad de los tratamientos antimicrobianos, algunos de los más frecuentes son la disminución a la permeabilidad de la membrana, sobreexpresión de bombas de eflujo, mutaciones en el sitio blanco, enzimas modificadoras de antibiótico, entre otros [14]. Algunos de estos mecanismos pueden actuar de manera inespecífica en diferentes familias de antibióticos como  $\beta$ -lactámicos, aminoglicósidos, quinolonas, etc. [14].

## Principales mecanismos de resistencia a antibióticos de uso clínico

Las infecciones causadas por *P. aeruginosa* pueden ser tratadas generalmente por antibióticos de las familias de los  $\beta$ -lactámicos, aminoglicósidos, fluoroquinolonas y polimixinas. Sin embargo, el uso inapropiado de estos antibióticos como la automedicación, la selección terapéutica inadecuada y concentraciones subinhibitorias favorecen la selección de clones multirresistentes, lo cual conlleva a una baja probabilidad de éxito terapéutico e incremento de las intervenciones quirúrgicas, estancia hospitalaria y mortalidad [8].

Durante la presión selectiva ejercida por el antibiótico, cromosómicamente los aislamientos de *P. aeruginosa* pueden sobreexpresar genes intrínsecos de resistencia tipo AmpC a  $\beta$ -lactámicos, modificar porinas como OprD ocasionando la reducción de la permeabilidad de la membrana y disminuyendo la susceptibilidad a carbapenémicos, sobreexpresar bombas de eflujo tipo RND (Resistencia a división por nodulación), las cuales permiten la disminución de la concentración intracelular de múltiples antibióticos por medio de la expulsión activa de los mismos, como el caso de MexAB-OprM, la cual tiene como sustratos a antibióticos de las familias  $\beta$ -lactámicos, macrólidos, aminoglicósidos, tetraciclinas y sulfonamidas, además de los antibióticos cloranfenicol y novobiocina; adicionalmente, tiene la capacidad de realizar mutaciones en genes cromosomales como *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*, permitiendo la modificación de la DNA girasa y topoisomerasa IV, las cuales son sitio blanco de las fluoroquinolonas [15].

Para entender la presencia de los aislamientos multirresistentes se deben tener en cuenta no sólo los mecanismos de resistencia intrínsecos explicados previamente, sino aquellos que se pueden adquirir por medio de diferentes plataformas genéticas móviles, los cuales poseen diferentes genes que pueden ya sea inactivar enzimáticamente el antibiótico o modificar su sitio blanco. Para ello se explicarán a continuación los principales mecanismos de resistencia endógenos y adquiridos según la familia de antibióticos empleada para el tratamiento.

### 2.1.1 Resistencia a $\beta$ -lactámicos

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos conformados por monobactámicos, penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, son los más empleados en la terapia

antimicrobiana por su gran efectividad y amplio espectro. La resistencia a estos antibióticos puede estar mediada por disminución de la permeabilidad de la membrana, la expresión de bombas de eflujo tipo RND y/o la producción de  $\beta$ -lactamasas endógenas o adquiridas [14].

La membrana externa de *P. aeruginosa* es semipermeable y permite por medio de porinas el transporte de azúcares, aminoácidos, fosfatos, cationes divalentes, sideróforos e incluso algunos antibióticos hidofílicos como los  $\beta$ -lactámicos. Sin embargo, la estructura o la expresión de porina (tipo OprD) se pueden alterar, reduciendo así la permeabilidad de la membrana a estas moléculas impidiendo su ingreso al citoplasma [15-17]. Adicionalmente, estas porinas pueden estar asociadas o unidas a bombas de eflujo de tipo RND, que son canales proteicos conformados por una proteína de la membrana citoplasmática y una proteína de fusión ubicada en el espacio periplasmático, las cuales tienen como función expulsar sustancias tóxicas como diferentes antibióticos desde el citoplasma o el espacio periplásmico hacia el ambiente extracelular, con el objetivo de disminuir su concentración intracelular de dichas sustancias [15]. Existen más de 10 bombas de eflujo de tipo RND, asociadas a resistencia a  $\beta$ -lactámicos, sin embargo las bombas MexAB-OprM, MexCD-OprJ y MexXY son las más frecuentes [15, 18].

Otro de los mecanismos más importantes y frecuentes es la producción de  $\beta$ -lactamasas, es la producción de enzimas que hidrolizan el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico de los antibióticos, impidiendo que este inhiba la transpeptidación en la biosíntesis del peptidoglicano [19]. Estas enzimas tienen dos esquemas de nomenclatura: la primera es la clasificación molecular de Ambler y la segunda la funcional de Bush-Jacoby-Medeiros [20]. La nomenclatura Ambler se basa tanto en la secuencia proteica o motivos conservados de la enzima y su sustrato, esta clasifica a las  $\beta$ LEE ( $\beta$ -lactamasas de espectro extendido) en cuatro tipos (A, B, C y D) según su homología en la secuencia proteica. Las clases A, C y D son conocidas como  $\beta$ -lactamasas tipo serina por tener este aminoácido en su sitio activo y no ser inhibidas por EDTA (ácido etilendiaminoetraacético), mientras que la clase B la conforman las  $\beta$ -lactamasas tipo metalo que presentan un ion de zinc en el sitio activo y que sí son inhibidas por EDTA [10, 21]. En la clasificación de Bush se crean también cuatro grupos que contienen a su vez diferentes subgrupos, basados en características funcionales según sus propiedades bioquímicas y físicas como su espectro de hidrólisis, inhibición y su interacción con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam (tabla 1) [19].

**Tabla 1.** Clasificación de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido según nomenclatura de Ambler y Bush [19].

Grupo Bush-Jacoby (2009)	Ambler	Sustrato	Inhibido por		Representante	
			Á. Clav.	EDTA		
1	1	C	Cefalosporinas y cefamicinas	No	No	AmpC, CMY-2, FOX, MIR, ACT.
	1e	C	Cefalosporinas	No	No	GCI, CMY-37
2	2a	A	Penicilinas	Sí	No	PC-1
	2b	A	Penicilias y cefalosporinas de primera generación	Sí	No	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos	Sí	No	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1
	2br	A	Penicilinas	No	No	TEM-30, SHV-10
	2ber	A	Cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos	No	No	TEM-50
	2c	A	Carbenidinas	Sí	No	PSE-1, CARB-3
	2ce	A	Carbenidilinas y cefepime	Sí	No	RTG-4
	2d	D	Cloxacilina	Variable	No	OXA-1, OXA-10
	2de	D	Cloxacilina y cefalosporinas de espectro extendido	Variable	No	OXA-23, OXA-24, OXA-48
	2df	D	Cloxacilina y carbapenémicos	Variable	No	CepA
	2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido y (no actúa sobre monobactámicos)	Sí	No	KPC, IMI, SME
3	3a	B	Carbapenémicos	No	Sí	CAU, GOB, FEZ.
	3b	B	Carbapenémicos	No	Sí	

En países como Brasil, México, Reino Unido, Alemania, Bélgica, Irán e India existen reportes de aislamientos de *P. aeruginosa* que expresan  $\beta$ LEE con capacidad de hidrolizar desde penicilinas hasta cefalosporinas de amplio espectro y aztreonam; entre estas se encuentran *bla*<sub>VEB</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>GES-19</sub> y *bla*<sub>OXA10</sub> [22-26]. También carbapenemasas de clase A como IBC, GES y KPC juegan un rol fundamental en la resistencia y epidemiología de este patógeno.

Las carbapenemasas son  $\beta$ -lactamasas que hidrolizan a los carbapenémicos (meropenem, imipenem, ertapenem y doripenem), siendo estos la última opción terapéutica contra los bacilos Gram negativos multirresistentes [21]. La carbapenemasa IBC fue identificada inicialmente en Grecia en el año 2000 en *Enterobacter cloacae* y posteriormente se identificó en la IBC-2 en *P. aeruginosa* [27, 28]. En este mismo año la carbapenemasa GES fue identificada en *Klebsiella pneumoniae*, desde entonces se diseminó rápidamente algunas de sus variantes (GES-1, -2, -5, -9, -13, -18 y -24) en varios países, siendo GES-5 la más frecuente [29-36]. Finalmente, en el año 2001 en un aislamiento de *K. pneumoniae* se describió por primera vez KPC, en el 2007 esta carbapenemasa fue identificada en *P.*

*aeruginosa* en un aislamiento de origen colombiano y desde entonces la variante KPC-2 es la más frecuente en los aislamientos resistentes a carbapenémicos en el país. En Argentina, Brasil, Puerto Rico, Estados Unidos, Irán, India y China también circula KPC en aislamientos clínicos [37-45].

Las carbapenemasas IMP, VIM y SPM, pertenecientes a la clase B, se han reportado frecuentemente en *P. aeruginosa*. En Brasil fue reportada en el año 1997 en *Escherichia coli* y *P. aeruginosa* la carbapenemasa SPM y desde entonces la variante SPM-1 ha sido identificada ampliamente en ese país y en menor medida en Suiza, Reino Unido, Irán e Iraq teniendo espectro de acción en meropenem y doripenem más que en imipenem [46-50]. También en 1997, fue reportada por primera vez en Italia la carbapenemasa VIM en *P. aeruginosa*, siendo muy diseminadas las variantes VIM-1, -2, -5, -8, -11, -13, -18, -22, -28 y -38, sin embargo, la variante VIM-2 es la más frecuente [51-66].

Finalmente, las de clase D tipo OXA tienen un espectro de acción limitado a monobactámicos, cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Sin embargo, en *A. baumannii* en 1993 fue aislada la primera OXA (OXA-23) con actividad carbapenemasa, desde entonces las nuevas variantes se clasificaron en subfamilias (OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-50, OXA-51, OXA-55, OXA-58, OXA-60, OXA-62, OXA198), las identidades entre los miembros de las distintas subfamilias varían entre un 40 y un 70% [67]. Aunque las carbapenemasas tipo OXA son más frecuentes en *A. baumannii*, pocos aislamientos de *P. aeruginosa* se han descrito con la variante OXA-40, OXA-48 u OXA-198 [68-70].

Es importante resaltar que algunas  $\beta$ LEE pueden ser codificadas de forma natural o constitutiva en el cromosoma de diferentes enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores, incluyendo *P. aeruginosa* o en plásmidos, los cuales movilizan genes *ampC* [15, 71]. En *P. aeruginosa* la enzima tipo AmpC denominada PDC (Cefalosporinasa derivada de *Pseudomonas*) es inducible y se produce en niveles basales, causando resistencia natural únicamente a aminopenicilinas [72]. La sobreexpresión de esta confiere resistencia a todos los  $\beta$ -lactámicos, a excepción de los carbapenémicos.

En general, para la codificación de esta enzima, los productos de degradación de la pared 1,6-anhidromuropéptido ingresan al citoplasma a través de la permeasa transmembranal AmpG y una vez en el citosol se unen al activador transcripcional AmpR, el cual induce la expresión de *ampC*. Posteriormente, para la represión de esta expresión, la amidasa citoplasmática AmpD cliva los productos 1,6-

anhidromuropéptidos hasta ácido 1,6-anhidromurámico y péptidos, estos últimos son procesados a tripéptidos hasta formar el UDP-N-acetilmuramilpentapéptido, el cual es precursor de la pared y al unirse a AmpR bloquea la inducción [71, 73]. *P. aeruginosa* posee en su cromosoma alta capacidad de desarrollo de mutaciones en los genes *ampR* y *ampD*, promoviendo la hiperproducción de AmpC [10]. Cabe resaltar que los plásmidos que movilizan el gen *ampC*, no cuentan con el gen regulador *ampR*, por lo cual existe una sobreproducción de AmpC. Actualmente no se han reportado la presencia de variantes como *bla<sub>CMY-1</sub>* a *bla<sub>CMY-13</sub>*, *bla<sub>MOX-1</sub>*, *bla<sub>MOX-2</sub>*, *bla<sub>FOX-1</sub>*, *bla<sub>FOX-6</sub>*, *bla<sub>ACT-1</sub>*, *bla<sub>MIR-1</sub>*, *bla<sub>DHA-1</sub>*, *bla<sub>DHA-2</sub>* y *bla<sub>ACC-1</sub>* [16, 71].

Otra  $\beta$ -lactamasa constitutiva de *P. aeruginosa* es OXA-50, oxacilinas (perteneciente a la clasificación D de las  $\beta$ LEE) que hidroliza ampicilina, bencilpenicilina, cefaloridina cefalotina, nitrocefina, piperacilina e imipenem y disminuye la susceptibilidad a moxalactam y meropenem [74].

### 2.1.2 Resistencia a fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas como ofloxacina, pefloxacina, levofloxacina y ciprofloxacina, son usadas en el tratamiento contra las infecciones causadas por *P. aeruginosa*. Estos antibióticos actúan sobre la topoisomerasa IV y el ADN girasa, inhibiendo el proceso de transcripción, recombinación y reparación del ADN. En *P. aeruginosa* se han identificado dos mecanismos de resistencia: la mutación de los genes que codifican su sitio blanco y la expresión de bombas de eflujo tipo RND [14].

Las mutaciones genéticas puntuales en los genes de la ADN girasa y topoisomerasa IV que causan cambios de aminoácidos son realizadas en la región denominada QRDR (Región determinante de resistencia a quinolonas). En los genes *gyrA* se han descrito los cambios Glu54Lys, Ala67Ser, His80Arg, Thr83Ile y Asp87Asn, en *gyrB* se ha identificado Phe464Ser y en *parC* se han encontrado Ser80Leu, Gln84Asp y Ala85Gly [15, 75-78]. En cuanto a la expresión de bombas de eflujo, se han reportado principalmente siete que promueven la resistencia a estos antibióticos: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY, MexGHI-OpmE y MexVW, MexPQ-OpmE [15].

### 2.1.3 Resistencia a aminoglicósidos

Además de las fluoroquinolonas, también son usados en el tratamiento contra *P. aeruginosa* antibióticos de la familia de los aminoglicósidos como tobramicina, gentamicina y amikacina. Estos antibióticos se unen a la subunidad 30S del ribosoma e interfieren con la síntesis de proteínas causando la muerte celular. La resistencia a estos antibióticos puede estar mediada por la disminución de la permeabilidad en la membrana, expulsión del antibiótico por medio de la bomba de eflujo mexXY y/o la presencia de enzimas modificadoras de aminoglicósidos, entre las cuales se encuentran N-acetiltransferasas (AACs) [79], O-fosfotransferasas (APHs) y O-nucleotidiltransferasas (ANTs) [14, 80, 81].

Las AACs catalizan la transferencia de un grupo acetato desde la acetil-coenzima A hacia un grupo amino de las posiciones 1, 3, 6' ó 2', en *P. aeruginosa* es común la acetilación en las posiciones 3 (AAC(3)) y 6' (AAC(6')). Se han descrito cinco subfamilias (I a IV y VI), las cuales generan más resistencia a gentamicina que a tobramicina. Por su parte, las APHs catalizan la transferencia de un grupo fosfato desde un ATP a un grupo hidróxilo del antibiótico, siendo las variantes más frecuentes: APH(3')-II que genera resistencia a kanamicina, APH(3')-IV a amikacina y APH(2'') a gentamicina y tobramicina. Finalmente, las ANTs catalizan desde un nucleótido trifosfato la transferencia de un nucleótido monofosfato a un grupo hidróxilo. ANT(2') es la nucleotidiltransferasa más prevalente que inactiva a gentamicina y tobramicina, pero no a amikacina y ANT(4')-II, la cual actúa en tobramicina y amikacina [14, 82-84].

### 2.1.4 Resistencia a polimixinas

Debido a la presencia de aislamientos Gram negativos multi-resistentes se ha implementado el uso de las polimixinas (colistina) como opción terapéutica para el tratamiento de infecciones de diferentes especies, incluyendo *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Las polimixinas son lipopéptidos cíclicos que actúan como agentes catiónicos que interactúan con el lípido A del lipopolisacárido (LPS), desplazan los cationes divalentes que estabilizan al LPS ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) y una vez desestructurado se insertan en la membrana externa y provocan la expansión de la misma, incrementando la permeabilidad y provocando la muerte celular [85].

La resistencia a colistina por *P. aeruginosa* puede ser determinada por diferentes mecanismos que permiten la modificación del LPS, la expresión de las enzimas del operón *arnBCADTEF* permiten la adición de 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa (LArA4N)

a los grupos fosfato del LPS causando un incremento en la carga del lípido A y disminución de su afinidad a las cargas positivas de la polimixina. La biosíntesis de LAra4N esta mediada adicionalmente por los sistemas de dos componentes PmrA/PmrB y Phop/PhoQ, mutaciones en sus genes promueven también la resistencia [85-87]. Finalmente, se ha descrito resistencia por la sobre-expresión de la bomba de eflujo MexAB-OprM [87].

En general, los genes que codifican diferentes mecanismos de resistencia son movilizados por plataformas genéticas móviles al cromosoma bacteriano. El genoma de *P. aeruginosa* es de aproximadamente 6Mb y cerca del 90% del contenido genómico está conformado por regiones conservadas conocidas como genoma “core” que pueden incorporar regiones variables o “genoma accesorio”, el cual está constituido principalmente por elementos genéticos móviles, factores de virulencia y mecanismos de resistencia, los cuales le confieren a las cepas características fenotípicas ventajosas [88].

## Plataformas genéticas móviles

Los elementos genéticos móviles (EGM) son secuencias de ADN que pueden moverse de manera autosuficiente a diferentes regiones del genoma bacteriano en una célula o por medio de la transferencia horizontal entre diferentes células [89]. La movilidad de los EGM como plásmidos conjugativos depende de la proximidad entre la célula donante y receptora, para su transferencia y algunos como transposones y genes casete se pueden movilizar también dentro de la misma célula [90].

A continuación, se describirán algunas características de los EGM como secuencias de inserción, transposones, islas genómicas, profagos y plásmido asociados a resistencia bacteriana.

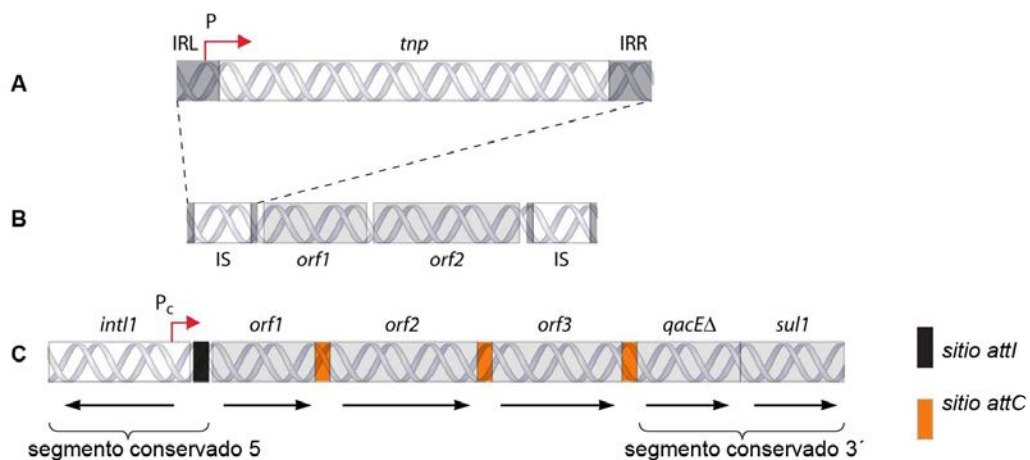
### 2.1.5 Secuencias de inserción y transposones

Las secuencias de inserción y los transposones son secuencias de ADN capaces de moverse en el genoma de una localización a otra por medio de una transposasa. Se clasifican en simples o compuestos, los transposones simples son secuencias de inserción (SI) flanqueadas entre secuencias cortas invertidas repetidas (IR), no poseen genes de resistencia a antibióticos, pero pueden contribuir a la resistencia moderando la expresión, movilización o inactivación de genes contiguos (figura 1A).



Los transposones compuestos pueden movilizar genes de resistencia a antibióticos y son flanqueados por dos secuencias de inserción separadas no siempre idénticas (figura 1B). Los transposones de la familia Tn3 como Tn6061, Tn6001 y Tn4401 son asociados frecuentemente a la movilización de estos mecanismos de resistencia, sin embargo, su estructura no es la típica de los transposones compuestos puesto que codifica genes de la recombinasa (*tnpR*), además de la transposasa (*tnpA*) [104, 105].

Adicionalmente, los transposones pueden movilizar también integrones que son elementos genéticos no móviles que permiten la captura y expresión de genes exógenos casetes, incluyendo genes de resistencia que pueden integrarse y eliminarse del integrón fácilmente. La estructura básica de un integrón incluye un gen de la integrasa (*intI*), un sitio adyacente de recombinación (*attI*) y al menos un promotor ( $P_c$ ,  $P_2$ ) orientado para la expresión de los genes capturados (figura 1C) [91]. De acuerdo a la secuencia nucleotídica de la integrasa, los integrones han sido clasificados en clases 1, 2 y 3. En *P. aeruginosa* los integrones de clase 1 son los más frecuentes, usualmente capturan genes que codifican para enzimas modificadoras de aminoglicósidos y rara vez integran metalo- $\beta$ -lactamasas [88]. Generalmente hacen parte de transposones, que a su vez pueden encontrarse dentro de un plásmido conjugativo [90].



**Figura 1. Estructura general de las secuencias de inserción, transposones e integrones.** (A) Organización de una secuencia de inserción (SI); las secuencias invertidas repetidas (IR) se representan en gris con la etiqueta IRL e IRR. Entre las repeticiones invertidas está un ORF que codifica la transposasa *tnp*. El promotor de transposasa ( $P$ ) está contenido en IRL. (B) Organización de un transposón compuesto: uno o más genes están flanqueados por dos SI. (C) Organización del integrón clase 1. La región 5' conservada consiste en el gen de la integrasa *intI1* seguido por el sitio de recombinación *attI*, representado por un rectángulo negro, el promotor ( $P_c$ ) que promueve la expresión de genes casetes *orf1*, *orf2* y *orf3*, los cuales están separados por sus sitios *attC* (rectángulo naranja). El segmento 3' conservado conformado por un gen de resistencia a amonio cuaternario truncado (*qacEΔ*) fusionado con un gen de resistencia a sulfonamidas (*sul1*). Modificado de Kung y col. [88].

### 2.1.6 Islas genómicas

Las Islas genómicas (IGs) son segmentos discretos de ADN que son parte del cromosoma de la célula y puede conducir o impulsar la diferenciación de cepas. Estos segmentos de ADN son relativamente grandes (>8kb) y a menudo difieren del resto del cromosoma en su contenido G-C, se insertan cerca de genes que codifican ARNt y están flanqueadas por repeticiones directas (DR). Las IGs normalmente albergan genes que codifican integrasas, transposasas y SI, lo cual favorece que integren genes que le confieren a la bacteria hospedera diversas ventajas selectivas. De acuerdo a estas ventajas son denominadas como islas de patogenicidad, de simbiosis, metabólicas, de aptitud o resistencia [92].

Las IGs de *P. aeruginosa* poseen aproximadamente un tamaño desde 81 a 108 kb y contienen genes que codifican las funciones necesarias para su movilidad y difusión [88]. Existen islas genómicas móviles y no móviles, algunas capaces de integrarse, extraerse y transferirse del cromosoma bacteriano hospedero a un nuevo hospedero por transformación, conjugación o transducción. Para la integración de estas se requiere de la adquisición de genes por transferencia horizontal, luego la integración en el cromosoma del huésped mediante recombinación sitio-específica y reordenamientos genéticos como la pérdida o adquisición de genes, finalmente pueden ser transferido a otro destinatario por medio de plásmidos o fagos [92].

La primera IG descrita en *P. aeruginosa* fue PAPI-1, que a diferencia de otras islas genómicas no se encuentra localizada cerca del extremo 3' de genes de ARNt, fue identificada en el 85% de los aislamientos clínicos y contiene genes que poseen homología con dehidrogenasas y reguladores transcripcionales [93]. En *P. aeruginosa* se han descrito IGs desde PAPI-1 hasta PAPI-16, las cuales confieren diferentes capacidades metabólicas, además de PAPI-1 y PAPI-2 que codifican factores de virulencia (tabla 2) [3, 88]. Desde entonces, pocos estudios han investigado la prevalencia de las islas genómicas en los aislamientos clínicos, sin embargo, cuando se estudian el 99% de los aislamientos posee en su genoma al menos una isla genómica o de patogenicidad, 87% de los aislamientos contenía en su genoma a PAPI-2 y pKLC102, 81% a PAPI-1, 78% a PAPI-2, 70% a PAPI-4, 53% a PAPI-3 y 51% a PAPI-1 [94]. Por otra parte, PAPI-6, -7, -8, -9, y -10 han sido reportadas en menor frecuencia, PAPI-6 ha sido identificado en el 6% de los aislamientos, PAPI-7 y PAPI-9 en 46%, PAPI-8 y PAPI-10 en 3% [95].

**Tabla 2.** Islas genómicas más frecuentes en *P. aeruginosa* [88].

Isla genómica (Tamaño)	Sitio de integración de ARNt	Características
<b>PAGI-1 (49Kb)</b>	-	Contiene genes que poseen homología con dehidrogenasas y reguladores transcripcionales relacionados con PrpR of <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium.
<b>PAGI-2 (105kb)</b>	ARNt <sup>Gly</sup>	Posee genes que funcionan en complejos y transportan metales pesados.
<b>PAGI-3 (103kb)</b>	ARNt <sup>Gly</sup>	Tiene genes que confieren capacidades metabólicas, de transporte y resistencia.
<b>PAGI-4 (23kb)</b>	ARNt <sup>Lys</sup>	Contiene genes con funciones metabólicas putativas.
<b>pKLC102 (104kb)</b>	ARNt <sup>Lys</sup>	Contiene gen para integrasa con homología a <i>xerC</i> .
<b>PAPI-1 (108kb)</b>	ARNt <sup>Lys</sup>	Numerosos genes que parecen afectar a la virulencia en modelos de infección; auto-transmisible.
<b>PAPI-2 (11kb)</b>	ARNt <sup>Lys</sup>	Contiene genes que codifican para el factor de virulencia ExoU secretado por el sistema de secreción tipo III.

### 2.1.7 Plásmidos

Los plásmidos son ADN circular extracromosomal de doble cadena, capaces de auto-replicarse de manera independiente de la célula hospedera y de transferir de una célula a otra, genes de virulencia o resistencia. Existen plásmidos de resistencia conjugativos y movilizables, los primeros codifican la maquinaria necesaria para promover su propia transferencia de célula a célula por medio del sistema de secreción de tipo IV, en cambio los plásmidos movilizables necesitan la colaboración de un plásmido conjugativo para su transferencia, por lo cual tienden a ser más pequeños [96]. El tamaño de los plásmidos movilizables a menudo es 10kb, a diferencia de los plásmidos conjugativos cuyo tamaño es de aproximadamente 30kb o más [90, 97].

Uno de los plásmidos movilizables identificados en diferentes especies ha sido el plásmido pDCPR1 de 18.182pb, el cual fue aislado de *P. aeruginosa* en el 2005 y posteriormente fue identificado en *Serratia marcescens* en el 2012. A excepción de dos nucleótidos, la estructura genética del plásmido en los dos aislamientos fue idéntica, incluyendo los genes *repA*, *trfB*, *parA*, y *parB*, el integrón clase 1 asociado a Tn402 con el gen casete *bla<sub>VIM-2</sub>* y algunos genes que codificaban proteínas hipotéticas [98]. Adicionalmente, *P. aeruginosa* posee plásmidos no conjugativos que presentan un operón de transferencia truncado (similar al transposón TnCP23), como

el plásmido pNOR-2000 que contiene el gen *bla<sub>VIM-2</sub>* en un integrón In56 [99]. Principalmente se han reportado plásmidos conjugativos, los cuales movilizan genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos (especialmente carbapenémicos), como el plásmido p07-406 que contiene un integrón clase 1 truncado con el gen *bla<sub>VIM-9</sub>* y plásmidos pUM505 asociados a una isla de patogenicidad de 78 genes, de los cuales 64 han sido identificados en PAPI-1 y PAPI-2 [100, 101].

### 2.1.8 Profagos

Los profagos son bacteriófagos integrados por recombinación sitio específica en el cromosoma bacteriano, pueden desarrollar mutaciones o experimentar recombinación con otros profagos del cromosoma del huésped y promover así su permanencia en el genoma. Durante la movilización de los profagos se pueden producir errores en el empaquetamiento y al momento de infectar otra célula pueden promover la transducción con la transferencia de ADN bacteriano del huésped previo [88].

La mayoría de los fagos que infectan a *P. aeruginosa* son de doble cadena de ADN y dependiendo la morfología de la cola pertenecen a las familias como *Siphoviridae* (larga y flexible) *Myoviridae* (contráctil), y *Podoviridae* (corta y gruesa) [102]. Aunque el 82% del proteoma predicho de los fagos de *P. aeruginosa* es de función desconocida, existen bacteriófagos que pueden modificar la virulencia en *P. aeruginosa*, como por ejemplo  $\Phi$ CTX, D3, PT-6 y otros que pueden promover la aparición de variantes con colonias pequeñas asociadas con mala función pulmonar y con una mayor resistencia a los antibióticos como PF4 (tabla 3) [88, 103]. La identificación de los profagos en los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* ha sido muy limitada, sin embargo, gracias al aumento de estudios que emplean las técnicas de secuenciación de genoma completo. En algunos estudios epidemiológicos se ha podido identificar aislamientos clínicos con regiones que contienen los profagos  $\Phi$ CTX y D3 [96].

**Tabla 3.** Bacteriófagos frecuentes de *P. aeruginosa* [88].

Elemento (tamaño)	Características
$\Phi$ CTX (36kb)	Fago de la familia <i>Myoviridae</i> de ADN de doble cadena, codifica una citotoxina formadora de poros que contribuye a la virulencia.
D3 (56kb)	Fago de la familia <i>Siphoviridae</i> de ADN de doble cadena, contiene un "operón de seroconversión" que cambia el serotipo de O5 a O16.
Pf1 (7kb)	Fago filamentosos de ADN de cadena sencilla, se sobregula durante el desarrollo de biopelícula.

<b>Pf4 (12kb)</b>	Fago filamentosos de ADN de cadena sencilla, afecta la variación y diferenciación fenotípica del biopelícula así como la virulencia.
<b>PT-6</b>	Bacteriófago de la familia <i>Podoviridae</i> de ADN de doble cadena, bacteriófago que produce Alginasa.
<b>F116 (65kb)</b>	Fago lisogénico de la familia <i>Podoviridae</i> de ADN de doble cadena, degrada alginato y codifica proteínas putativas con secuencias de aminoácidos similares a las proteínas para la fluorescencia.
<b>D3112</b>	Fago de la familia de <i>Siphoviridae</i> de ADN de doble cadena, su integración es mediada por tranposasa, codifica proteínas con secuencias similares a fagos de bacterias patógenas de plantas como <i>Xanthomonas fastidiosa</i> .

En general, la movilización de genes de resistencia por medio de diferentes EGM ha promovido perfiles de multirresistencia en diferentes aislamientos, lo que ha contribuido en la selección de clones de alto riesgo epidemiológico. Por lo cual, se está centrando el interés en la identificación y caracterización de estos clones en los diferentes escenarios epidemiológicos a nivel mundial.

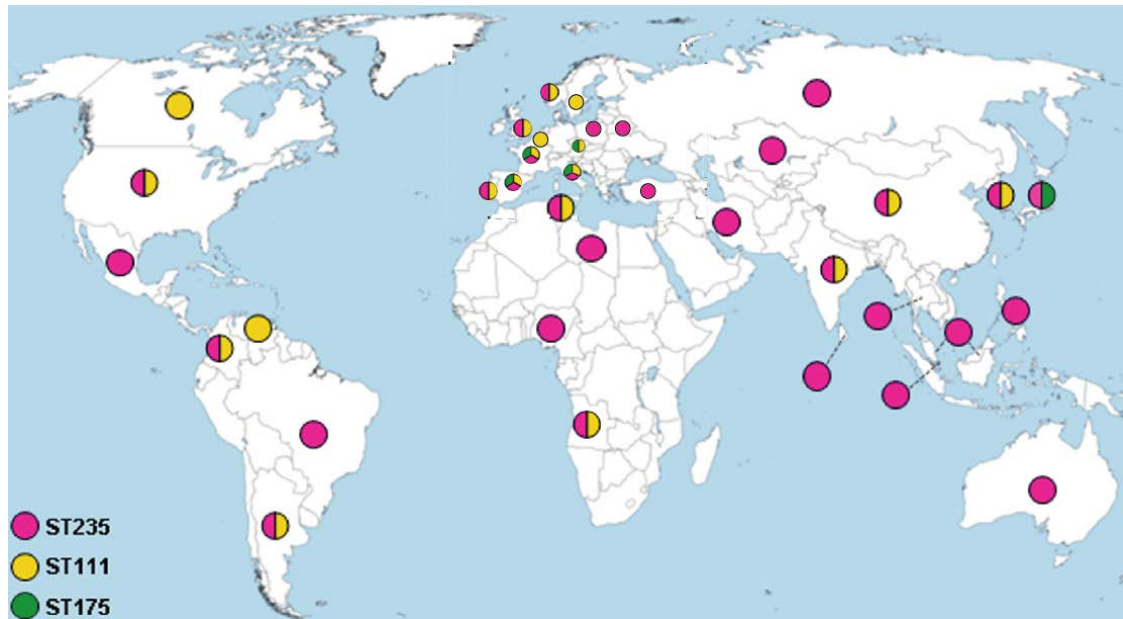
## Epidemiología y clones

Existe una elevada prevalencia de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) y de infecciones crónicas causadas por aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes al menos a un antibiótico de tres o más familias, denominados como multirresistentes (MDR) y resistentes al menos a un antibiótico de todas las familias, a excepción de una o dos (XDR). Debido a los mecanismos de resistencia intrínsecos y al incremento de la movilización de genes de resistencia se limitan las opciones terapéuticas aumentando la morbimortalidad y la estancia hospitalaria de los pacientes [104].

*P. aeruginosa*, a diferencia de otras bacterias, no presenta comportamiento clonal debido a las altas tasas de recombinación entre los aislamientos, esto es gracias a que se promueve una estructura en la población compuesta por un número limitado de clones a partir de recombinación genética [105, 106]. Esta variabilidad genética se observa muy bien en los aislamientos susceptibles, pero en el caso de los aislamientos MDR y XDR no sucede lo mismo. Se han identificado aislamientos hospitalarios XDR con tipos de secuencia (ST) específicos, dentro de los cuales se encuentran ST111, ST175 y ST235, considerados como de alto riesgo. En Hungría, Italia, Francia y España son muy comunes estos tres ST [104, 107, 108]. Sin embargo, también han sido identificados de manera independiente en países de Oceanía, África, Asia, Europa y América, siendo el ST235 el más diseminado en todos los continentes [6, 104, 107-110]. En menor medida se han reportado otros clones asociados a genes de resistencia, como por ejemplo el complejo clonal once

(CC11), el cual se ha identificado en Turquía, Grecia, Polonia, Hungría y Serbia asociado a la carbapenemasa PER-1 [111-113].

*P. aeruginosa* ST235 ha sido el clon de alto-riesgo más diseminado en diferentes países (figura 2), asociado además a carbapenemasas. En España se han descrito GES-1 y GES-5, esta última enzima también se ha identificado asociada al transposón Tn6163 en Australia [9, 114]. Las carbapenemasas reportadas en Bélgica, Corea, Grecia, Malasia, Tailandia, Rusia y España han sido de tipo VIM-2, en Bélgica VIM-4, en Grecia VIM-17, en Japón IMP-1, en Corea, Italia, Egipto y Eslovaquia NDM-1, IMP-6 en Japón, IMP-10 en Malasia, en Tailandia IMP-26, en Alemania IMP-31, en Francia NDM-1, en Corea OXA-1, en Corea y España *aac(6')-Ib*, y en Alemania OXA-35; identificadas en su mayoría en integrones clase 1 [115-126].



**Figura 2. Distribución internacional de los clones de alto riesgo epidemiológico de *P. aeruginosa*.** Distribución de los clones de *P. aeruginosa* ST235, ST111 y ST175 en América, Asia, África, Oceanía y Europa hasta el año 2015. Modificado de Oliver y col. [104][104][104][103][102][101].

## Epidemiología en América Latina

La Organización Panamericana de la salud en 2009 indicó que en América Central la resistencia a carbapenémicos varió entre 20% al 40%, siendo Honduras el país con los índices más bajos y Nicaragua con los más altos. A su vez, Bolivia tiene las tasas de resistencia más bajas en América del Sur a imipenem (20%) y meropenem (14%), contrario a Perú que presenta las tasas más altas de resistencia con 66% y 57%, respectivamente [104]. En un estudio realizado en aislamientos de once países

latinoamericanos (Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guatemala, México, Panamá, Perú y Venezuela) se observó que el 22,9% es resistente a piperacilina/tazobactam, 20,5% a amikacina, 25,9% a cefepime, 29,4% a ceftazidime, 29,4% a gentamicina, 44,9% a imipenem, 38,4% a meropenem y 0,0% a colistina, lo cual sugiere una alta circulación de clones MDR [127].

Actualmente sigue existiendo poca información de los tipos de secuencia que presentan los aislamientos que circulan en países latinoamericanos. En Brasil desde el año 1997 se ha reportado el clon pandémico ST277 asociado a SPM-1, en menor medida se han identificado los ST1560, ST2236, ST2237 y el ST244, este último asociado a CTX-M-2 [128-130]. En Colombia el ST111 y el ST235 han sido los tipos de secuencia más asociados a aislamientos resistentes a carbapenémicos, en ellos se han identificado los genes *bla<sub>VIM-2</sub>* y *bla<sub>KPC-2</sub>*, respectivamente. Cabe resaltar que la asociación de *bla<sub>KPC-2</sub>* al ST235 es un evento observado únicamente en Colombia, lo cual le brinda mayor importancia al estudio genómico de aislamientos locales ST235 que permitan tener un conocimiento epidemiológico de la situación en el país. Adicionalmente, la movilización de estos genes ha sido asociada a integrones clase 1 en el caso de *bla<sub>VIM</sub>* y el transposón Tn4401 para *bla<sub>KPC</sub>*. En menor medida el ST481 ha sido asociado a *bla<sub>VIM-2</sub>* y aunque ha sido reportado el ST227, a pesar de su resistencia a carbapenémicos, no se han identificado los genes *bla<sub>VIM-2</sub>* y *bla<sub>KPC-2</sub>* [5].

### 3 Justificación

Epidemiológicamente, *Pseudomonas aeruginosa* es de gran importancia a nivel mundial por ser el principal agente causal de neumonía asociada a ventilador según INICC y el segundo patógeno causante de bacteriemias asociadas a catéter central [131]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) indicó en el 2011 que fue el tercer patógeno que más causó infecciones en UCI. En Estados Unidos, durante el 2009 y 2010 se reportaron 51.000 infecciones hospitalarias causadas por *P. aeruginosa*, de las cuales 6.700(13%) fueron causadas por cepas multirresistentes. El 30,2% en los aislamientos causantes de neumonías, 26,1% en bacteriemias y 21,3% en infecciones de tracto urinario asociadas a catéter fueron resistentes a carbapenémicos, las cuales se estima que causan aproximadamente 440 muertes al año [132-136].

El incremento de la prevalencia de cepas multirresistentes se debe a la capacidad de mutación genética y adquisición de elementos genéticos móviles que tiene la bacteria, las cuales le permiten adquirir genes de resistencia y virulencia que incrementan la tolerancia a las condiciones medio ambientales y a la acción de los antimicrobianos, conllevando así a que el control de estas infecciones sea difícil y que los costos asociados a la atención, el tiempo de hospitalización y la morbi-mortalidad incrementen [104, 109].

El reporte de Centro Europeo para la Prevención y Control de la enfermedad (ECDC) en 2015 comunicó que *P. aeruginosa* fue el principal microorganismo en UCI asociado a neumonías en Austria (23,2%), Francia (21,0%), Bélgica (17,6%), Estonia (17,7%), Portugal (19,9%), Eslovaquia (18,2%) y España (24,6%); en países como Italia y Luxemburgo ocupó el segundo lugar con un 16,0%. En cuanto a las bacteriemias en UCI, *P. aeruginosa* fue el principal agente causal en Malta (28,6%), el segundo en Bélgica (15,4%) y el tercero en Italia (11,2%). En Asia existen pocos estudios epidemiológicos de *P. aeruginosa*, en Turquía las cepas causantes de infección en UCI, durante el periodo de 2003 a 2012 presentaron resistencia a ciprofloxacina (37,3%), piperacilina/tazobactam (30,9%), amikacina (17,7%), imipenem o meropenem en casi 41,0% [137].

Cómo se puede evidenciar, *P. aeruginosa* ha logrado diseminarse en todos los continentes y ha sido asociada con la resistencia a múltiples antibióticos de uso clínico, desarrollando diferentes eventos adversos alrededor del tratamiento de las



infecciones. Este panorama internacional no difiere del nacional, el Instituto Nacional de Salud (INS) inició programas de vigilancia epidemiológica de las IAAS en el 2012 y en el 2014 reportó a *P. aeruginosa* como el tercer microorganismo más frecuente en UCI (8%) durante el año 2011, siendo estos resistentes a ceftazidima (21,8%), cefepime (26,5%), piperacilina/tazobactam (16,1%), aztreonam (37,7%), gentamicina (26,9%), ciprofloxacina (32,2%) y amikacina (19,4%); en cuanto a los carbapenémicos, también se encontraron cepas resistentes a imipenem (39%) y meropenem (37,4%) [135].

En el presente año en Bogotá se reportó a *P. aeruginosa* como el tercer agente más frecuente (8%) en infecciones de UCI de Adultos del año 2015, se encontraron 697(24,2%) aislamientos resistentes a piperacilina/tazobactem, 754(29,3%) a ceftazidima, 756(24,7%) a cefepime, 460(25,9%) a aztreonam y 758(16,8%) a amikacina; en cuanto a los carbapenémicos se encontraron 415(40,5%) cepas resistentes a imipenem, 757(28,7%) a meropenem y 490(8,6%) a doripenem [138]. A su vez en Medellín, según la Secretaría de Salud, se reportó que durante el periodo de enero a marzo de 2016 *P. aeruginosa* fue el segundo agente causal de IAAS con 15(29,4%) aislamientos, de estos 3(20,0%) poseían carbapenemasas de tipo VIM y 1(6,7%) tipo KPC [139].

A pesar de que las organizaciones internacionales como OMS, INICC, CDC y ECDC, entre otros, reportan la frecuencia de infecciones por *P. aeruginosa* y el perfil de resistencia, pocos informan en sus reportes globales cuales son los determinantes de resistencia específicos y ninguna comunica el comportamiento clonal de la población de *P. aeruginosa*, lo cual impide identificar con más detalle los clones de circulación mundial [104]. En diferentes países, se han identificado los clones ST235, ST111, ST175, entre otros, como alto riesgo epidemiológico, los cuales no han sido reportados dentro de las cepas susceptibles a los diferentes antibióticos [104, 109]. El clon ST235 ha sido el más reportado a nivel mundial, dejando al ST111 y ST175 en un segundo plano, se ha encontrado en aislamientos de UCI en países de América, Europa y Asia [104, 108-110]. Además, diferentes estudios del ST235 han identificado genes de resistencia que codifican para  $\beta$ -lactamasas de clase A (BEL, CTX-M GES, KPC, PER, PSE), clase B (FIM, IMP, NDM, VIM) y clase D (OXA) [104]. Algunos de estos genes como IMP, VIM, SPM y NDM, se han asociado frecuentemente a integrones de clase 1, que a su vez están contenidos en transposones o plásmidos, lo cual aumenta considerablemente su capacidad de diseminación y transferencia entre diferentes clones o incluso diferentes especies bacterianas, por esta razón es de gran importancia identificar y analizar las plataformas de movilización de estos,

permitiendo así proporcionar información muy valiosa en el entendimiento epidemiológico de estos clones de circulación en Colombia y el mundo.

## 4 Objetivos

### Objetivo general

Comparar la estructura genética de las plataformas de movilización de genes de resistencia del clon de *Pseudomonas aeruginosa* ST235 causantes de infecciones en Colombia respecto a los clones reportados a nivel mundial.

### Objetivos específicos

- Determinar los genes y perfil de resistencia en los aislamientos de *P. aeruginosa* causantes de infección en cinco UCI de Colombia.
- Establecer la relación genética de los aislamientos de *P. aeruginosa*.
- Determinar y comparar las estructuras de las plataformas de movilización asociadas a resistencia en un aislamiento representativo del clon ST235 de *P. aeruginosa* con los genomas reportados.

## 5 Materiales y métodos

### Tipo de estudio y obtención de los aislamientos bacterianos.

Se realizó un estudio observacional, prospectivo y descriptivo basado en la vigilancia activa de pacientes adultos identificados con infección por *P. aeruginosa* según los criterios del CDC (2013), en cinco UCI de instituciones de tercer nivel ubicada en Bogotá D.C., Montería (Córdoba), Pereira (Risaralda), Cartagena (Bolívar) y Pasto (Nariño). El muestreo por conveniencia se efectuó consecutivamente durante 9 meses en cada una de las instituciones participantes entre octubre de 2014 a marzo de 2016, cabe resaltar que no se realizó simultáneamente el muestreo en todas las instituciones.

Al estudio se incluyeron los aislamientos provenientes de pacientes adultos que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

#### Criterios de inclusión

- Aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* recuperados de pacientes mayores de 18 años atendidos en la unidad de cuidados intensivos (UCI) de las instituciones participantes.
- Aislamientos provenientes de pacientes que cumplan las definiciones de infección de acuerdo con los criterios del CDC de Atlanta.
- Aislamientos clínicos de pacientes que aceptaron participar en el estudio por medio de la firma de consentimiento informado.
- Aislamientos identificados como *P. aeruginosa* según el reporte emitido por el laboratorio clínico institucional y confirmado por el laboratorio de referencia (LGMB-Universidad El Bosque).

#### Criterios de exclusión

- Pacientes con infecciones polimicrobianas (más de un microorganismo patógeno aislado de la misma fuente).
- Aislamientos causantes de colonización.
- Aislamientos clínicos que no fueron identificados como *P. aeruginosa*.

Todos los aislamientos fueron enviados por los laboratorios clínicos de las instituciones participantes al Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad El Bosque en medio de transporte AMIES con carbón BBL®, con el respectivo reporte de identificación y perfil de susceptibilidad realizado por el método automatizado VITEK®2 de Biomérieux. Los aislamientos fueron recuperados en agar MacConkey e incubados a 37°C por 24 horas para confirmar su pureza y viabilidad. Posteriormente fueron almacenados a -70°C en caldo tripticasa soya (TSB) con 20% de glicerol para su posterior caracterización microbiológica y molecular. En la figura 3 se esquematiza las estrategias metodológicas empleadas para la caracterización genética y molecular de los aislamientos de *P. aeruginosa* incluidos al estudio.

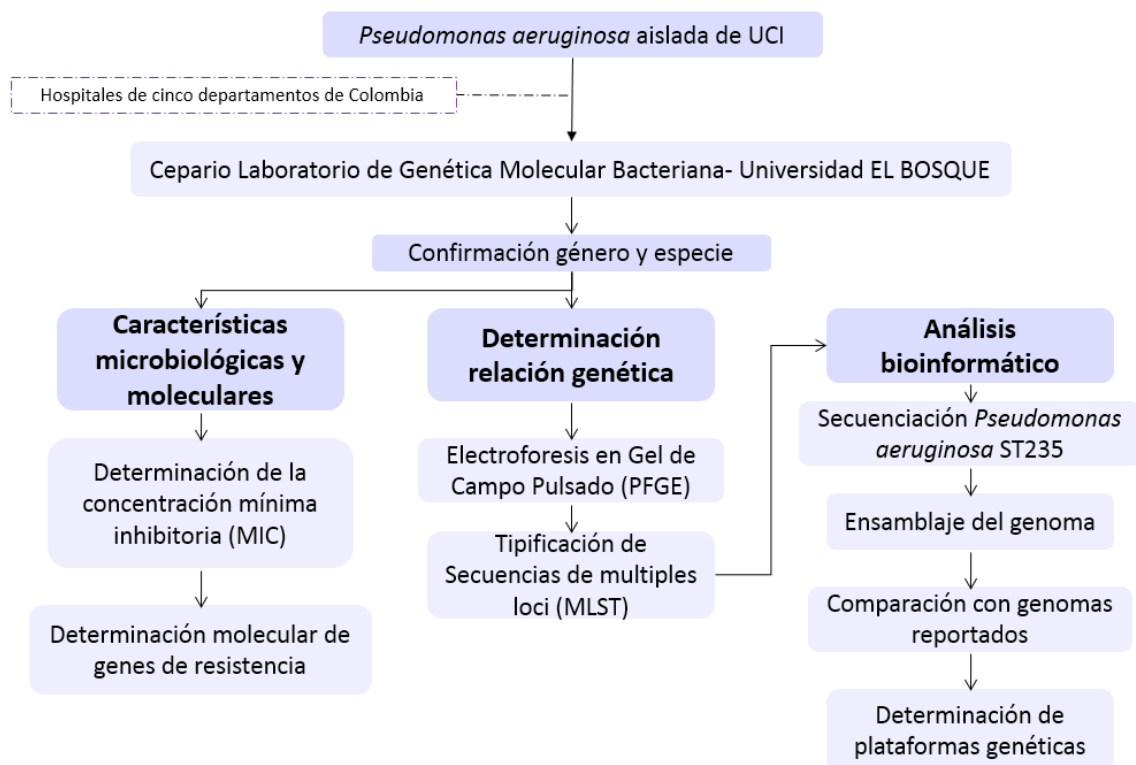


Figura 3: Diagrama de flujo de la metodología empleada en el estudio.

## Extracción de ADN bacteriano para caracterización molecular y secuenciación genómica

Se realizó una siembra de los aislamientos en agar infusión cerebro corazón (BHI) y se incubaron a 37°C por 24 horas, se tomó una colonia y se inoculó en 3 ml de caldo BHI a 37°C durante 4 horas en agitación constante (250 rpm) hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial, se centrifugó (10.000 rpm durante 5 minutos) y el pellet bacteriano se resuspendió en 50 µL de buffer lisis (TRIS HCL 1M pH 8.0, EDTA 0.5M pH 8.0, sacarosa 7%, lisostafina 1µg/µL y SDS 1.25%) y fue incubado a 37°C por 1 hora. Luego se adicionaron 150 µL de fenol cloroformo (1:1); se mezcló en vortex y se

centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo de 0.6 mL y se adicionó 200  $\mu$ L de Etanol frío al 95% para precipitar el DNA, el cual se incubó a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Después de este tiempo se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos para eliminar el etanol. El ADN se dejó secar a temperatura ambiente por 1 hora y se resuspendió en agua destilada estéril, la cuantificación y la verificación de la calidad del ADN se hizo usando NanoDrop 2000c marca BIORAD®. El ADN se llevó a una concentración de 100ng/ $\mu$ L, el cual se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

La extracción de DNA empleado para secuenciación genómica se realizó por medio del Kit Ultraclean ® Microbial ADN isolation (MO BIO laboratorios) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se tuvo en cuenta que el ADN debía cumplir unos criterios de calidad como concentración mayor a 15 $\mu$ g y una pureza con una relación DO (260/280) superior a 1,8 y DO (260/230)  $\sim$ 2,0.

## Confirmación molecular de género y especie

La confirmación molecular de género y especie de los aislamientos *P. aeruginosa* se realizó por medio de la amplificación del gen *phnX* que codifica la 2-fosfonoacetaldehído hidrolasa en PCR convencional, empleando los iniciadores GN358 (TTACCGTTGGTGAGCACG) y GN359 (TCTGCTCGACGCTGGTTA). Para la amplificación se usaron las siguientes condiciones estandarizadas en el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana: denaturación a  $94^{\circ}\text{C}$  por 60 segundos, seguido de 30 ciclos a  $94^{\circ}\text{C}$  por 60 segundos,  $54^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos,  $72^{\circ}\text{C}$  por 60 segundos y una extensión final de 7 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ . El tamaño de amplímero es de 165pb, el cual fue visualizado por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñidos con solución de bromuro de etidio 0,0001% y revelados con un analizador de geles Benchtop 3UV BioDoc-it™ Imaging System con Launch TS Software (Ultra-Violet Products Ltd.). Las cepas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 fueron usadas como control positivo y negativo, respectivamente.

## Determinación de la concentración inhibitoria mínima

La confirmación del perfil de resistencia de los aislamientos se estableció por medio de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) por el método de dilución en agar siguiendo las recomendaciones y criterios del CLSI 2016 [140]. Los nueve antibióticos evaluados fueron: Gentamicina (GEN), Amikacina (AK),

Ceftazidima, Meropenem (MEM), Ciprofloxacina y Piperacilina/Tazobactam (PTZ) [134]. La cepa *P. aeruginosa* ATCC 9721 fue usada como control de sensibilidad y la cepa *P. aeruginosa* 27853 como control de resistencia a carbapenémicos.

## Determinación molecular de genes de resistencia

Se amplificaron por PCR los determinantes de resistencia de mayor importancia clínica y epidemiológica de las siguientes familias de antibióticos:  $\beta$ -lactámicos, aminoglicósidos, quinolonas y sulfonamidas. Todos los amplímeros fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñidos con solución de bromuro de etidio 0,0001% y revelados con un analizador de geles.

### 5.1.1 Determinación de genes de resistencia a antibióticos $\beta$ -lactámicos: $\beta$ -lactamasas de espectro extendido y AmpC plasmídico.

La determinación de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub>) se realizó por medio de PCR múltiple siguiendo las recomendaciones de *Monstein y Col.* [141] con las siguientes condiciones de amplificación: denaturación a 95°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos y una extensión final de 7 minutos a 72°C; esperando productos de amplificación de 445pb para *bla*<sub>TEM</sub>, 593pb para *bla*<sub>CTX-M</sub> y 747pb para *bla*<sub>SHV</sub>. Como control positivo se emplearon las cepas de *E. coli* 7eco21 (*bla*<sub>TEM</sub>, y *bla*<sub>SHV</sub>), 7eco209 (*bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub>) y como control negativo *E. coli* ATCC 25922. Se evaluaron también los genes FOX, EBC, ACC, DHA, CIT y MOX pertenecientes a la familia de AmpC por medio de PCR múltiple siguiendo las recomendaciones de *Pérez-Pérez y Col.* [142] las cuales fueron denaturación a 94°C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 64°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos y una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los productos de amplificación esperados fueron FOX (190pb), EBC (302pb), ACC (346pb), DHA (405pb), CIT (462pb) y MOX (520pb). Se emplearon como cepas control: Aislamientos clínicos de *H. alvei*, *M. morganni*, *C. freundii* y *E. cloacae* y como control negativo *E. coli* ATCC 25922.

#### 5.1.1.1 Determinación de carbapenemasas.

Se realizó la amplificación de carbapenemasas tipo *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> por medio de PCR múltiple siguiendo las recomendaciones de *Monteiro y Col.* [143] con las siguientes condiciones de amplificación: denaturación a 94°C por

5 minutos, seguido por 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, 53°C por 45 segundos, 72°C por 60 segundos y una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los productos de amplificación fueron: *bla<sub>IMP</sub>* (120pb), *bla<sub>OXA-48</sub>* (177pb), *bla<sub>VIM</sub>* (382pb), *bla<sub>GES</sub>* (594pb), *bla<sub>KPC</sub>* (785pb) y *bla<sub>NDM</sub>* (830pb). Como control positivo se emplearon las cepas 1578 (*bla<sub>IMP</sub>*), A5931 (*bla<sub>OXA-48</sub>*), 6876 (*bla<sub>VIM</sub>*), 9571 (*bla<sub>GES</sub>*), 24kpn33 (*bla<sub>KPC</sub>*) y 24pae205 (*bla<sub>NDM</sub>*) y como negativo *E. coli* ATCC 25922. La determinación de las variantes *bla<sub>KPC-2</sub>* y *bla<sub>KPC-3</sub>* se realizó por medio de restricción enzimática del amplímero de *bla<sub>KPC</sub>* con la enzima *RsaI* por dos horas a 37°C, utilizando la mezcla de H<sub>2</sub>O destilada desionizada estéril, 2μl de buffer RE a 10X, 5μg de BSA acetilado, 10μl del producto de PCR del gen *bla<sub>KPC</sub>* y 5u de *RsaI*. Como control positivo de los genes de *bla<sub>KPC=2</sub>* y *bla<sub>KPC-3</sub>* se usaron las cepas de *K. pneumoniae* 24kpn33 y 16kpn4, respectivamente. Los productos esperados de la restricción para *bla<sub>KPC=2</sub>* fueron 70pb y 740pb y para *bla<sub>KPC-3</sub>* fueron 70pb, 120pb y 680pb; los amplímeros de *bla<sub>KPC-2</sub>* fueron confirmados por secuenciación. Las variantes *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-24</sub>*, *bla<sub>OXA-43</sub>*, *bla<sub>OXA-51</sub>*, y *bla<sub>OXA-58</sub>* se determinaron por PCR múltiple siguiendo las recomendaciones de Woodford y Col. [144] con las siguientes condiciones: denaturación a 95°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos a 95°C por 25 segundos, 52°C por 40 segundos, 72°C por 50 segundos y una extensión final de 7 minutos a 72°C; los productos de amplificación fueron: *bla<sub>OXA-23</sub>* (501pb), *bla<sub>OXA-24</sub>* (246pb), *bla<sub>OXA-43</sub>* (143pb), *bla<sub>OXA-51</sub>* (353pb), y *bla<sub>OXA-58</sub>* (599pb). Como control positivo se empleó a 24aba39 y como negativo a *E. coli* ATCC 25922.

### 5.1.2 Determinación de genes de resistencia a aminoglicósidos

En todos los aislamientos se amplificó el gen *aac(6')-Ib* por medio PCR convencional, siguiendo las recomendaciones de Park y Col. [145]. El producto de amplificación fue de 482pb, el cual fue sometido a digestión con la enzima de restricción *BseGI* con el fin de verificar la presencia de la mutación *W102R* y *D179Y* que lo diferencia de la enzima bifuncional *aac(6')-Ib-cr*, la cual tiene efecto en la disminución de la susceptibilidad a fluoroquinolonas como ciprofloxacina. La restricción se realizó durante 5 horas a 55°C, utilizando la mezcla de 7,5μl de H<sub>2</sub>O destilada desionizada estéril, 2μl de buffer Tango a 10X, 10μl del producto de PCR y 0,5μl de *BseGI*. Los productos de la restricción fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, se observa que para *aac(6')-Ib-cr* no se produce restricción, manteniéndose el amplímero de 482pb, en cambio en el gen *aac(6')-Ib* se observó un producto de restricción 212 y 270pb. Como control positivo se usaron las cepas de *E. coli* 7eco14 y 7eco18, a las cuales se les ha encontrado en estudios anteriores los genes de



*aac(6')-Ib-cr* y *aac(6')-Ib*, respectivamente [145]. Como control negativo se empleó a *E. coli* ATCC 25922.

### 5.1.3 Amplificación de genes de resistencia a quinolonas y sulfonamidas.

Se amplificaron los genes *qnrA*, *B* y *S* siguiendo estas condiciones: denaturación a 94°C por 60 segundos seguido por 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, 54°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos y una extensión final de 7 minutos a 72°C; esperando un producto de amplificación de 542pb para *qnr*. Adicionalmente se amplificó el gen *mcbg*, como control positivo se empleó *K. pneumoniae* 16-3 y como control negativo a *K. pneumoniae* ATCC 700603 [146]. A su vez, la amplificación de los genes de resistencia a sulfonamidas *sul1*, *sul2* y *sul3* se realizó por medio de PCR múltiple, siguiendo las recomendaciones de *Koljalg y Col.* [147]. Cabe resaltar que se determinó la resistencia a sulfonamidas como posible marcador de la presencia de integrones.

### Determinación de integrasas clase 1, 2 y 3

La amplificación de las integrasas 1 y 3 se realizó por medio de PCR múltiple, siguiendo las recomendaciones de *Márquez y Col.* [148] con las siguientes condiciones de corrido: 94°C por 4 minutos 30 ciclos, de 94 °C 30 segundos, 65°C por 30 segundos, 72 °C por 90 segundos y una extensión final de 7 minutos a 72°C, esperando unos productos de amplificación de 371pb y 980pb respectivamente. Para la amplificación de la integrasa clase 2 se realizó por medio de PCR convencional, usando los primers GN262: GTAGCAAACGAGTGACGAAATG y GN263: CACGGATATGCGACAAAAGGT, usando las condiciones anteriores pero con un Tm de 60° y esperando un producto de amplificación de 789pb [148]. Como control negativo se empleó a *P. aeruginosa* ATCC 27853 y como control positivo a la cepa de *A. baumannii* A98.

### Determinación de la relación genética en los aislamientos de *P. aeruginosa*.

La relación genética se realizó por medio del análisis de la electroforesis en campo pulsado (PFGE), siguiendo el protocolo de *Schwartz y Col.* [149]. Los aislamientos de *P. aeruginosa* se cultivaron en caldo BHI y se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm por 12horas, con los cuales se realizó la suspensión bacteriana con una densidad óptica de 1.5 a 625 nm en buffer (100mM Tris + 100mM EDTA, pH: 8,0). A

partir de esta suspensión se prepararon los bloques de agarosa ultra pura de grado ADN (BIO-RAD), los cuales contenían 150uL de suspensión bacteriana y 400µg de proteinasa K. Para realizar la lisis se adicionó a los bloques 1 ml de buffer de lisis (50mM Tris, 50mM EDTA, pH: 8,0 + Sarcosil al 1%) con 400µg proteinasa K, los cuales se incubaron 2 horas a 55°C por 175 rpm. Posterior a la lisis se realizaron dos lavados con agua destilada desionizada estéril a 55 °C y dos lavados con buffer TE (10mM Tris, 1Mm EDTA, pH 8,0). Los bloques se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

La restricción se realizó con 12U/µL de la enzima de restricción *SpeI* (Promega), 1X de buffer tango por 5 horas a 37°C. Los fragmentos de restricción se separaron por PFGE usando el equipo CHEFFII (Bio-Rad) con las siguientes condiciones de corrido: tiempo inicial de 6,8 segundos y tiempo final de 35,4 segundos durante 23 horas a un ángulo de 120° y un voltaje de 6,0. Los geles fueron coloreados con bromuro de etidio (3mg/µl). La imagen se capturó con un fotodocumentador (Bio-Rad) y los patrones de bandas obtenidos por PFGE fueron analizados con el programa BioNumerics SEVEN (APPLIED MATHS), generando un dendrograma con un porcentaje de tolerancia del 1%. Los pulsotipos fueron definidos teniendo en cuenta los criterios de *Tenover y Col.* y un punto de corte mayor del 80% de similitud. Se empleó como cepa normalizadora *Salmonella* serotipo Braenderup H9812 [150].

Se seleccionó un representante de los pulsotipos más frecuentes dándole mayor prioridad a los aislamientos que codificaban para carbapenemasas tipo VIM y KPC, a los cuales se les determinó el tipo de secuencia (ST) por medio de la técnica de MLST en la que se amplificó siete genes housekeeping: *acsA* (Acetil-coA sintetasa), *aroE* (Shikimato deshidrogenasa), *guaA* (GMP sintasa), *mutL* (Proteína de reparación del ADN), *nuoD* (NADH deshidrogenasa), *ppsA* (Fosfoenolpiruvato sintasa), *trpE* (Componente I de la antranilato sintasa), siguiendo las recomendaciones de *Curran y col.* [3]. Los productos de amplificación que presentaban un tamaño promedio de 500pb se secuenciaron en sentido y anti-sentido por la técnica de Sanger. El resultado de la secuenciación fue comparado por alineamiento múltiple por MultAlin (disponible en <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) con los alelos reportados para cada gen, los cuales se encuentran disponibles en *Pseudomonas aeruginosa* MLST Database de PubMLST (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>). Empleando esta herramienta también se determinó el tipo de secuencia (ST), basado en la combinación alélica.

## **Secuenciación y ensamblaje del genoma de *P. aeruginosa* ST235**

Teniendo en cuenta el tipo de secuencia y el perfil de resistencia se seleccionó al aislamiento 24pae112, representativo del clon ST235, para la secuenciación de su genoma. Para tal fin se empleó la tecnología de PacBio RS II (Pacific Bioscience) con una SMRT cell y la química P6-C4. La construcción de la librería SMRTbell™ de 20kb se realizó con BluePippin™ (Sage Science). Los subreads obtenidos fueron ensamblados *de novo* usando el protocolo SMRT Analysis v2.3, empleando el programa HGAP3 por medio del SMRT portal [151]. Posterior a la obtención del ensamblaje se efectuó un control de calidad del procedimiento realizando un mapeo de los subreads con la secuencia del contig ensamblado, por medio del software BWA-MEM (Burrows-Wheeler Aligner with maximal exact matches) 0.7.15 [152]. A partir de este análisis se seleccionaron las lecturas que mapearon con una calidad  $\geq 60$  (MAPQ) y se visualizaron en Tablet 1.16.09.06 [153]. Por la naturaleza del DNA bacteriano que es circular, se identificó la presencia de extremos repetidos por medio de un Dotplot, usando el software Genome Pair Rapid Dotter (Gepard) 1.40 [154]. Para la confirmación de este resultado se realizó un análisis del alineamiento pareado de la secuencia del genoma en los extremos con la herramienta de BLASTn (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) 2.4.0 [155] y de los marcos abiertos de lectura de esa zona con el software RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) 2.0 [156], posteriormente, la presencia de los extremos repetidos fue visualizado por medio de Artemis Comparison Tool (ACT) [157].

Por tal motivo fue necesario realizar la “circularización” del genoma, para ello se utilizó Circlator 1.3.0 [158], este software permitió eliminar los extremos repetidos del genoma de manera automática y reordenó la secuencia con punto de inicio en *dnaA*, sin embargo, al observar los resultados de la anotación en la zona de corte seleccionada por Circlator se observó que en los extremos la calidad de la secuencia continuaba baja, lo que promovió la selección de una zona de corte que contenía SNPs, los cuales generaron a partir de un marco de lectura, marcos abiertos de lectura más pequeños, por tal motivo se realizó una “circularización” manual. Para la selección del nuevo punto de corte se tuvo en cuenta según el mapeo, la zona con el mayor número de subreads con calidad de mapeo (MAPQ)  $\geq 60$ , adicional a la integridad de los marcos abiertos de lectura identificados en la anotación, posteriormente se realizó con Circlator el reordenamiento de la secuencia con punto de inicio en *dnaA* 1.3.0 [158]. Finalmente, las características de las versiones finales

de los ensamblajes obtenidos a partir del procedimiento automatizado y manual fueron comparadas con la herramienta QUASt (Quality Assessment Tool) 4.0 [159].

## **Análisis de genómica comparativa de *P. aeruginosa* ST235**

Inicialmente se realizó una búsqueda de las secuencias de genomas completos de *P. aeruginosa* ST235 en la base de datos de genomas del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Como control externo del tipo de secuencia se seleccionó a la cepa PAO1, este genoma ha sido ampliamente estudiado y revisado en *P. aeruginosa*. Hasta el 22 de julio de 2016 se identificaron 43 secuencias, 40(93,0%) fueron secuenciados por la tecnología de Illumina encontrándose en estado de borrador, 2(4,6%) por la plataforma de secuenciación 454 y 1(2,5%) por PacBio RS II; estas dos últimas permitieron tener genomas terminados. Para los análisis adicionales se incluyó el genoma de 9PS50, aislamiento de un estudio previo del Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana (LGMB), las secuencias se detallan en el anexo A.

### **5.1.4 Creación del árbol filogenético**

Se realizó un árbol filogenético del core-genoma basado en los polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP) presentes en todos los genomas ST235 por medio del software kSNP v3 [160], en el cual se utilizaron dos argumentos: Kchooser para definir el número óptimo de tamaño del k-mero (k=23) y -core para indicar el análisis únicamente para el genoma conservado. En algunas regiones de árbol, las distribuciones de las ramas en algunos aislamientos no se dilucidaban claramente, por lo cual para delimitarlas fue necesario definir un criterio. Teniendo en cuenta las ramas que se encontraban delimitadas con claridad, como por ejemplo la de los aislamientos de Grecia, se observó que la suma de las profundidades de las hojas (nodos internos) no superaba el valor de 2.0, por lo cual se realizó esta suma en cada uno de los aislamientos. Adicionalmente, se realizó la anotación de cada uno de los genomas con PROKKA v1.11 [161] y el resultado de las regiones codificantes en formato GFF3 se analizó con Roary 3.6.1 [162], el cual después de filtrar el core-genoma crea un árbol filogenético del genoma accesorio. Finalmente, los dos árboles fueron ilustrados en Dendroscope 3.5.7 [163, 164].

### 5.1.5 Identificación del resistoma

La identificación del Resistoma se realizó utilizando el software ARIBA (Antibiotic Resistance Identification By Assembly) 2.2.5, disponible en <https://github.com/sanger-pathogens/ariba>. Dicho programa requiere iniciar desde las librerías originales para hacer el ensamblaje y posterior búsqueda de los genes de resistencia en las bases de datos ResFinder [165], CARD (The Comprehensive Antibiotic Resistance Database)[166] y ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation) [167]. Por lo tanto, debido a que las secuencias de los genomas ya se encontraban ensamblados, fue necesario crear librerías artificiales de Illumina utilizando la herramienta ART v2016.06.05[168]. Finalmente, el resultado se visualizó por medio de Phandango, (<https://jameshadfield.github.io/phandango/>).

### 5.1.6 Identificación de elementos genéticos móviles

Se realizó un análisis genómico comparativo por medio de alineamientos pareados del aislamiento 24pae112 con las 44 secuencias ST235 reportadas usando BLASTn [155] y el resultado se visualizó mediante BRIG (BLAST Ring Image Generator) [169]. Posteriormente, se realizó la búsqueda de profagos y de las regiones con posibles islas genómicas o de patogenicidad por medio de alineamientos de las secuencias codificantes de 24pae112 con las proteínas de profagos e islas genómicas de PHASTER e IslandViewer, respectivamente [170, 171]. Para identificar si las regiones que correspondían a las islas genómicas fueron descritas previamente en *P. aeruginosa* se buscó en la base de datos de nucleótidos del NCBI la secuencia de las islas genómicas y de patogenicidad secuenciadas en esa especie con publicación de soporte y con ellas se realizaron alineamientos pareados con las zonas que correspondían a posibles islas genómicas de 24pae112 con el software BLASTn [155].

Por otra parte, para la determinación de las plataformas de movilización asociadas a los genes de resistencia identificados por ResFinder [165], se realizó una curación manual de la anotación en las zonas adyacentes a las que codificaban los genes de resistencia, utilizando el software BLASTp, BLASTtx y BLASTn [155], estos marcos abiertos de lectura fueron corregidos en el archivo en formato GBK obtenido en RAST y visualizados en Artemis [172]. Luego de la identificación del elemento genético móvil se realizó un alineamiento pareado de esa región de la secuencia con la base de datos del NCBI mediante BLASTp, BLASTtx y BLASTn [155], con el fin de buscar

si este había sido reportado previamente en la literatura. Finalmente, las regiones codificantes, ARNt e invertidos repetidos se ilustraron por medio de EasyFig [173].

## 6 Resultados

### Origen de los aislamientos

Se incluyeron en el estudio 58 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* causantes de infección en 56 pacientes adultos que cumplieron los criterios de inclusión, el número de aislamientos fue mayor al de pacientes debido a que en dos pacientes presentaron reinfección por *P. aeruginosa* después de 26 y 79 días respectivamente. Los pacientes tenían un promedio de edad de 53 años entre un rango de 18 y 87 años, de los cuales 32(57,12%) fueron de sexo masculino. Teniendo en cuenta el número de pacientes con IAAS, la institución hospitalaria de Montería tuvo 11(30,5%) pacientes, el mayor número de personas en la UCI con infecciones por *P. aeruginosa*, mientras que la UCI de Pasto fue la institución con menos pacientes, pues tan solo un hospitalizado (2,8%) presentó infecciones por este patógeno (tabla 4). Los diagnósticos de infección más frecuentes fueron: 14(30,4%) infecciones de tracto respiratorio, seguido de 13(28,3%) infecciones de vías urinarias, 12(26,1%) septicemias, 6(13,0%) peritonitis, y 1(2,2%) infección de sitio operatorio. La distribución por fuente de los aislamientos fue: 19(32,8%) secreciones de tracto respiratorio, 16(27,6%) hemocultivos, 13(22,4%), urocultivos, 8(13,8%) líquidos peritoneales y 2(3,4%) puntas de catéter (asociadas a bacteriemias) (tabla 4).

**Tabla 4.** Características generales de la población de estudio.

<b>Características</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
<b>Género (n=56)</b>		
Masculino	32	57,1
<b>Promedio de edad en años (n=44)</b>		
	53	
<b>Edad en años(n=46)</b>		
Adulto joven (18-26 años)	8	17,4
Adulto maduro (27-59 años)	19	41,3
Persona Mayor (60 años o más)	19	41,3
<b>Remitido de otra institución (n=45)</b>		
Sí	33	73,3
<b>Institución hospitalaria* (n=56)</b>		
Pereira	26	20,8
Montería	11	30,5
Cartagena	10	16,6
Bogotá	8	9,1
Pasto	1	2,8
<b>Estancia previa en UCI (n=35)</b>		
No	29	82,9
<b>Enfermedad previa y/o inmunosupresión (n=45)</b>		
Enfermedad pulmonar crónica	11	24,4
Diabetes	7	15,5
Enfermedad gastrointestinal	4	8,9

Hemiplejía	4	8,9
Infarto agudo de miocardio	4	8,9
Hipertensión arterial	4	8,9
Insuficiencia renal	4	8,9
Tumor	3	6,7
Enfermedad vascular periférica	2	4,4
Enfermedad cerebrovascular	2	4,4
SIDA	1	2,2
Quimioterapia	1	2,2
Ninguna	17	37,8
<b>Tipo de fuente de aislamiento n=58</b>		
Secreciones de tracto respiratorio	19	32,8
Hemocultivo	16	27,6
Urocultivo	13	22,4
Otros	10	17,2
<b>Diagnóstico de infección (n=46)</b>		
Infecciones de tracto respiratorio	14	30,4
Infecciones de vías urinarias	13	28,3
Septicemia	12	26,1
Otros	7	15,2
<b>Desenlace a 30 días posterior al diagnóstico de infección (n=44)</b>		
Resolución de la infección	19	43,2
Fallece	18	40,9
Continúa en UCI	7	15,9

\*Porcentaje calculado respecto al número de infecciones identificadas en la UCI durante el muestreo.

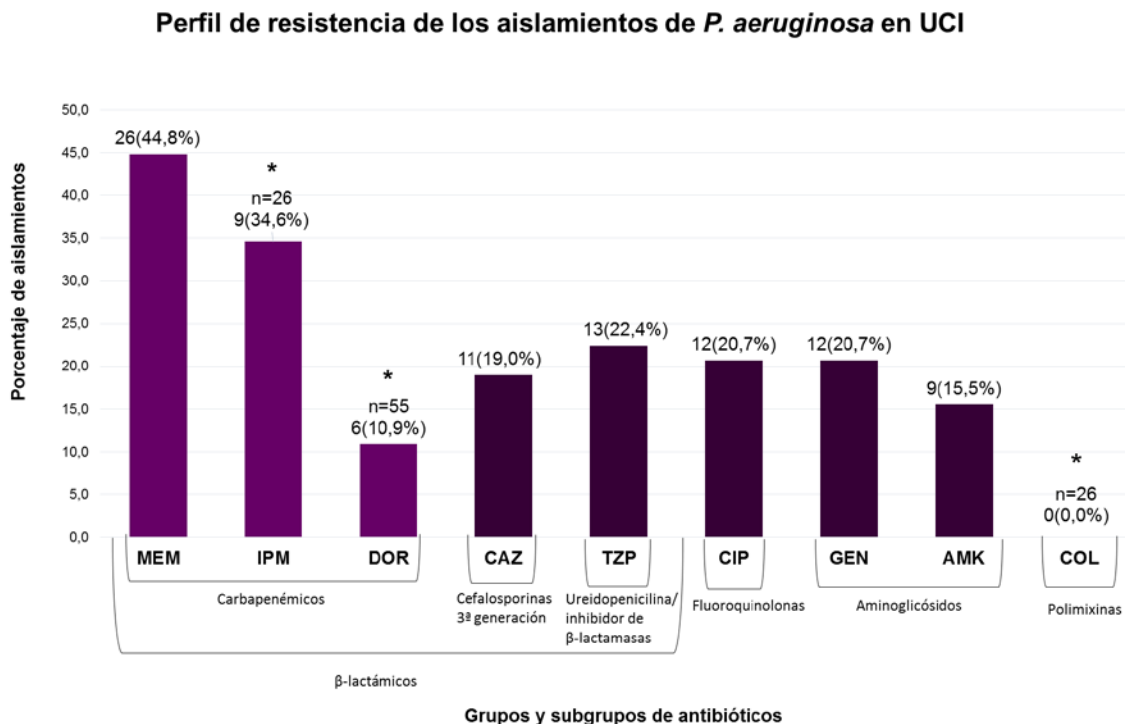
La enfermedad previa más frecuente fue enfermedad pulmonar crónica en 11(24,4%) pacientes. Sin embargo, no se estableció una asociación de factor de riesgo para la adquisición de infecciones por *P. aeruginosa* con ninguna de las comorbilidades. Del total de pacientes, 17(30,4%) no registraron el curso de enfermedades previas o inmunosupresiones. Al seguimiento de los pacientes a 30 días posteriores al diagnóstico de infección, se identificó que 19(43,2%) pacientes presentaron resolución de la infección y 18(40,9%) un desenlace fatal (muerte) y 7(15,9%) pacientes continuaron en estancia en UCI. En los pacientes con desenlace fatal no se logró establecer si el fallecimiento fue atribuible a la infección (tabla 4).

## Determinación del perfil de resistencia

Se determinó el perfil de resistencia a todos los aislamientos de *P. aeruginosa*, encontrando que 35(60,3%) aislamientos fueron resistentes como mínimo a uno de los antibióticos evaluados. Con respecto a la resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, 26(44,8%) aislamientos fueron resistentes a meropenem, 13(22,4%) a piperacilina/tazobactam, 11(19,0%) a ceftazidima, 9(34,6%) a imipenem, y 6(10,9%) a



doripenem. En cuanto a la resistencia a otros grupos de antibióticos, 12(20,7%) aislamientos fueron resistentes a ciprofloxacina, 12(20,7%) a gentamicina, 9(34,6%) a amikacina y ningún aislamiento fue resistente a colistina (de 26 aislamientos evaluados por método automatizado) (figura 4 y anexo B).



**Figura 4. Perfil de resistencia de los aislamientos de *P. aeruginosa* causantes de infección en UCI.** TZP: piperacilina tazobactam, CAZ: ceftazidima, MEM: meropenem, DOR: doripenem, IMP: imipenem, CIP: ciprofloxacina, AK: amikacina, GEN: gentamicina y COL: colistina. Los datos con asterisco (\*) fueron tomados del reporte de antibiograma por el método automático VITEK®.

Se observó que 20(34,5%) aislamientos fueron resistentes a un solo grupo de antibióticos: 17(29,3%) a β-lactámicos, 2(1,7%) a aminoglicósidos y un aislamiento (1,7%) a fluoroquinolonas. Teniendo en cuenta ello, se analizó la co-resistencia de los 15(60,3%) aislamientos resistentes restantes y se determinó que 6(10,3%) aislamientos fueron resistentes a dos grupos de antibióticos y 9(15,5%) fueron multirresistentes (resistencia a tres o más grupos de antibióticos) [174] (figura 5). De los aislamientos resistentes a dos grupos de antibióticos se observa que 3(5,2%) fueron resistentes simultáneamente a β-lactámicos y aminoglicósidos y 3(5,2%) fueron resistentes a β-lactámicos y a la fluoroquinolona CIP. Respecto a los 9(15,5%) aislamientos multirresistentes, 8(13,8%) aislamientos fueron resistentes a los carbapenémicos MER, IMP y/o DOR, algunos con perfiles de resistencia a todos los antibióticos evaluados (MER, IPM, DOR, CAZ, PTZ, CIP, AK, GEN) (figura 5 y anexo B).

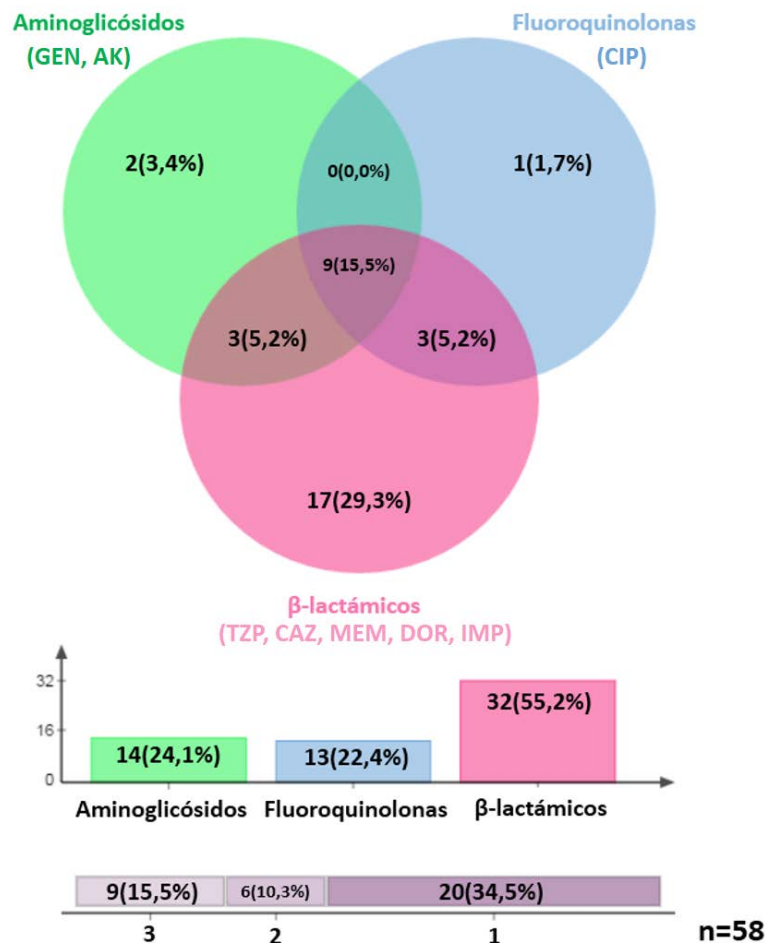
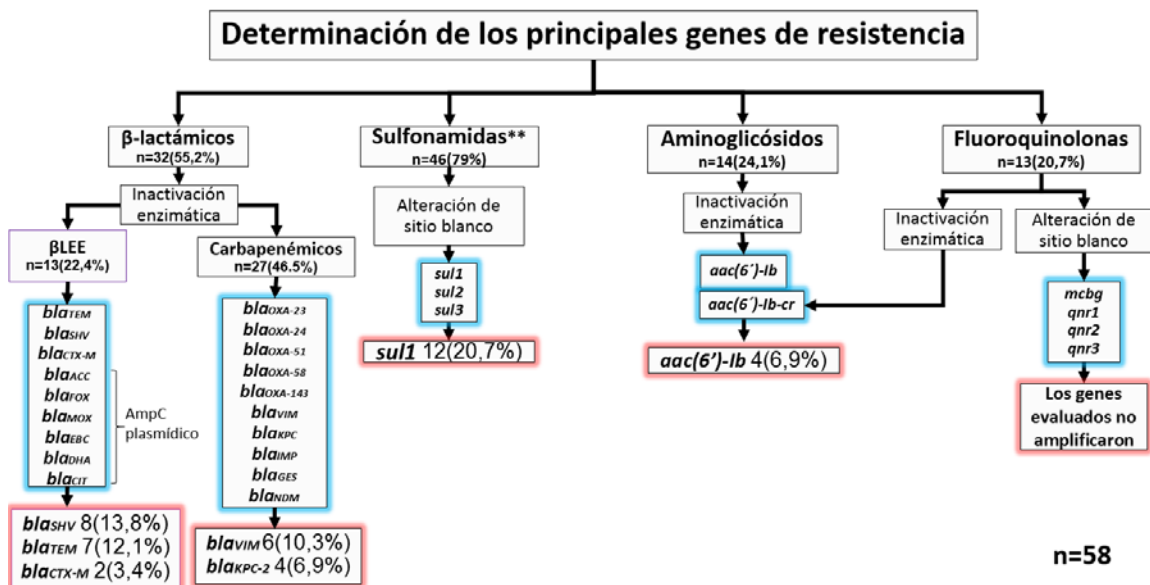


Figura 5. Perfil de co-resistencia de los 35 aislamientos de *P. aeruginosa* por grupo de antibióticos. Diagrama de Venn del perfil de resistencia por grupos de antibióticos. Las barras indican el porcentaje de aislamientos con resistencia a cada grupo de antibiótico y una gráfica de la distribución del porcentaje de aislamientos que son resistentes a uno o más grupos de antibióticos.

## Identificación de determinantes de resistencia

La presencia de los determinantes de resistencia son uno de los mecanismos de los aislamientos resistentes a las opciones terapéuticas, por lo cual se identificaron los genes de resistencia a los antibióticos β-lactámicos, aminoglicósidos y fluoroquinolonas de mayor importancia clínica que podían ser adquiridos por EGM. En el caso de antibióticos β-lactámicos se evaluó la presencia de los genes para β-lactamasas de espectro extendido (βLEE) de tipo TEM, SHV y CTX-M, los cuales amplificaron en 11(84,6%) de los 13(22,4%) aislamientos resistentes a penicilinas y/o cefalosporinas de espectro extendido. De tal manera que los genes más frecuentes fueron *bla<sub>SHV</sub>*, presentes en 8(13,8%) aislamientos, seguido de *bla<sub>TEM</sub>* en 7(12,1%) y *bla<sub>CTX-M</sub>*, en 2(3,4%) aislamientos. No se identificaron aislamientos con genes para AmpC. Adicionalmente, de los 27(46,5%) aislamientos resistentes a carbapenémicos,

17(63,0%) no codificaron las variantes de OXA-23, -24, -43 y -51 y 10(37,0%) amplificaron genes para carbapenemasas de tipo VIM y KPC, de estos se identificaron 6(10,3%) aislamientos con *bla*<sub>VIM</sub> y 4(6,9%) con *bla*<sub>KPC-2</sub>. Por lo que respecta a los 14(24,1%) aislamientos resistentes a aminoglicósidos, se identificó en 4(6,9%) de ellos el gen de AAC(6')-Ib y no se observó la enzima bifuncional AAC(6')-Ib-cr que confiere, además, disminución de la susceptibilidad a fluoroquinolonas como ciprofloxacina. En cuanto a la resistencia a este último grupo, no se identificaron los genes *qnr* y *mcbg* en ninguno de los 13(22,4%) aislamientos resistentes a ciprofloxacina los cuales confieren resistencia a este último grupo. Aunque trimetoprim-sulfametoxazol no es considerado como opción terapéutica, la resistencia fue evaluada debido a la asociación de genes de resistencia *sul* con la presencia de integrones, el gen *sul1* amplificó en 12(20,7%) de los 46(79,3%) aislamientos resistentes a SXT y no se observó la presencia de *sul2* ni *sul3* (figura 6 y anexo B).



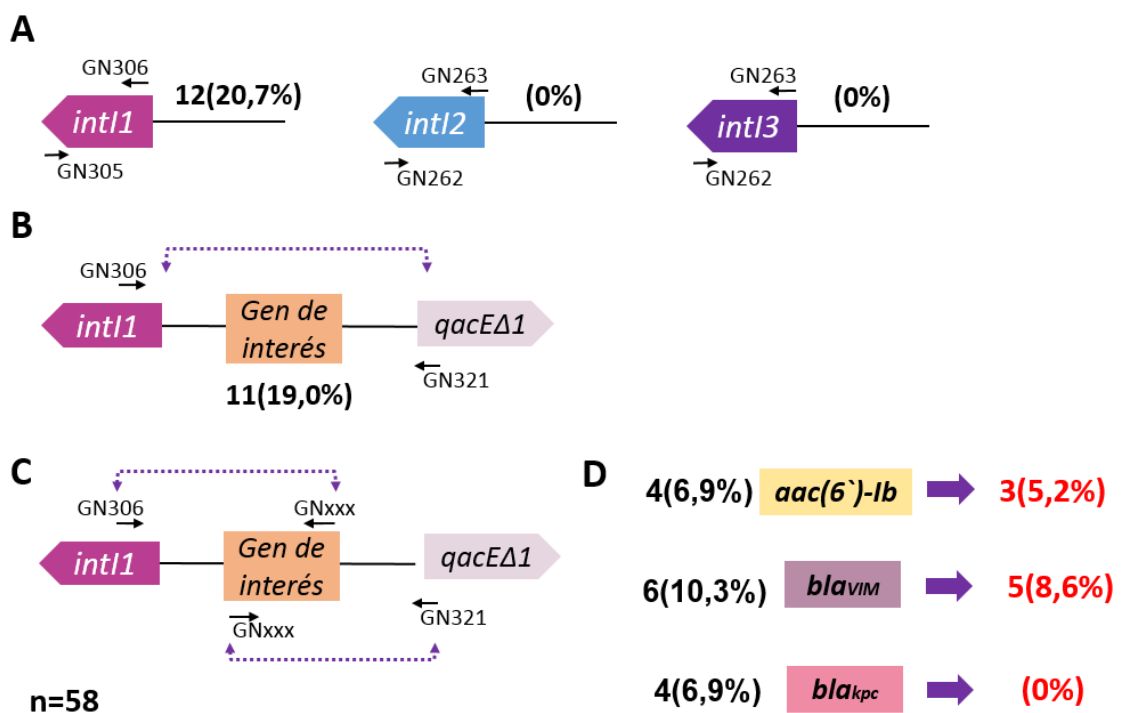
**Figura 6: Porcentaje de resistencia a las principales familias de antibióticos y su correlación genotípica en los aislamientos de *P. aeruginosa*.** En el diagrama se ilustra el porcentaje de aislamientos resistentes a cada grupo de antibióticos seguido del mecanismo de resistencia evaluado. A su vez, en recuadros azules se indican los genes de resistencia que fueron evaluados y en rojo los determinantes de resistencia que fueron identificados con el respectivo porcentaje de aislamientos positivos.

\*\*No es opción terapéutica para infecciones por *P. aeruginosa* en UCI.

## Identificación de integrasas.

Los genes de los determinantes de resistencia pueden ser integrados al genoma por medio de los integrones, estas plataformas han sido ampliamente diseminadas en las bacterias Gram negativas, incluyendo *P. aeruginosa*. Por lo tanto, en los aislamientos de este estudio se determinó la frecuencia de estas estructuras por medio de la

amplificación de los genes *int1*, *int2* e *int3*, los cuales corresponden al gen que codifica la integrasa. Como resultado se encontró que 12(20,7%) aislamientos amplificaron el gen *int1* y ninguno de los aislamientos amplificó *int2* o *int3*. Una vez identificada la presencia del gen que codifica la integrasa clase 1, se realizó la amplificación de la región variable desde el extremo 5' conservado (*int1*), hasta el extremo 3' conservado (*qacEΔ1*) para así conocer el tamaño aproximado de la región variable donde se integran los diferentes genes casete. El mapeo de la región variable de estos integrones clase 1, produjo un amplímero con diferentes tamaños en 11(19,0%) aislamientos. En los aislamientos que se determinaron integrones clase 1, también fueron determinados genes de resistencia a carbapenémicos o aminoglicósidos, por tanto, se identificó si estos genes estaban integrados en la región variable del integrón, encontrando que los genes *bla<sub>VIM</sub>* y *aac(6')-Ib* se encontraron integrados (figura 7 y anexo C). Sin embargo, para identificar la estructura completa de los integrones en los aislamientos es necesario realizar secuenciación



**Figura 7. Determinación de genes de resistencia en integrones de *P. aeruginosa*.** (A) Identificación de la integrasa de clase 1, 2 y 3. Los recuadros indican los genes estudiados, las flechas negras corresponden a los primers utilizados con su respectivo código y finalmente se muestra el porcentaje de aislamientos positivos. (B) Amplificación de la región variable del integrón clase 1. Las flechas punteadas determinan las regiones amplificadas para la identificación de integrones en los aislamientos. (C) Determinación de los genes de resistencia en la región variable del integrón clase 1. (D) Porcentaje de aislamientos con genes de resistencia en la región variable de integrones clase 1. El porcentaje de color

negro antes del recuadro del gen de resistencia indica el porcentaje de aislamientos que codifican el gen, el porcentaje de color rojo muestra el porcentaje de aislamientos que amplificaron la región variable con el gen de interés.

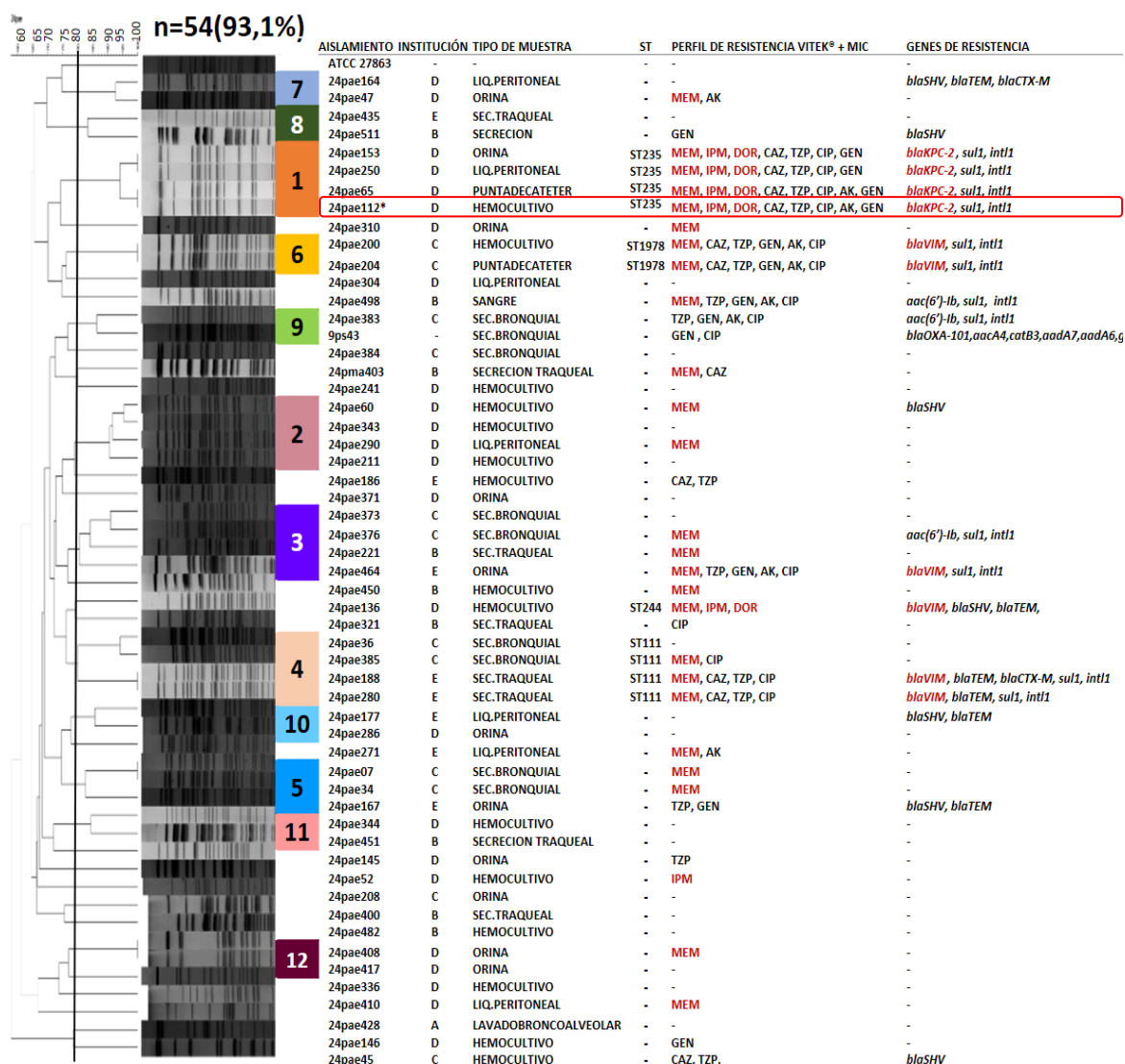
Posterior a la identificación del perfil de resistencia de los aislamientos, los determinantes de resistencia asociados y la presencia de integrones de clase 1, se determinó la relación genética de los aislamientos con el fin de identificar el ST235, el cual es el tipo de secuencia de interés en este estudio.

## Relación genética

Para la identificación del ST235 fue necesario determinar inicialmente la relación genética de todos los aislamientos por PFGE y posteriormente determinar el tipo de secuencia de un representante de los pulsotipos más importantes. Respecto a la relación genética de los 54 (93,1%) aislamientos evaluados (en 4 aislamientos no fue posible obtener un perfil de bandas) no se observó la circulación de un pulsotipo predominante en las instituciones participantes. Teniendo en cuenta una similitud mayor al 80% se encontraron 34 pulsotipos diferentes, de los cuales 22(64,7%) pulsotipos fueron de un único aislamiento y 12(35,3%) de dos o más aislamientos; lo que sugiere que los aislamientos de *P. aeruginosa* tuvieron un comportamiento policlonal (figura 8).

Los aislamientos resistentes a carbapenémicos se relacionaron en 15 pulsotipos diferentes, de los cuales fueron identificados los cuatro pulsotipos más frecuentes (pulsotipo 1, 2, 3 y 4), estos estaban conformados cada uno por cuatro aislamientos. En la figura 8 puede observarse la asociación de los pulsotipos con las demás características microbiológicas y moleculares encontradas (figura 8).

Por su importancia clínica, el tipo de secuencia fue determinado en un aislamiento representante de los pulsotipos con aislamientos productores de carbapenemasas (*bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>VIM</sub>*). De los seis aislamientos con *bla<sub>VIM</sub>*, cinco se distribuyeron en tres pulsotipos y ST diferentes; el ST111 (17-5-5-4-4-4-3) fue asociado en el pulsotipo cuatro a 2(3,4%) aislamientos de Bogotá (24pae188 y 24pae280), el ST1978 (45-148-15-35-17-8-177) en los 2(3,4%) de Montería del pulsotipo seis (24pae200 y 24pae204) y el ST244 (17-5-12-3-14-4-7) en 1(1,7%) de Pereira (24pae136). Curiosamente, los 4(6,9%) aislamientos que tenían el gen *bla<sub>KPC-2</sub>* provenían de Pereira, fueron multirresistentes y se asociaron al ST235 (38-11-3-13-1-2-4) en el pulsotipo uno, lo que indica que el clon de *Pseudomonas aeruginosa* ST235 no fue prevalente en la población de estudio (figura 8).



**Figura 8: Dendrograma de los aislamientos de *P. aeruginosa*.** La línea negra vertical corresponde al 80% de similaridad que es el punto de corte para establecer la relación clonal. Los números dentro de los recuadros de colores indican cada clon identificado según su frecuencia. De las ciudades de origen de los aislamientos se identificaron como (A) Pasto, (B) Cartagena, (C) Montería, (D) Pereira y (E) Bogotá. Los antibióticos evaluados son: TZP: piperacilina tazobactam, CAZ: ceftazidima, MEM: meropenem, DOR: doripenem, IMP: imipenem, CIP: ciprofloxacina, AK: amikacina y GEN: gentamicina. Se resalta con un recuadro rojo y un asterisco (\*) el aislamiento ST235 seleccionado para secuenciación del genoma.

## Secuenciación del aislamiento 24pae112 perteneciente al clon de *P. aeruginosa* ST235

A partir de los cuatro aislamientos pertenecientes al ST235 identificados en el estudio, el aislamiento 24pae112 fue seleccionado para la secuenciación de su genoma, el cual fue recuperado a partir de un hemocultivo de un paciente con diagnóstico de septicemia y presenta un perfil de multirresistencia (MEM, IMP, DOR, CAZ, TZP, CIP, AK y GEN). Para la secuenciación del genoma se utilizó la tecnología de Pacific Biosciences (PacBio) obteniendo 136.958 subreads, los cuales correspondieron a un

total de 1.221'367.395 bases, con cobertura media de 147,1x (tabla 5). El ensamblaje *de novo*, generó como resultado un único contig de 7'111.564 de bases, lo cual sugiere que esta cepa no posee plásmidos (tabla 5).

**Tabla 5.** Características del genoma ensamblado de 24pae112.

Características	Resultados secuenciación	Versiones del ensamblaje		
	Subreads	Inicial	Circularización con Circlator	Circularización manual *
Tamaño total (pb)	1.221'367.395	7'111.564	7'097.245	7'097.241
Nº de subreads/contigs	136.958	1	1	1
Promedio de longitud (pb)	8.917	-	-	-
Contenido G+C (%)	-	65,98	65,99	65,99
Cobertura media	147,1x	-	-	-

\*Ensamblaje seleccionado.  
G+C=Guanina-citosina.

En el control de calidad del ensamblaje, los alineamientos pareados permitieron la identificación de la presencia de extremos repetidos sugestivos de secuencias circulares. Con el fin de evitar duplicaciones erróneas y debido a la naturaleza circular del cromosoma fue necesario realizar la “circularización” de la secuencia. Para ello se delimitó la zona de corte con un método manual, debido a que el sitio de corte seleccionado por el método automatizado (Circlator 1.3.0) [158] no fue el más adecuado, puesto que en la zona de corte en cada extremo repetido del genoma se evidenció baja cobertura de las lecturas que promovieron en la secuencia ORFs, truncados por SNPs (alteraciones erróneas de los marcos abiertos de lectura) (anexo A), los cuales fueron identificados completos con la “circularización” manual (anexo C) [158]. Por tal motivo se seleccionó la versión obtenida con este último método (tabla 5).

El genoma del aislamiento 24pae112 después del control de calidad está conformado por un cromosoma circular de 7'097.245pb (sin plásmidos) que contiene 6.624 marcos abiertos de lectura, de los cuales 328(4,9%) corresponden a proteínas de transporte de membrana, 224(3,4%) de la pared celular, 202(3,0%) de virulencia, patogenicidad y defensa, 97(1,5%) de elementos genéticos móviles como profagos y otros elementos de transposición, 63(0,9%) codifican ARNt y 12(0,2%) ARNr y 12(0,2%) genes de resistencia, entre otras proteínas necesarias para el metabolismo celular e hipotéticas.

## Relación filogenética de 24pae112 con otros genomas ST235

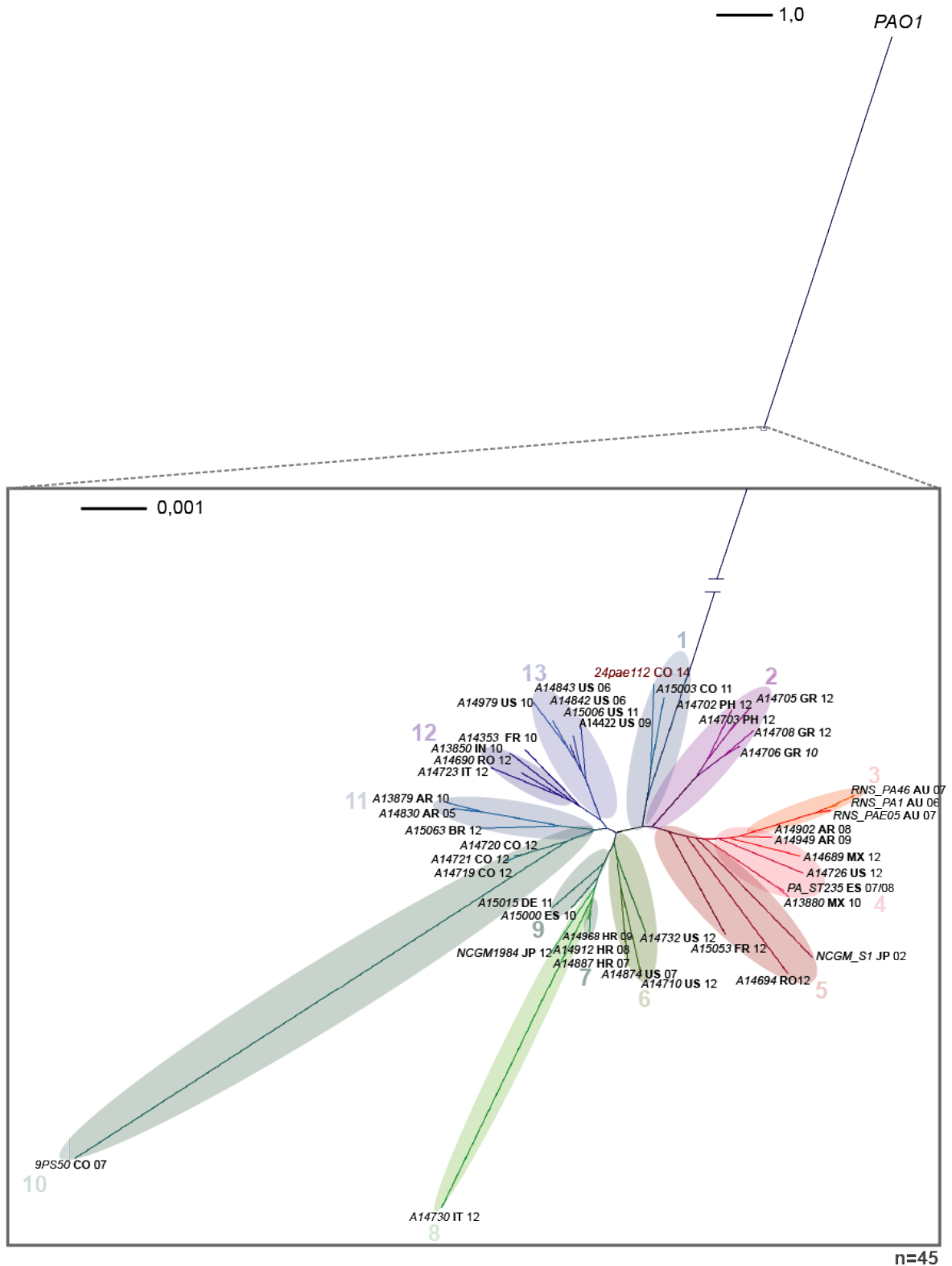
Para el análisis filogenético del clon ST235 se incluyeron 43 genomas de *P. aeruginosa* ST235 previamente reportados en el NCBI a la fecha de 22 de julio de 2016, pertenecientes al ST235 habían sido reportados en la base de datos de nucleótidos del NCBI provenientes de diferentes continentes [6, 9, 175-179]. Además, para el análisis comparativo se incluyó el genoma del aislamiento colombiano 9PS50, el cual fue identificado en un estudio previo realizado por el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad El Bosque en la ciudad de Montería en 2007. Este aislamiento es resistente a carbapenémicos, pero no produce ninguna carbapenemasa. [178]

Las fechas de aislamiento de las cepas ST235 reportadas a nivel mundial oscilan entre el año 2002 y el 2014. De acuerdo a su lugar de origen, se estudiaron 21(47,7%) aislamientos de América, 15(34,1%) de Europa, 5(11,4%) de Asia y 3(6,8%) de Oceanía. De los aislamientos de América, 9(20,4%) provienen de Estados Unidos, 5(11,4%) de Colombia, 4(9,1%) de Argentina, 2(4,5%) de México y 1(2,3%) de Brasil (Anexo A). En cuanto a los provenientes de Europa 3(6,8%) aislamientos fueron identificados tanto en Croacia como en Grecia, 2(4,5%) en España, Francia, Rumania e Italia y 1(2,3%) en Alemania. Respecto al país de origen de los aislamientos asiáticos, se identificaron 2(4,5%) en Filipinas al igual que en Japón y 1(2,3%) en India. Por su parte, los 3 aislamientos de Oceanía fueron identificados en Australia (Anexo A) [9, 175-178].

### 6.1.1 Relación filogenética del genoma “core”

Los genomas de los 44 aislamientos ST235 y 24pae112 fueron empleados para la determinación de las distancias filogenéticas del clon ST235, se realizó un análisis inicial teniendo en cuenta únicamente los genes conservados en todos los aislamientos (genoma “core”). El genoma accesorio no fue incluido, dado que incluye las islas genómicas, profagos, secuencias de inserción, transposones e integrones de cada aislamiento y probablemente se calcularían distancias más lejanas entre los aislamientos muy relacionados.





**Figura 9: Árbol filogenético de aislamientos de *P. aeruginosa* ST235 obtenido a partir del core-genoma por el método de máxima parsimonia (MP).** Se incluyen 45 aislamientos de *P. aeruginosa* y la cepa PAO1, los aislamientos fueron nombrados con el nombre original de cada publicación, seguido de las siglas del país (en negrilla) siguiendo la norma ISO 3166-1 y el año de recuperación. Las cepas que inician con el nombre A1 fueron simplificadas del nombre original (AZPAE1). Los números y elipses de colores indican cada rama, en la cual la suma de las profundidades de todas sus hojas (nodos internos) no supera el valor de 2.0. Las líneas de escala (1,0 y 0,001) indican el número de sustituciones nucleotídicas por sitio.

En la figura 9 se muestra que los 45 aislamientos fueron agrupados en trece ramas de diferentes tamaños, sugiriendo que, aunque todos pertenecen al mismo ST, hay una variabilidad genética dentro del clon. En la rama número uno se encontró al aislamiento 24pae112 relacionado con otro aislamiento colombiano AZPAE15003, los cuatro aislamientos colombianos restantes (9PS50, AZPAE14719, AZPAE14720 y AZPAE14721) fueron agrupados en la rama 10, en donde se observó que el aislamiento 9PS50 presentó una mayor variabilidad genética. No se encontró una asociación con el año de identificación ni con la presencia de *bla*<sub>KPC-2</sub>, lo cual sugiere que en Colombia circulan por lo menos dos linajes genéticos dentro del ST235. Interesantemente, el aislamiento 24pae112 presentó una mayor relación genética con los aislamientos identificados en Grecia, que con países del mismo continente (figura 9).

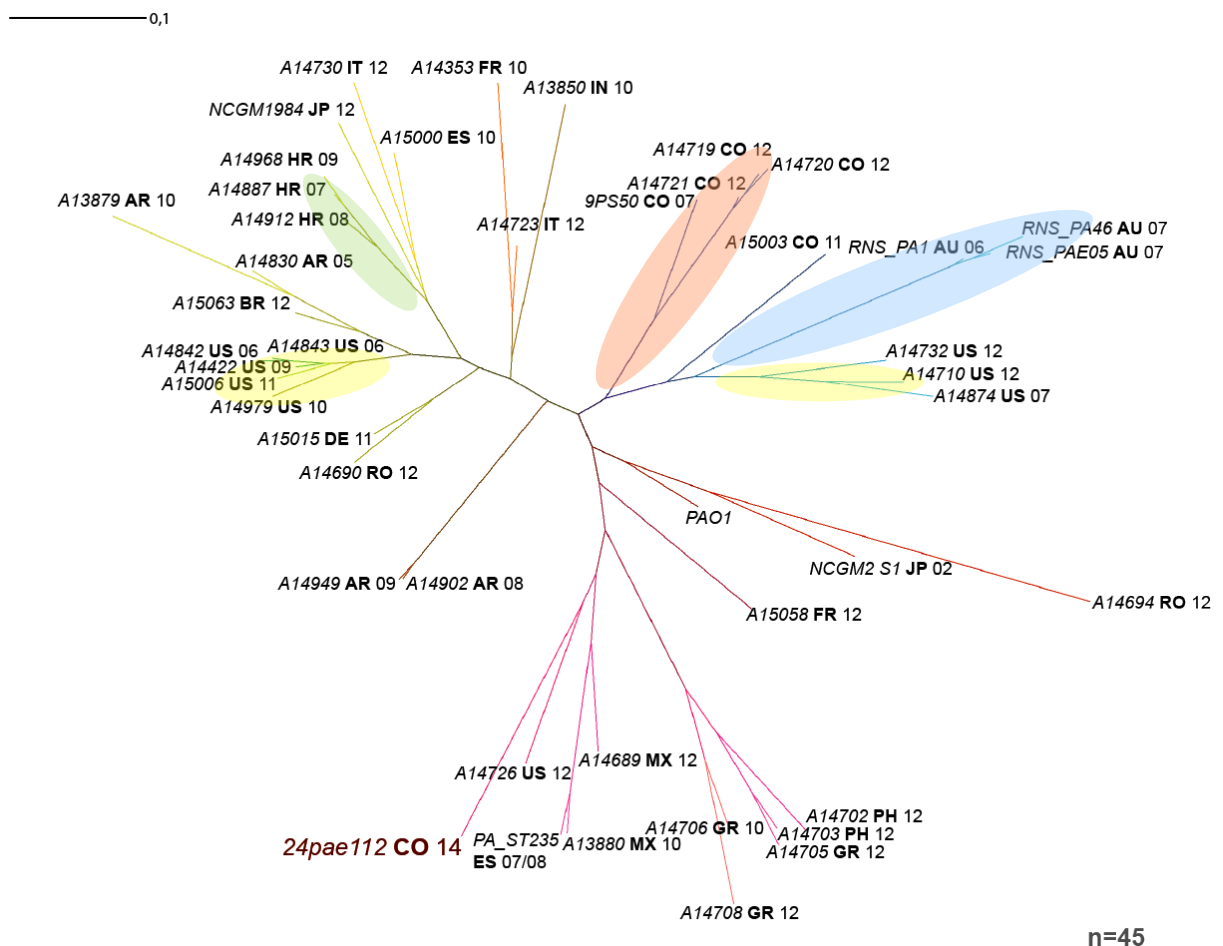
En términos generales, los aislamientos identificados en cada país se agruparon en la misma rama o en ramas cercanas, excepto para los aislamientos de Estados Unidos (US) que se agruparon en las ramas 4, 5, 6 y 13; Argentina en las ramas 4 y 11; y Colombia en las ramas 1 y 10. Estos resultados sugieren que posiblemente algunos clones circulan en diferentes países y que en Estados Unidos, Argentina y Colombia circulan linajes genéticos dentro del ST235 (figura 9).

### 6.1.2 Relación genética del genoma accesorio

El análisis de la relación genética del genoma accesorio mostró una dispersión de los aislamientos sugiriendo una variabilidad genética entre los aislamientos ST235, debida posiblemente a procesos de adquisición de material genético independientes entre los aislamientos. En cuanto a los seis aislamientos de Colombia ST235, en cuatro de ellos (9PS50, AZPAE14719, AZPAE14720 y AZPAE14721) se observa estrecha relación del genoma accesorio, unido este resultado con la estrecha relación encontrada con el genoma “core” del 9PS50, posiblemente estos pertenezcan a un mismo clon que se ha diseminado en el país desde el año 2007 y ha adquirido pocos elementos genéticos móviles diferenciadores, como por ejemplo el gen *bla*<sub>KPC</sub>, identificado en los aislamientos recuperados del 2011 y ausente en el aislamiento del 2007. Por otro lado, el aislamiento 24pae112 se localizó muy lejos respecto a los otros aislamientos colombianos, incluso con el aislamiento que presentó mayor relación genética en su genoma “core”, el AZPAE15003, mostrando así que su genoma accesorio es diferente. Estos resultados sugieren que este aislamiento ha

adquirido diferentes o nuevos elementos genéticos. Interesantemente, el genoma accesorio de 24pae112 está más relacionado con AZPAE14726 (US), AZPAE14689 (MX), AZPAE13880 (MX) y PA\_ST235 (ES), aislamientos con los cuales su genoma “core” no tiene relación genética (figura 10).

El genoma accesorio de algunos aislamientos se relacionó según el país, tal fue el caso de RNS\_PA1, RNS\_PA46 y RNS\_PAE05 de Australia (AU), AZPAE14830, AZPAE14887, AZPAE14912 y AZPAE14968 de Croacia (HR), 9PS50, AZPAE14719, AZPAE14720 y AZPAE14721 de Colombia (CO) y AZPAE14422, AZPAE147102, AZPAE14732, AZPAE14874, AZPAE14842, AZPAE14979 y AZPAE15006 de Estados Unidos (US), lo que sugiere que en estos países podrían circular plataformas genéticas móviles con los genes necesarios para la adaptabilidad, supervivencia y el establecimiento del clon ST235 (figura 10).



**Figura 10:** Árbol filogenético del genoma accesorio de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* ST235 obtenido a partir del método de máxima verosimilitud (ML). Se incluyen 45 aislamientos de *P. aeruginosa* y la cepa referencia PAO1, los aislamientos fueron nombrados con el nombre original de cada publicación, seguido de las siglas del país (en negrilla) siguiendo la norma ISO 3166-1 y el año de recuperación. Las cepas que inician con el nombre A1 fueron simplificadas del nombre original (AZPAE1). Las elipses de colores indican las ramas con aislamientos relacionados provenientes de un mismo país. La línea de escala (0,1) indica el número de sustituciones nucleotídicas por sitio.

La posible variabilidad del genoma accesorio observada en los aislamientos ST235 analizados, puede estar dada por la adquisición de diferentes genes por medio de plataformas genéticas móviles. Debido a la ventaja adaptativa que confiere la presencia de los genes de resistencia en los aislamientos y la importancia epidemiológica de su diseminación, se realizó la identificación del resistoma en 24pae112 y en los demás aislamientos ST235.

## Resistoma de *P. aeruginosa* ST235

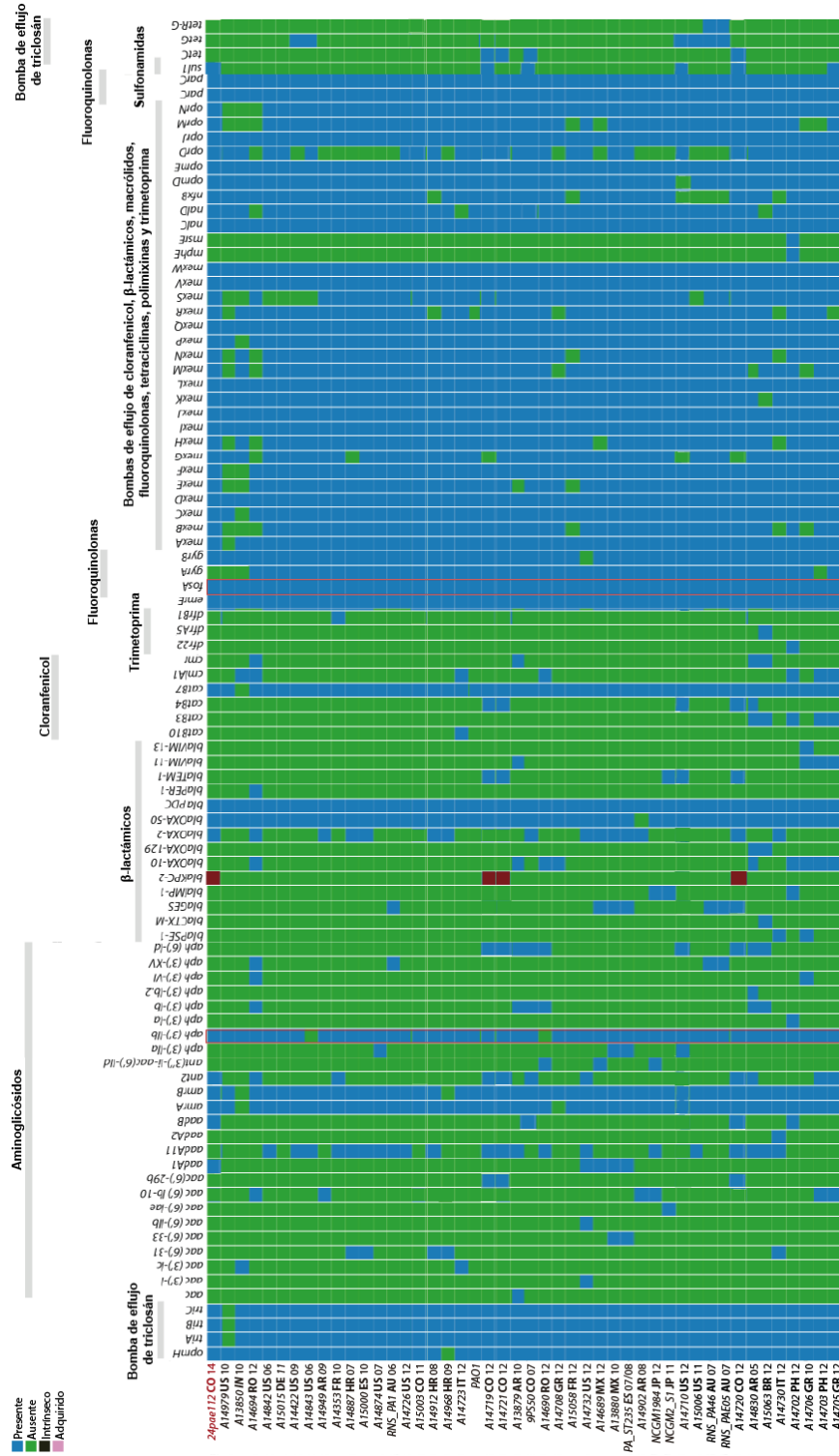
El resistoma de 24pae112 fue conformado por los siguientes genes de resistencia intrínsecos y adquiridos: *aadB*, *aadA1*, *aph(3')-IIb* y *ant2* para aminoglicósidos, *bla<sub>OXA-2</sub>*, *bla<sub>PDC</sub>*, *bla<sub>OXA-50</sub>* para penicilinas y cefalosporinas, *bla<sub>KPC-2</sub>* para carbapenémicos, *sul1* para sulfonamidas, *catB7* para cloranfenicol, *fosA* para fosfomicina y los operones de bombas de eflujo: *mexAB-oprM*, *mexCD-oprJ*, *mexEF-oprN*, *mexJK*, *mexGHI-opmD*, *mexVW*, *mexPQ-opmE*, *mexMN*, *triABC*. Con respecto a la resistencia adquirida a aminoglicósidos, en comparación con los 44 genomas ST235 restantes, fueron evidenciadas ocho variantes de la aminoglicósido-acetil-transferasa no identificadas en 24pae112: *aac(6')-Ib-10* en 6(13,6%) aislamientos, *aac(6')-31* en 5(11,4%), *aac(6')-29b* en 4(9,1%), *aac(3')-Ic* y *aac(6')-33* en 2(4,5%), *aac(3')-I*, *aac(6')-IIb* y *aac(6')-Iae* cada uno en un aislamiento (2,3%). Fueron identificadas cuatro variantes de la aminoglicósido-adenilil-transferasa de las cuales solo *aadB* fue encontrada en 24pae112, *aadA11* en 22(50,0%) aislamientos, *aadB* y *aadA1* en 4(9,1%), y *aadA2* en un aislamiento (2,3%). En cuanto a la codificación de la aminoglicósido-nucleotidil-transferasa (ANT), se observó la presencia de la variante *ant2* tanto en 24pae112 como en 11(25,0%) aislamientos y, a diferencia de 24pae112 3(6,8%), presentaron el gen *ant(3'')-Ii-aad(6')-IId*. Respecto a la codificación de la aminoglicósido-fosforil-transferasa (APH) fueron identificadas siete variantes no presentes en 24pae112, siendo la más frecuente la codificada por el gen *aph(3')-IIb* identificada en 42(95,4%) aislamientos, seguida de *aph(6')-Id* en 9(20,4%), *aph(3')-Ib* en 6(13,6%), *aph(3')-XV* en 4(9,1%), *aph(3')-IIa* en 3(6,8%), *aph(3')-VI* en 2(4,5%) y *aph(3')-Ia* en un aislamiento (2,3%) (figura 11).

*P. aeruginosa* 24pae112 no codificó  $\beta$ LEE diferentes a las intrínsecas de su género, sin embargo, en algunos de los aislamientos ST235 analizados fueron determinados seis genes que codificaron  $\beta$ LEE: *bla<sub>OXA-10</sub>* en 9(20,4%) aislamientos, *bla<sub>TEM-1</sub>* en 5(11,4%), *bla<sub>PSE-1</sub>* y *bla<sub>OXA-129</sub>* en 2(4,5%), *bla<sub>CTX-M</sub>*, y *bla<sub>PER-1</sub>* cada uno en un aislamiento (2,3%). Con respecto a las carbapenemasas, fueron identificados tres

genes de metalo- $\beta$ -lactamasas (*bla*<sub>VIM-11</sub>, *bla*<sub>VIM-13</sub> y *bla*<sub>IMP-1</sub>) y dos de serin-carbapenemasas (*bla*<sub>GES</sub> y *bla*<sub>KPC-2</sub>). La metalo- $\beta$ -lactamasa más frecuente fue *bla*<sub>VIM-11</sub> en 4(9,1%) aislamientos, seguida de *bla*<sub>IMP-1</sub> en 3(6,8%) y *bla*<sub>VIM-13</sub> en uno (2,3%). A su vez, *bla*<sub>GES</sub> en 10(22,7%) aislamientos fue la serin-carbapenemasa más frecuente, por su parte, el gen *bla*<sub>KPC-2</sub> fue el único determinado en 24pae112 también identificado en 3(6,8%) aislamientos (figura 11).

En cuanto a los determinantes de resistencia a sulfonamidas e inhibidores de la dihidrofolato reductasa, al igual que en 24pae112, se identificó el gen *sul1* en 5(11,4%) aislamientos, el cual codifica para una dihidropteroato sintasa resistente a sulfonamidas. Adicionalmente se identificó que cada uno de los 3(6,8%) aislamientos tienen *dfr22*, *dfrA5*, y *dfrB1*, genes que codifican dihidrofolato reductasas resistentes a trimetoprima. Respecto a los genes de resistencia a cloranfenicol que codificaron 4 variantes del cloranfenicol acetiltransferasa, entre ellos el más predominante fue el gen *catB7* identificado en 43(97,7%) aislamientos, al igual que en 24pae112, *catB3* y *catB4* en 5(11,4%) y *catB10* en uno (2,3%). Respecto a los genes de resistencia para antibióticos del grupo de las fluoroquinolonas, aunque no fueron identificados genes que codifican para mecanismos enzimáticos (*qnr*, *mcbg* ni *aac(6')-Ib-cr*) se evidenció mutaciones en los blancos de acción: ADN girasa y topoisomerasa IV, de tal manera que los 44(100%) aislamientos que tenían *parC* codificaron las sustituciones *S80L* y *A85G*, 43(97,7%) codificaron en *gyrB* las sustituciones *Q459R* y *Q469V*, finalmente 41(91,2%) cepas tenían en *gyrA* la sustitución *T83I* (figura 11).

*P. aeruginosa* posee diferentes genes que codifican sus mecanismos de resistencia intrínsecos, tal es el caso de las  $\beta$ LEE como *bla*<sub>PDC</sub>, *bla*<sub>OXA-50</sub>, los operones de bombas de eflujo: *mexAB-oprM*, *mexCD-oprJ*, *mexEF-oprN*, *mexJK*, *mexGHI-opmD*, *mexVW*, *mexPQ-opmE*, *mexMN*, *triABC* y el gen de resistencia a cloranfenicol *catB7*. Estos genes fueron identificados en 24pae112, sin embargo, en algunos aislamientos no fueron observados los genes necesarios para algunas bombas de eflujo y un aislamiento de Argentina (AZPAE149029) no codificó OXA-50, esto podría ser gracias a mutaciones en la secuencia o errores al momento del ensamblaje (figura 11).



**Figura 11: Resistoma de *P. aeruginosa* ST235.** Los recuadros azules indican presencia del gen y los verdes ausencia del mismo, superior al nombre del gen se menciona el grupo de antibiótico al cual confiere resistencia e inferior a cada columna un rectángulo indica si es un gen intrínseco (verde oscuro) o adquirido (rosado). Los aislamientos fueron nombrados con el nombre de la cepa de cada publicación, seguido de las siglas del país de origen siguiendo la norma ISO 3166-1 y el año de recuperación. Las cepas que inician con el nombre A1 fueron simplificadas del nombre original (AZPAE1). Se resaltó en rectángulos rojos la columna de los genes que se identificaron en la mayoría de la población, adicionalmente se resalta en cuadros rojos el gen *bla<sub>KPC-2</sub>* presente únicamente en los aislamientos colombianos.

El resistoma de los aislamientos de *P. aeruginosa* ST235 no fue idéntico en todos los aislamientos, lo que sugiere variabilidad genética de este clon. A pesar de ello, se observó un predominio de aislamientos que codificaron FosA (100,0%) y APH(3')-IIb (95,5%), lo que sugiere que probablemente los aislamientos del clon ST235 pueden ser resistentes a fosfomicina y a antibióticos aminoglicósidos. En la mayoría de los casos la presencia de los genes no fue relacionado por el año de aislamiento o el país de origen, sin embargo, de los 45 genomas analizados, los aislamientos colombianos 24pae112, AZPAE14719, AZPAE14720 y AZPAE14721 fueron los únicos en codificar la carbapenemasa KPC-2, lo que sugiere la amplia diseminación local de este gen en plataformas genéticas móviles (figura 11).

## Elementos genéticos móviles de 24pae112

Dada la importancia epidemiológica de diseminación y transferencia de los genes de resistencia entre diferentes clones, o incluso diferentes especies bacterianas, se identificaron las plataformas de movilización de estos genes en el cromosoma de 24pae112. Fueron identificados cinco transposones movilizando genes de resistencia: Tn6162-like con *aadB* y *sul1*, Tn402-like-1 con *aadA1* y *sul1*, Tn402-like-2 con *bla<sub>OXA-2</sub>* y dos Tn4401b cada uno con una copia del gen *bla<sub>KPC-2</sub>*. Adicionalmente, fueron determinadas ocho regiones de profagos y 6 islas genómicas, en cuatro de estos elementos genéticos móviles se insertaron transposones (figura 12).

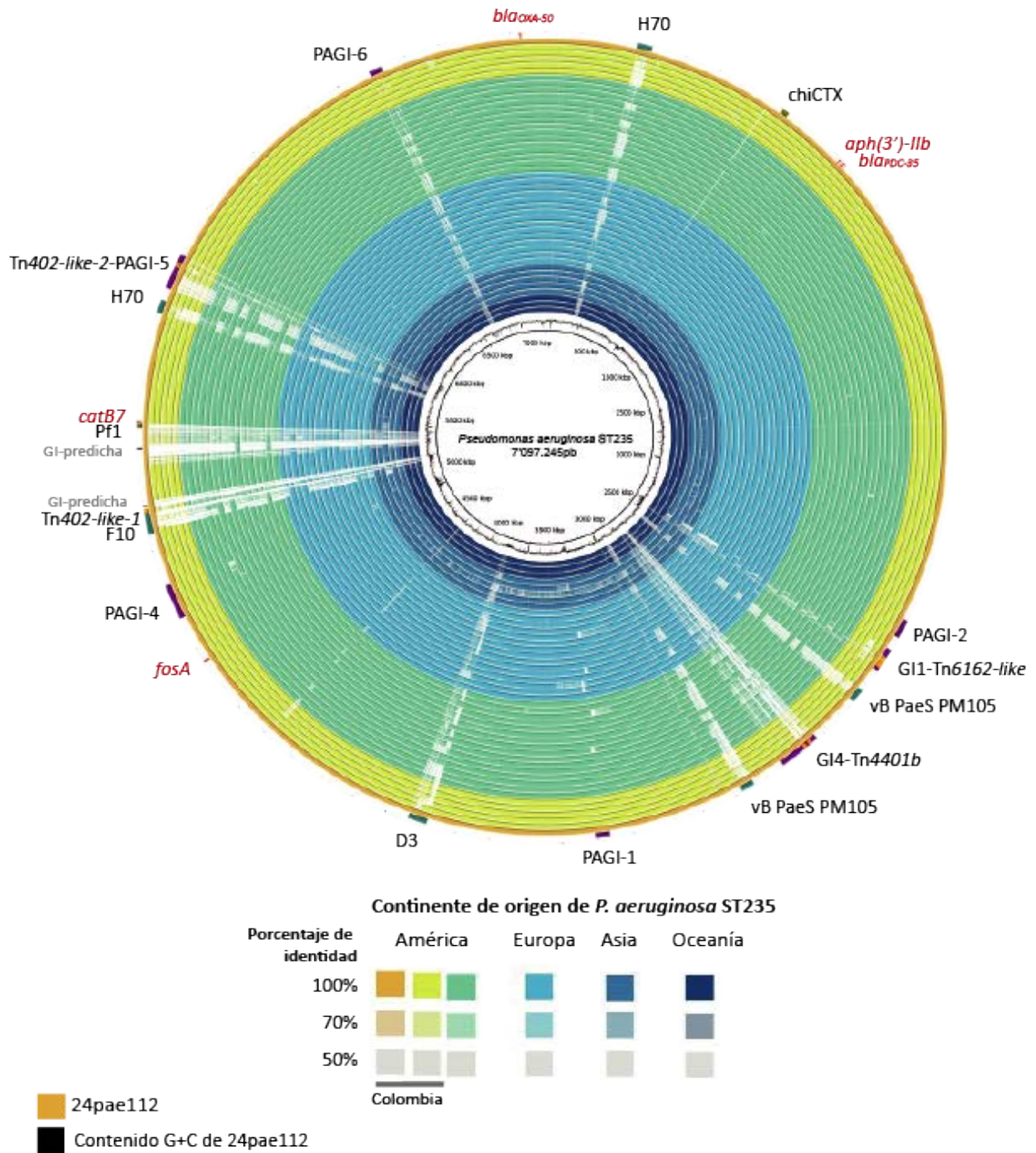
**Tabla 6.** Elementos genéticos móviles de 24pae112

Elemento genético móvil		Ubicación		Tamaño (pb)	Número de Acceso	Ref.
		Inicio	Final			
Transposón	Tn6162-like	2'428.478	2'462.661	34.183	-	-
Transposón	Tn4401b	2'742.750	2'752.755	10.005	-	[7]
		2'758.633	2'768.638			
Transposón	Tn402-like-1	5'105,343	5'117.652	12.309	-	-
Transposón	Tn402-like-2	5'815.970	5'830.824	14.854	-	-
Profago	H70	259.283	301.721	42.438	NC027384	[180]
		5'677.607	5'716.275	38.668		
Profago	vB_Pae5_PM105	2'542.113	2'580.524	38.411	NC028667	[181]
		2'940.345	2'979.533	39.188		
Profago	D3	3'881.888	3'935.451	53.563	NC002484	[182]
Profago	F10	5'046.861	5'110.131	63.270	NC007805	[103]
Profago	phiCTX	705.252	724.278	19.026	NC003278	[183]
Profago	Pf1	5'347.267	5'358.785	11.518	NC001331	[184]
Isla genómica	PAGI-1	3'366.957	3'406.228	39.271	AF241171	[93]
Isla genómica	PAGI-2	2'310.022	2'363.289	53.267	AF440523	[185]

Isla genómica	PAGI-4	4'795.506	4'895.009	99.593	AY258138	[186]
Isla genómica	PAGI-5	5'752.816	5'815.969	63.153	EF611301	[187]
		5'830.825	5'853.757	22.932		
Isla genómica	PAGI-6	6'593.897	6'630.920	37.023	EF611302	[95]
Isla genómica	G11	2'403.928	2'428.478	24.550	EU595750	[188]
		2'462.696	2'472.004	9.308		
Isla genómica	G14	2'724.254	2'742.750	18.496	NC_018080	[189]
		2'752.755	2'758.632	5.877		
		2'768.636	2'844.388	75.752		

Con el fin de identificar si las plataformas de movilización de los genes de resistencia de 24pae112 posiblemente se encontraban en otros aislamientos de *P. aeruginosa* ST235 se realizó un alineamiento pareado con cada uno de los 44 genomas ST235, el cual fue ilustrado por medio de BRIG, lo que además permitió identificar las regiones de elementos genéticos móviles presentes en 24pae112 y ausentes en los demás aislamientos (figura 12). Cabe resaltar que no se identificaron plataformas de movilización para los genes que codifican las  $\beta$ LEE intrínsecas de *P. aeruginosa* *bla*<sub>OXA-50</sub> y *bla*<sub>PDC-35</sub>, y para *catB7*, asimismo tampoco fueron identificados elementos genéticos móviles asociados para los genes *aph(3')-IIb* y *fosA*; lo cual sumado al hecho de encontrar estos genes en casi todos los aislamientos del clon de *P. aeruginosa* ST235, podría sugerir que probablemente fueron adquiridos por un ancestro en común y estabilizados en el genoma a lo largo del tiempo o que fueron insertados en el genoma por mecanismos genéticos aún desconocidos.



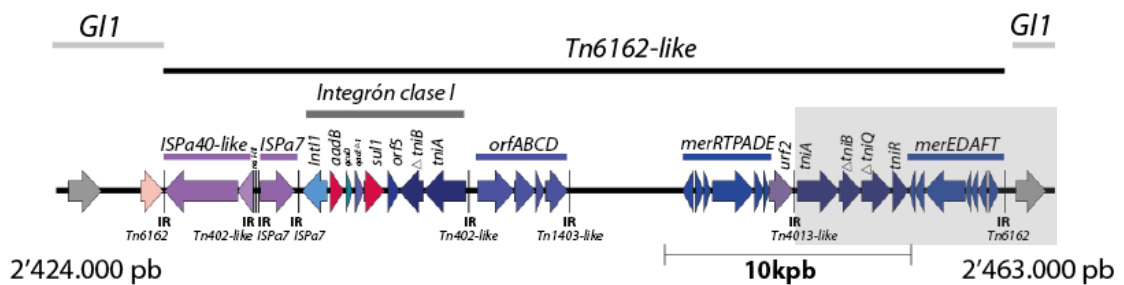


**Figura 12: Ubicación de las islas genómicas, profagos y plataformas de movilización de genes de resistencia de 24pae112.** Alineamiento pareado del genoma de 24pae112 con los 44 genomas reportados de *P. aeruginosa* ST235 ilustrado por BRIG, los colores en los anillos indican el continente de origen y la intensidad del color muestra el porcentaje de identidad de las cepas. Los anillos ubicados del interior al exterior corresponden a los siguientes aislamientos ST235: RNS\_PA1 (AU), RNS\_PA46 (AU), RNS\_PAE05 (AU), NCGM2\_S1 (JP), NCGM 1984 (JP), AZPAE13850 (IN), AZPAE14702 (PH), AZPAE14703 (PH), AZPAE14690 (RO), AZPAE14964 (RO), AZPAE14705 (GR), AZPAE14706 (GR), AZPAE14708 (GR), AZPAE14887 (HR), AZPAE14912 (HR), AZPAE14968 (HR), AZPAE15015 (DE), AZPAE14723 (IT), AZPAE14730 (IT), AZPAE14353 (FR), AZPAE15058 (FR), PA\_ST235 (ES), AZPAE15000 (ES), AZPAE14422 (US), AZPAE14710 (US), AZPAE14726 (US), AZPAE1732 (US), AZPAE14842 (US), AZPAE14843 (US), AZPAE14874 (US), AZPAE14979 (US), AZPAE15006 (US), AZPAE13880 (MX), AZPAE14689 (MX), AZPAE13879 (AR), AZPAE14830 (AR), AZPAE14902 (AR), AZPAE14949 (AR), AZPAE15063 (BR), AZPAE14719 (CO), AZPAE14719 (CO), AZPAE14720 (CO), AZPAE14721 (CO), AZPAE15003 (CO), 9PS50 (CO) y 24pae112 (CO).

Tal como se ilustra en la figura 12, la inserción de los cinco transposones asociados a los genes de resistencia en el cromosoma de *P. aeruginosa* 24pae112 fue observada dentro de cuatro elementos genéticos móviles previamente descritos en la literatura: tres islas genómicas (GI1, PAGI-5 y GI4) y el profago (F10). Asimismo, fueron determinadas en detalle las estructuras genómicas de cada uno de los transposones.

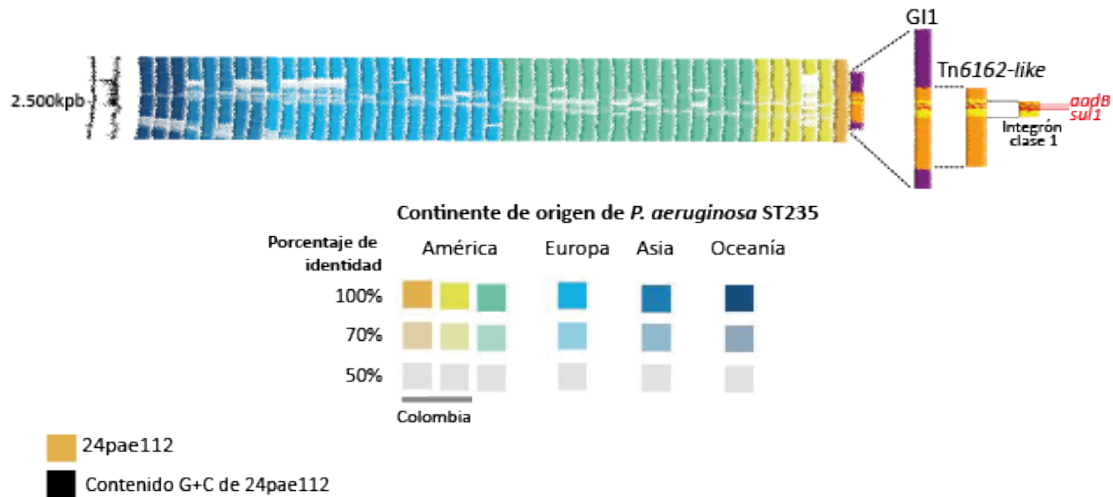
### 6.1.3 Tn6162-like

El transposón Tn6162-like se identificó en el genoma de 24pae112 entre 2'428.478pb y 2'462.661pb, esta plataforma genética moviliza un integrón de clase 1 el cual codifica en su región 3' conservada al gen *sul1*, además del gen casete *aadB* (figura 13). Teniendo en cuenta su estructura genética, este transposón fue nombrado como "like" debido a que adicional a la estructura del transposón Tn6162 reportada por Martínez y Col. [190], se identificó un módulo  $\Delta tni$  y un operón de resistencia a mercurio *merEDAFT* corriente abaje de *urf2*.



**Figura 13: Estructura de transposón Tn6162-like de *P. aeruginosa* 24pae112.** Estructura de las plataformas de movilización de los genes *aadB* y *sul1*. Cada una de las flechas indican los marcos abiertos de lectura para proteínas hipotéticas (rosado), integrasas (azul celeste), transposasas (púrpura), genes de resistencia (rojo) y operones (azul oscuro). Las líneas negras verticales indican secuencias repetidas invertidas (IR) y el recuadro gris muestra la región diferente al Tn6162 reportada por Martínez y Col. [190]. La gráfica cuenta con una línea de escala de 10.000pb.

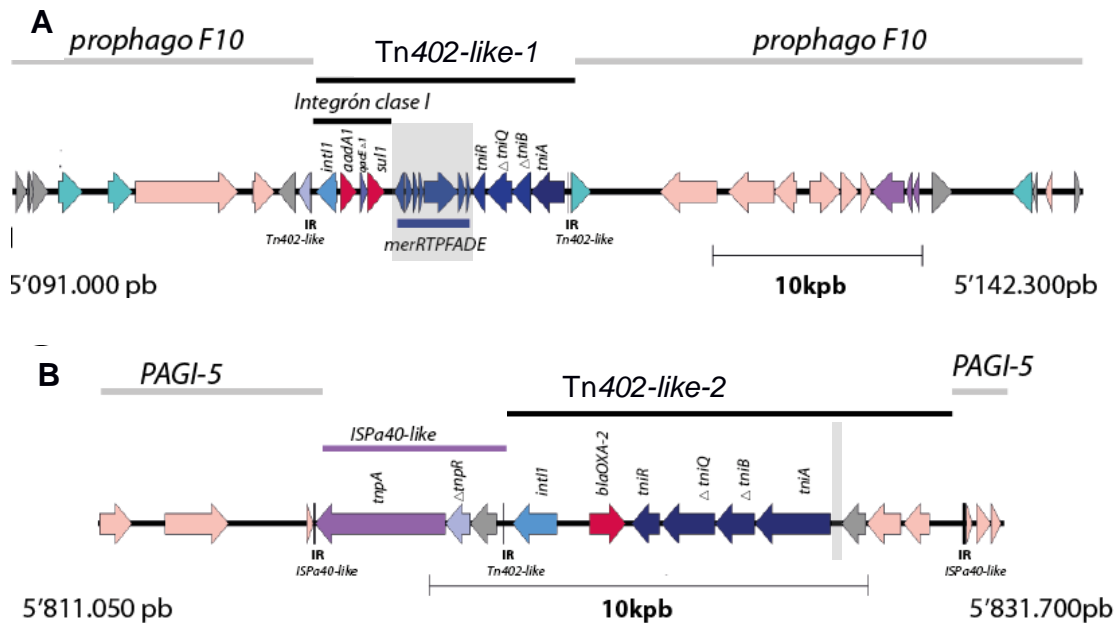
El Tn6162 fue identificado previamente en los 3(6,8%) aislamientos ST235 analizados provenientes de Oceanía, también moviliza un integrón clase 1 y al igual que en nuestro estudio se encontraba insertado dentro de la isla genómica GI1 [9], lo cual también fue evidenciado en el resultado de genómica comparativa con los alineamientos del genoma de estos aislamientos en la región de Tn6162-like (figura 12); respecto a los 41(93,2%) aislamientos restantes, en la secuencia del transposón Tn6162-like fueron observados alineamientos con 36(81,8%) aislamientos ST235, sin embargo se identificó la presencia de gaps que sugieren que estos podrían tener un transposón con una estructura no idéntica, pero si similar al Tn6162 (figura 14).



**Figura 14: Estructura general del ambiente genómico de los genes de resistencia *aadB* y *sul1* de 24pae112.** Alineamiento pareado del genoma de 24pae112 en la región de la isla genómica G1 con los 44 genomas reportados de *P. aeruginosa* ST235 ilustrado por BRIG 1, los colores en los anillos indican el continente de origen y la intensidad del color muestra el porcentaje de identidad de las cepas. Los anillos ubicados del interior al exterior corresponden a los siguientes aislamientos ST235: RNS\_PA1 (AU), RNS\_PA46 (AU), RNS\_PAE05 (AU), NCGM2\_S1 (JP), NCGM 1984 (JP), AZPAE13850 (IN), AZPAE14702 (PH), AZPAE14703 (PH), AZPAE14690 (RO), AZPAE14964 (RO), AZPAE14705 (GR), AZPAE14706 (GR), AZPAE14708 (GR), AZPAE14887 (HR), AZPAE14912 (HR), AZPAE14968 (HR), AZPAE15015 (DE), AZPAE14723 (IT), AZPAE14730 (IT), AZPAE14353 (FR), AZPAE15058 (FR), PA\_ST235 (ES), AZPAE15000 (ES), AZPAE14422 (US), AZPAE14710 (US), AZPAE14726 (US), AZPAE1732 (US), AZPAE14842 (US), AZPAE14843 (US), AZPAE14874 (US), AZPAE14979 (US), AZPAE15006 (US), AZPAE13880 (MX), AZPAE14689 (MX), AZPAE13879 (AR), AZPAE14830 (AR), AZPAE14902 (AR), AZPAE14949 (AR), AZPAE15063 (BR), AZPAE14719 (CO), AZPAE14719 (CO), AZPAE14720 (CO), AZPAE14721 (CO), AZPAE15003 (CO), 9PS50 (CO) y 24pae112 (CO).

### 6.1.4 Tn402-like

Se identificaron dos transposones Tn402-like, ubicados en regiones distintas del cromosoma de 24pae112, Tn402-like-1 fue localizado en la posición 5'105,343pb-5'117.652pb, moviliza un integrón clase 1 de estructura clásica, que codifica en su región 3' conservada al gen *sul1* y el gen casete *aadA1* (figura 15a). Este transposón fue nombrado como "like", puesto que adicional a la estructura clásica de Tn402 reportada (figura 16), tiene un operón de resistencia a mercurio *merEDAFT* similar al identificado en Tn21 corriente arriba del módulo  $\Delta tni$  [191]. Asimismo, Tn402-like-1 se encuentra integrado dentro del profago F10 (figura 15a). Sin embargo, aunque este transposón no ha sido reportado previamente en los aislamientos ST235, se observa que en 43(95,6%) genomas ST235 existieron alineamientos (>99% de identidad) con la secuencia de este transposón, sin embargo, se evidenció la presencia de espacios en blanco, por lo cual posiblemente la estructura del Tn402-like-1 en estos aislamientos no es idéntica a la reportada en este estudio (figura 17a).

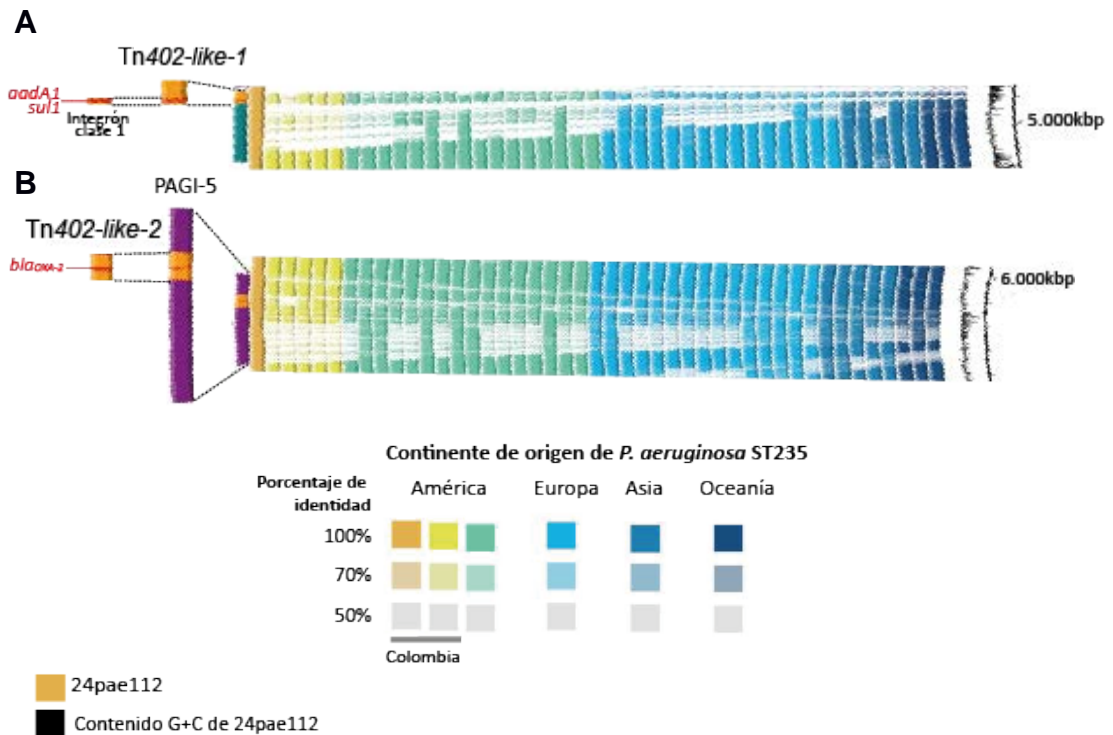


**Figura 15: Estructura de los transposones Tn402-like de *P. aeruginosa* 24pae112.** (A) Estructura de las plataformas de movilización de los genes *aadA1*, *sul1* y (B) *bla<sub>OXA-2</sub>*. Cada una de las flechas indican los marcos abiertos de lectura para proteínas hipotéticas (rosado), integrasas (azul celeste), transposasas (púrpura), genes de resistencia (rojo) y operones (azul oscuro). Las líneas negras verticales indican secuencias repetidas invertidas (IR) y el recuadro gris muestra la región diferente al Tn402 de *Tato* y *Col.* [192]. La gráfica cuenta con una línea de escala de 10.000pb.



**Figura 16: Estructura genética del transposón Tn402.** Cada una de las flechas indican los marcos abiertos de lectura para la integrasa (azul celeste) y el operon *tni* (azul oscuro) Modificada de *Tato* y *Col.* [192].

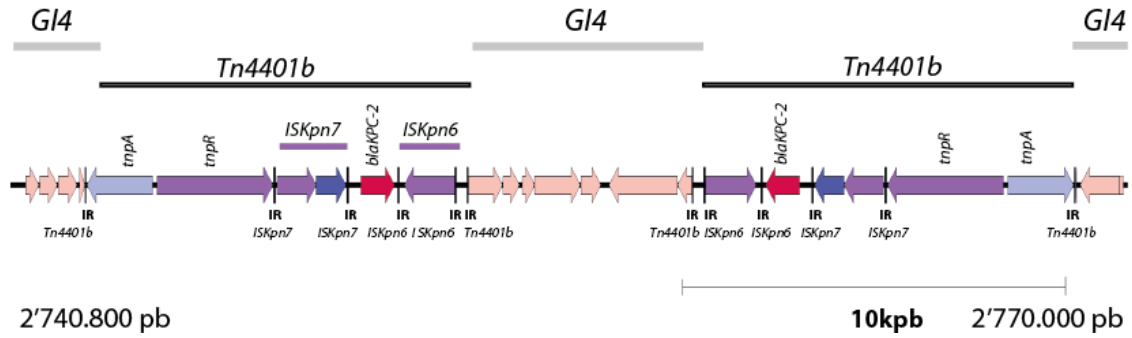
El transposón Tn402-like-2 se identificó en la posición 5'815.970pb-5'830.824pb integrado en PAGI-5. Aunque no movilizó un integrón clase I, en su estructura genética se evidencia el gen *int1*, el cual codifica una integrasa que posiblemente integró el gen casete *bla<sub>OXA-2</sub>* (figura 15b). Adicionalmente, este transposón se nombró como "like" debido a la pérdida de uno de los repetidos invertidos de Tn402-like. Estos resultados pueden sugerir que este transposón Tn402-like fue insertado dentro del gen *tnpR* de ISPa40, pero luego por eventos de recombinaciones, inversiones y translocaciones genéticas se perdió uno de los repetidos de Tn402 (figura 16). Finalmente, teniendo en cuenta el alineamiento pareado con las secuencias ST235 estudiadas, fueron observados 43(97,7%) aislamientos ST235 que tuvieron alineamientos parciales con el Tn402-like-2 (figura 17b).



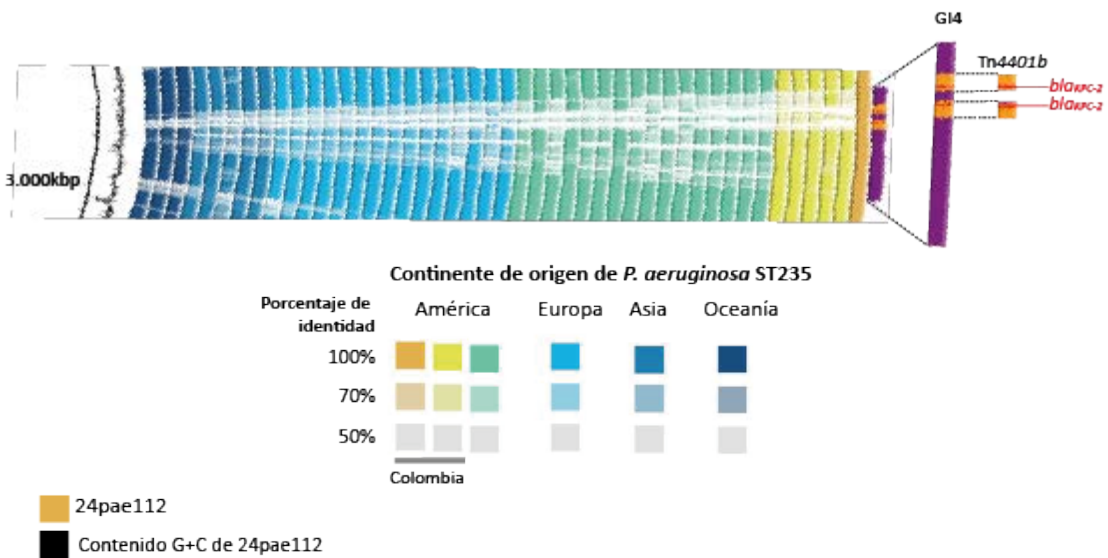
**Figura 17: Estructura general del ambiente genómico de los genes de resistencia *aadA1*, *sul1* y *bla<sub>OXA-2</sub>* de 24pae112.** Alineamiento pareado del genoma de 24pae112 en la región de la isla genómica PAGI-5 con los 44 genomas reportados de *P. aeruginosa* ST235 ilustrado por BRIG 1, los colores en los anillos indican el continente de origen y la intensidad del color muestra el porcentaje de identidad de las cepas. Los anillos ubicados del interior al exterior corresponden a los siguientes aislamientos ST235: RNS\_PA1 (AU), RNS\_PA46 (AU), RNS\_PAE05 (AU), NCGM2\_S1 (JP), NCGM 1984 (JP), AZPAE13850 (IN), AZPAE14702 (PH), AZPAE14703 (PH), AZPAE14690 (RO), AZPAE14964 (RO), AZPAE14705 (GR), AZPAE14706 (GR), AZPAE14708 (GR), AZPAE14887 (HR), AZPAE14912 (HR), AZPAE14968 (HR), AZPAE15015 (DE), AZPAE14723 (IT), AZPAE14730 (IT), AZPAE14353 (FR), AZPAE15058 (FR), PA\_ST235 (ES), AZPAE15000 (ES), AZPAE14422 (US), AZPAE14710 (US), AZPAE14726 (US), AZPAE1732 (US), AZPAE14842 (US), AZPAE14843 (US), AZPAE14874 (US), AZPAE14979 (US), AZPAE15006 (US), AZPAE13880 (MX), AZPAE14689 (MX), AZPAE13879 (AR), AZPAE14830 (AR), AZPAE14902 (AR), AZPAE14949 (AR), AZPAE15063 (BR), AZPAE14719 (CO), AZPAE14719 (CO), AZPAE14720 (CO), AZPAE14721 (CO), AZPAE15003 (CO), 9PS50 (CO) y 24pae112 (CO).

### 6.1.5 Tn4401b

Interesantemente, en el cromosoma de 24pae112 fueron identificadas dos copias invertidas del transposón Tn4401b insertadas en la isla genómica GI4, muy cerca uno del otro, en las posiciones 2'742.750pb-2'752.755pb y 2'758.633pb-2'768.638pb, separados por un fragmento de 5909pb (Figura 18). Este transposón es exclusivamente el responsable de la movilización del *bla<sub>KPC-2</sub>* a nivel mundial y su estructura en las dos copias identificadas en 24pae112 son idénticas a la reportada por Naas y Col. en el año 2008 [7]. Es importante mencionar que esta doble organización invertida de los transposones Tn4401b no ha sido reportada en *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo, si ha sido reportada en un plásmido de *Klebsiella pneumoniae* por Gootz y Col en 2009 [193].

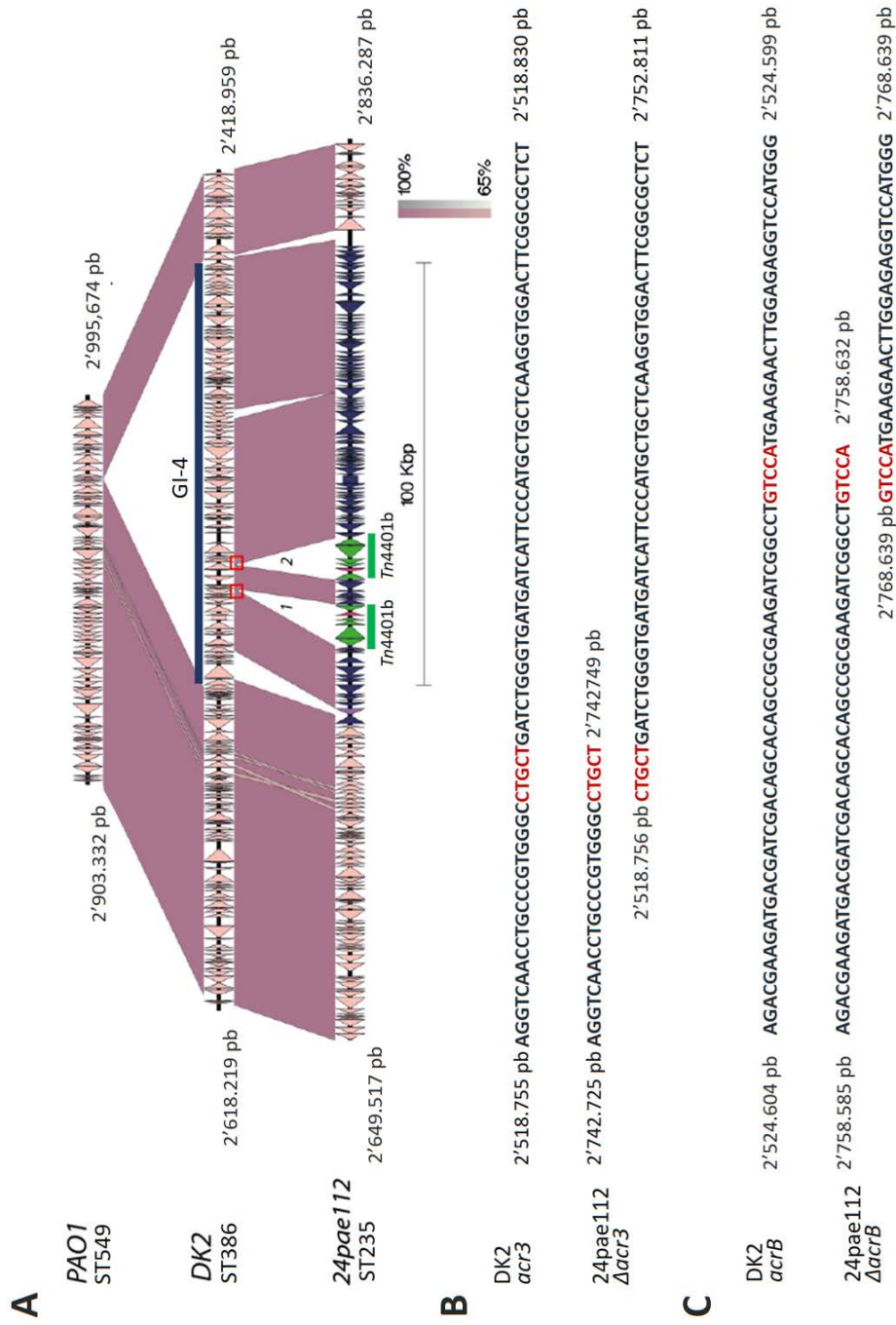


**Figura 18: Estructura de los transposones Tn4401b de *P. aeruginosa* 24pae112.** Estructura de las plataformas de movilización de los genes *bla<sub>KPC-2</sub>*. Cada una de las flechas indican las regiones codificantes para proteínas hipotéticas (rosado), integrasas (azul celeste), transposasas (púrpura), genes de resistencia, (rojo) y operones (azul oscuro). Las líneas negras verticales indican secuencias repetidas invertidas (IR). Cada gráfica cuenta con una línea de escala de 10.000 pb.



**Figura 19: Estructura general del ambiente genómico de las dos copias del gen de resistencia *bla<sub>KPC-2</sub>* de 24pae112.** Alineamiento pareado del genoma de 24pae112 en la región de la isla genómica GI1 con los 44 genomas reportados de *P. aeruginosa* ST235 ilustrado por BRIG 1, los colores en los anillos indican el continente de origen y la intensidad del color muestra el porcentaje de identidad de las cepas. Los anillos ubicados del interior al exterior corresponden a los siguientes aislamientos ST235: RNS\_PA1 (AU), RNS\_PA46 (AU), RNS\_PAE05 (AU), NCGM2\_S1 (JP), NCGM 1984 (JP), AZPAE13850 (IN), AZPAE14702 (PH), AZPAE14703 (PH), AZPAE14690 (RO), AZPAE14964 (RO), AZPAE14705 (GR), AZPAE14706 (GR), AZPAE14708 (GR), AZPAE14887 (HR), AZPAE14912 (HR), AZPAE14968 (HR), AZPAE15015 (DE), AZPAE14723 (IT), AZPAE14730 (IT), AZPAE14353 (FR), AZPAE15058 (FR), PA\_ST235 (ES), AZPAE15000 (ES), AZPAE14422 (US), AZPAE14710 (US), AZPAE14726 (US), AZPAE1732 (US), AZPAE14842 (US), AZPAE14843 (US), AZPAE14874 (US), AZPAE14979 (US), AZPAE15006 (US), AZPAE13880 (MX), AZPAE14689 (MX), AZPAE13879 (AR), AZPAE14830 (AR), AZPAE14902 (AR), AZPAE14949 (AR), AZPAE15063 (BR), AZPAE14719 (CO), AZPAE14719 (CO), AZPAE14720 (CO), AZPAE14721 (CO), AZPAE15003 (CO), 9PS50 (CO) y 24pae112 (CO).

Teniendo en cuenta los alineamientos de los genomas ST235 con la región correspondiente a las dos copias de Tn4401b de 24pae112, se observó que ningún aislamiento tuvo alineamiento con estas regiones, por lo cual se sugiere que este evento no ha ocurrido en otros genomas ST235 estudiados (figura 19).



**Figura 20: Identificación del sitio de inserción de la isla genómica GI-4 en *P. aeruginosa* DK2 y 24pae112 y del transposón Tn4401b en GI-4.** (A) BLASTn ilustrado con EasyFig de *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* DK2 y 24pae112 del sitio de inserción de la isla genómica GI4 (azul) y de los transposones Tn4401b (verde) los cuales movilizan el gen *bla<sub>KPC-2</sub>* (rojo). Identificación del lugar de inserción de dos copias invertidas (1 y 2) de Tn4401b en GI4 (B y C). La línea de escala indica el tamaño correspondiente a 100.000 pb y los colores del alineamiento el porcentaje de identidad.

Debido a la importancia de la resistencia fenotípica a los carbapenémicos DOR, IMP y MEM, posiblemente atribuida a la doble codificación de la carbapenemasa tipo KPC-2; se profundizó en los posibles eventos genéticos que pudieron derivar en la doble inserción de *Tn4401b* en el cromosoma de 24pae112. Un análisis genómico comparativo de los alrededores de los sitios de inserción y la región entre las dos copias del *Tn4401b* (5909pb) permitió identificar que la cepa de *P. aeruginosa* DK2 (ST386) también posee la región entre las dos copias del transposón identificada como isla genómica cuatro (GI4), esta secuencia no fue evidenciada otras cepas de *P. aeruginosa* como PAO1. Adicionalmente, en la GI-4 de la cepa DK2 fueron identificadas las diferentes secuencias de reconocimiento de 5pb para la transposasa del *Tn4401b* en los genes *acr3* (CTGCT) y *acrB* (GTCCA), genes que fueron encontrados truncados en el aislamiento 24pae112 debido a la doble inserción del *Tn4401b*. Finalmente, corriente arriba y abajo de cada transposón fue observada una duplicación de las secuencias de reconocimiento de 5pb, lo que sugiere un evento de transposición (figura 20).

El análisis de estos resultados nos permite sugerir que fue necesario la ocurrencia de varios eventos genéticos previos para lograr la inserción de las dos copias del *Tn4401b* en la cepa 24pae112, primero la inserción de la GI-4 (como DK2) en el cromosoma de *P. aeruginosa* y luego la adquisición de *Tn4401b* e inserción en GI-4.

### 6.1.6 Otros elementos genéticos móviles de 24pae112

Como se puede observar en la figura 12, adicional a las plataformas de movilización de genes de resistencia, en el genoma de 24pae112 fueron identificadas ocho regiones de profagos y 6 islas genómicas. Los profagos H70 y vB\_Pae5\_PM105 fueron identificados dos veces en el cromosoma, asimismo, los profagos D3, F10, phiCTX y Pf1 fueron observados una vez en el genoma (tabla 6). En cuanto a la asociación de profagos a genes de resistencia, en la región del profago F10 se observó la inserción del transposón *Tn402-like 1* previamente descrito. Este fue el único profago asociado a los genes de resistencia identificados en 24pae112. Teniendo en cuenta las 44 secuencias ST235 con alineamiento en estas regiones se observa que los 44(100%) aislamientos ST235 tienen alineamientos con el profago phiCTX identificado en 24pae112, adicionalmente 17(38,6%) tuvieron alineamiento con H70 y 16(36,4%) con vB\_Pae5\_PM105, lo cual podría indicar que como phiCTX existen profagos frecuentes en el clon ST235 en diferentes zonas geográficas (figura12).



Respecto a las islas genómicas, fueron identificadas 6 regiones con las islas genómicas PAGI-1, PAGI-2, PAGI-4, PAGI-5, PAGI-6, GI4 de la cepa DK2 y la isla de patogenicidad GI1 de PACS171b. De igual manera, dos zonas correspondieron a islas genómicas predichas por IslandViewer (tabla 6). Teniendo en cuenta la asociación de estas regiones con los genes de resistencia, se evidenció que en tres islas genómicas se insertaron transposones que movilizaron estos genes, tal fue el caso de GI1 con la inserción del *Tn6162-like*, de GI4 con las dos copias del *Tn4401b* y de PAGI-5 con el *Tn402-like 2*.

De acuerdo a lo anterior y con respecto a la comparación de las regiones de estas islas genómicas de 24pae112 con los 44 genomas ST235, fueron encontrados alineamientos en los 44(100,0%) aislamientos con la región de PAGI-2, 42(95,5%) con PAGI-4, 39(88,6%) con PAGI-1, 36(47,7%) con GI1, 20(45,4%) con PAGI-5, 14(31,8%) con PAGI-5, 12(27,3%) con PAGI-4, 11(24,4%) con GI4, lo cual muestra que es muy frecuente la inserción de estos elementos genéticos en el genoma de *P. aeruginosa* ST235 (figura 12).

## 7 Discusión

*Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista causante de infecciones en pacientes en UCI, en este estudio fue el tercer microorganismo más frecuente, esta frecuencia ha sido observada en los últimos años en Colombia, siendo por tanto una especie de importancia clínica en el país [138]. De los 58 aislamientos analizados el 60,3% de los aislamientos fueron resistentes a uno o más antibióticos, reduciendo por tanto las opciones terapéuticas para el tratamiento de las diferentes infecciones. Respecto a la resistencia a los carbapenémicos, antibióticos de última línea para combatir este patógeno, el 46,5% de los aislamientos fueron resistentes a por lo menos un carbapenémico, dato preocupante puesto que dificulta aún más el tratamiento [194]. La resistencia a estos antibióticos fue mayor a la descrita en otros estudios realizados en diferentes países como Brasil (43,9%), Estados Unidos (28,4%), Italia (23,0%), España (22,7%), Portugal (19,8%), Francia (16,4%), China (16,3%), Alemania (15,0%) y Reino Unido (2,4%) [195-198]. Así mismo, la resistencia a carbapenémicos fue menor a la reportada en Eslovaquia (51,9%), Rumania (66,3%) e Irán (96%) [195, 199, 200]. Estos aislamientos tienen un alto impacto clínico, ya que no permite el uso de antibióticos  $\beta$ -lactámicos y limita considerablemente el tratamiento de las infecciones. En este sentido, es muy importante el comportamiento de la resistencia a otras familias de antibióticos (multirresistencia) para disponer de otras alternativas. Afortunadamente, en la población analizada se encontró un bajo porcentaje de multirresistencia (15,5%) donde la resistencia a amikacina fue de (12,1%) sin embargo, este dato es mayor al reportado en Estados Unidos (13,0%), Arabia Saudita (10,7%) y China (4,2%) [197, 201, 202].

La estructura poblacional de *Pseudomonas aeruginosa* es principalmente policlonal, incluso en aislamientos sensibles, resistentes y multirresistentes, con apariciones esporádicas de clones exitosos con alta capacidad de diseminación, los cuales sin embargo no llegan a ser los más frecuentes en la población bacteriana, esto sugiere que posiblemente deben existir otras características genéticas involucradas en la supervivencia y persistencia de este microorganismo [3, 38, 203-207]. En el caso de la resistencia a carbapenémicos, se ha documentado como ha sido su evolución, principalmente en la adquisición de genes que codifican carbapenemasas. En este estudio se determinó que el 17,2% de los aislamientos resistentes a carbapenémicos codificaron carbapenemasas de tipo VIM o KPC y el 29,3% codificó otros mecanismos de resistencia no evaluados como sobreexpresión de bombas de eflujo,

disminución de la permeabilidad celular o la expresión de otras carbapenemasas no evaluadas. Los aislamientos que codificaron VIM fueron asociados a varios linajes genéticos (ST111, ST244 y ST1978) que no hacen parte de un complejo clonal y se determinó que la plataforma de movilización para *bla*<sub>VIM</sub> posiblemente fue un integrón de clase 1; por su parte los aislamientos que codificaron KPC fueron asociados a un solo clon, el ST235. Esta asociación es similar a la identificada previamente en Colombia, puesto que el 86% de los aislamientos que codifican VIM-2 son asociados al ST111 y el 100% que codifican KPC-2 al ST235 [8].

El clon de *P. aeruginosa* ST111 fue identificado por primera vez en Italia por *Edalucci y col.* asociado a *bla*<sub>VIM</sub> y desde entonces esta asociación se ha evidenciado en diferentes países como Reino Unido y Croacia; en Colombia *Villegas y col.* lo han reportado desde el año 2012, en donde además de codificar VIM, ha sido identificado con KPC [208, 209]. Por otra parte, *Liakopoulos y col.* identificaron previamente en Grecia la asociación de *P. aeruginosa* ST244 a *bla*<sub>VIM-2</sub> y desde entonces se ha reportado en Tanzania, China y Japón; sin embargo, gracias a este estudio es la primera vez que se reporta en América [120, 124, 210]. Finalmente, el ST1978 no ha sido reportado en Colombia y tampoco en estudios internacionales. Lo que sugiere que en Colombia están circulando tipos de secuencia o linajes que codifican la carbapenemasa VIM diferentes a los habitualmente reportados en los últimos años.

A diferencia de otros clones como el ST111, ST175 y el ST277, el clon de *P. aeruginosa* ST235 es el más diseminado a nivel internacional, ha sido asociado a carbapenemasas tipo VIM-2 en Rusia, Bielorrusia, Kazajistán, Croacia, Japón, China y Corea, variantes de IMP en Corea del Sur y Vietnam; y con respecto a la asociación con KPC-2 se ha presentado como un fenómeno exclusivo, la detección y circulación de aislamientos en Colombia [8, 211, 212]. Los resultados del análisis filogenético del genoma “core” de los aislamientos del clon ST235 provenientes de América, Europa, Asia y Oceanía muestran una variabilidad genética entre los genomas probablemente por mutaciones o deleciones en las secuencias conservadas y aunque existe un conocimiento limitado sobre estos cambios moleculares tanto en el clon ST235 como en otros clones de *P. aeruginosa*, en un estudio del clon de *P. aeruginosa* DK2 existe evidencia de las mutaciones y deleciones en las secuencias de aislamientos en un mismo clon a medida del tiempo, en el que secuenciaron 55 aislamientos recuperados entre 1972 y 2008 reveló en las secuencias 7,326 SNPs únicos obtenidos por 7.368 eventos mutacionales, los cuales tuvieron una correlación lineal entre el número de SNPs y el tiempo de muestreo, identificando además loci que fueron mutando independientemente en linajes paralelos [213].

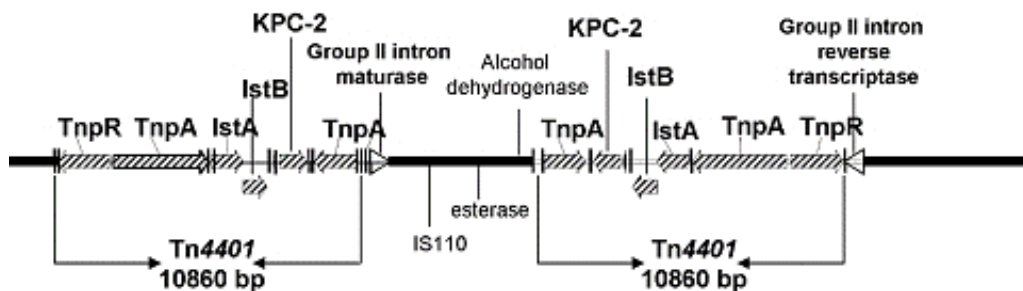
Los resultados de la relación del genoma accesorio en los aislamientos ST235 también sugieren variabilidad genética dada probablemente por la adquisición diferencial de elementos genéticos móviles como profagos, islas genómicas, transposones o plásmidos. Esta es probablemente una de las razones de la diversidad del resistoma de *P. aeruginosa* ST235 identificada en este estudio, puesto que en este clon aproximadamente se han reportado 100 estructuras genéticas con genes de resistencia, incluyendo 39 diferentes  $\beta$ -lactamasas ( $\beta$ LEE y carbapenemasas) como GES-24, IMP-6, IMP-10 y KPC, siendo esta última carbapenemasa identificada exclusivamente en los aislamientos colombianos ST235 [36, 104, 214, 215]

En este estudio se identificaron dos copias de *bla*<sub>KPC-2</sub> en el cromosoma de 24pae112 movilizadas por el transposón Tn4401b, evento nunca antes descrito en *P. aeruginosa* y consecuencia probablemente de una transferencia horizontal de este gen, puesto que KPC no es una carbapenemasa intrínseca de la especie y resultados publicados previamente en Colombia reportan que el clon de *P. aeruginosa* ST235 circulaba sin KPC por lo menos desde el 2007 (aislamiento 9PS50) [178]. Las secuencias adyacentes al Tn4401b en 24pae112 son completamente diferentes a las descritas en *P. aeruginosa* por Naas y col en Colombia en los plásmidos pCOL-1 y pPA-2, lo cual podría indicar que la inserción de este transposón en el cromosoma de 24pae112 no fue producida por la integración de alguno de estos plásmidos [216]. Esta transposición de Tn4401b en el cromosoma también ha sido reportado en *Klebsiella pneumoniae*, en donde se ha descrito una copia de Tn4401b en cromosoma y otra en el plásmido pBK15692, lo cual brinda evidencia en otras especies de la capacidad de transposición plásmido-cromosoma de Tn4401b y podría explicar la transposición de Tn4401b en el cromosoma de *P. aeruginosa* 24pae112 [217, 218]. Esta movilización podría ser facilitada por los sitios de reconocimiento de 5pb (CTGCT y GTCCA) de la transposasa de Tn4401b, los cuales fueron diferentes tanto en 24pae112 como en otros estudios en donde la frecuencia de los eventos de transposición de Tn4401b fue de  $4.4 \times 10^{-6}$ / célula receptora [7, 219, 220].

La inserción de dos copias del Tn4401b en el cromosoma de 24pae112 probablemente confiere mayor estabilidad para la transferencia vertical y un aumento de la concentración inhibitoria mínima, puesto que existe una mayor producción de la carbapenemasa KPC-2 y probablemente mayor hidrólisis del carbapenémico. Este comportamiento no es un evento frecuente, sin embargo, ha sido descrito por Gootz y col. en un plásmido de la cepa de *Klebsiella pneumoniae* S9 con dos copias de

*Tn4401b*, insertados de forma invertida con una región de separación interna entre cada transposón, al igual que lo reportado en este estudio, pero con diferente tamaño y secuencia (figura 21) [193]. Interesantemente, la doble inserción del *Tn4401b* en esta cepa de *Klebsiella pneumoniae* produjo valores de la MIC >64 para los carbapenémicos [193]. A pesar de que la razón de esta organización es desconocida, teniendo en cuenta los estudios previamente mencionados de otros autores, se podría sugerir que este transposón fue insertado probablemente gracias a la conjugación previa de un plásmido que movilizaba el *Tn4401b* y posteriormente se realizó el proceso de transposición de dos copias del transposón en el cromosoma.

### *K. pneumoniae* plasmid from S9



**Figura 21:** Mapa lineal del plásmido de 70,6kb aislado de *K. pneumoniae* S9. Se ilustra la inserción doble invertida del transposón *Tn4401b* (10.860pb) (barra a rayas) adyacente a los genes del intrón del grupo II. Tomado de Gootz y Col. [193].

Con respecto a la región en donde ocurrió la doble inserción de los transposones *Tn4401b* en *P. aeruginosa* 24pae112, es la primera vez que se describe en GI4 —isla genómica que confiere resistencia al cobre descrita por primera vez en *P. aeruginosa* DK2—, la cual según el análisis de genómica comparativa no parece ser muy común en los genomas de *P. aeruginosa* ST235 estudiados. La inserción en GI4 no afecta los genes esenciales para la bacteria y cuenta con los sitios de reconocimiento para la transposasa de *Tn4401b*, por tanto, posiblemente la adquisición de esta isla genómica fue un paso importante para la doble inserción de los transposones en el cromosoma de 24pae112; este evento de transposición en islas genómicas también fue observado con los transposones *Tn6162-like* y *Tn402-like*, los cuales se insertaron en GI1 y en PAGI-5, respectivamente. Lo cual permite inferir que posiblemente las islas genómicas, adicional al aporte en la evolución del genoma en *P. aeruginosa*, podrían ser puntos calientes que favorecen la inserción en el cromosoma de transposones que movilizan genes de resistencia. Aunque en *P. aeruginosa* los eventos de inserción en las islas genómicas GI4 y PAGI-5 no han sido descritas previamente, Chowdhury y col. han descrito en aislamientos ST235, ST253, ST111 y ST175 la inserción de los transposones *Tn6060*, *Tn6162* y *Tn6163* en GI1 [9, 221, 222]. Por tanto, el estudio de la adquisición de ADN foráneo como islas

genómicas en el cromosoma de *P. aeruginosa* podría ser importante para comprender la adquisición de genes de resistencia y la evolución del genoma en esta especie.

## 8 Conclusiones y recomendaciones

Los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* en la población de estudio presentaron un comportamiento policlonal, sin embargo, en aquellos productores de carbapenemasas se observó asociación tanto a los clones previamente reportados (ST111 y ST235), como tipos de secuencia no identificados en el país (ST244 y ST1978).

Aunque la frecuencia del clon ST235 no fue predominante en la población de estudio, sus aislamientos fueron multirresistentes y codificaron carbapenemasas tipo KPC, por tanto, es de importancia clínica y epidemiológica el diseño de estrategias de prevención para la diseminación del clon ST235 en las instituciones de salud.

El clon de *Pseudomonas aeruginosa* ST235 tiene una variabilidad genética probablemente debido a su extraordinaria capacidad de adquisición de ADN foráneo, como las islas genómicas GI1 y GI4, las cuales le permiten integrar genes de resistencia como *aadB* y *bla<sub>KPC-2</sub>*. Esta capacidad de integración de ADN foráneo brinda ventajas adaptativas a este clon y podría explicar su éxito genético y su alto potencial de riesgo epidemiológico.

Las islas genómicas de *Pseudomonas aeruginosa* podrían ser “hot spots” para la inserción de transposones en el cromosoma, lo cual favorece la inserción de genes de resistencia (como *bla<sub>KPC-2</sub>*), jugando un papel muy importante en la constante evolución del clon de *Pseudomonas aeruginosa* ST235, permitiéndole mayor adaptabilidad a ambientes hostiles.

Finalmente, se recomienda determinar la relación genética del genoma “core” y accesorio de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* de diferentes tipos de secuencia y comparar su variabilidad genética. Confirmar experimentalmente la presencia de las dos copias del transposón Tn4401b en el aislamiento estudiado y otros aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*, adicionalmente, evaluar el impacto fenotípico (aumento de la MIC a carbapenémicos) de esta doble inserción. Además de evaluar la variabilidad genética de las islas genómicas en *Pseudomonas aeruginosa*.

## 9 Anexos

### Anexo A: Características generales de las secuencias de *P. aeruginosa* ST235

**Tabla anexo B: Características generales de los 44 genomas de *P. aeruginosa* ST235**

Nombre	Año	País de origen	Longitud (pb)	Nº de contigs	N50	Cob.*	Tecnología	Estado del ensamblaje	Número de acceso
AZPAE15015	11	Alemania	6.804.229	140	155	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTOF01000113
AZPAE13879	10	Argentina	6.948.193	155	135850	10x	Illumina HiSeq	Borrador	NZ_JTZD00000000
AZPAE14830	05	Argentina	6.816.534	181	136.303	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTVE00000000
AZPAE14902	08	Argentina	6.886.932	144	153.182	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTSN01000098
AZPAR14949	09	Argentina	6.899.528	117	211.226	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTQS01000077
RNS_PA1	06	Australia	7.038.875	146	111.819	38.0x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_LSZV00000000
RNS_PA46	07	Australia	7.125.096	172	103.069	35.0x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_LSZU00000000
RNS_PAE05	07	Australia	7.042.944	178	92.826	35.0x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_LSZT00000000
AZPAE15063	12	Brasil	6.768.150	143	168.194	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTMJ01000113
9PS50	07	Colombia	7'038.455	161	115.401	-	Illumina MiSeq	Borrador	-
AZPAE14721	12	Colombia	6.867.543	183	154.353	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTWL00000000
AZPAE14719	12	Colombia	6.855.346	202	92.164	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTWN00000000
AZPAE14720	12	Colombia	6.813.733	254	82.805	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTWM00000000 0
AZPAE15003	11	Colombia	6.813.733	148	129.991	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTOR00000000
AZPAE14912	08	Croacia	6.835.920	111	211.578	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTSD00000000
AZPAE14887	07	Croacia	6.903.570	141	163.698	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTTB00000000
AZPAE14968	09	Croacia	6.897.223	160	159.705	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTQA00000000
AZPAE15000	10	España	6.858.205	132	141.108	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTOU00000000
PA_ST235	07/8	España	6.929.551	123	191.815	27.0x	454	Borrador	NZ_JNHD01000000
AZPAE14732	12	Estados Unidos	6.793.558	217	85.998	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTWA01000196
AZPAE14710	12	Estados Unidos	6.748.304	162	105.044	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTWW0100014 7
AZPAE14874	07	Estados Unidos	6.850.351	200	103.015	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTTO01000170
AZPAE14726	12	Estados Unidos	6.885.273	178	97.759	10x	Illumina HiSeq	Borrador	NZ_JTWG0100016 4
AZPAE14979	10	Estados Unidos	6.751.299	142	163.767	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTTP01000125
AZPAE15006	11	Estados Unidos	6.832.413	143	165.382	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTOO01000109
AZPAE14422	09	Estados Unidos	6.732.223	101	195.586	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTYK01000090
AZPAE14842	06	Estados Unidos	6.889.407	98	206.542	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTUS01000080
AZPAE14843	06	Estados Unidos	6.737.478	193	204440	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTUR01000125
AZPAE14702	12	Filipinas	7.131.510	174	148.034	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTXD01000160
AZPAE14703	12	Filipinas	6.892.377	285	81.268	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTXC01000201
AZPAE14353	10	Francia	6.835.254	157	158.249	10x	Illumina HiSeq	Borrador	NZ_JTZA00000000
AZPAE15058	12	Francia	6.567.883	127	125.362	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTMO01000103



AZPAE14705	12	Grecia	6.888.268	274	89.166	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTXA01000240
AZPAE14706	10	Grecia	6.921.381	175	121.894	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTWZ01000147
AZPAE14708	12	Grecia	6.707.536	221	108.737	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTWX01000187
AZPAE13850	10	India	5.501.656	460	27.926	10x	Illumina HiSeq	Borrador	NZ_JTZN00000000
AZPAE14730	12	Italia	6.865.760	231	99.176	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTWC00000000
AZPAE14723	12	Italia	6.639.036	195	99.614	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTWJ00000000
NCGM 1984	12	Japón	6.850.954	1	-	-	PacBio RSII	Terminado	NZ_AP014646
NCGM2.S1	02	Japón	6.764.661	1	-	28,9x	454	Terminado	NC_017549
AZPAE13880	10	México	6.855.952	148	125.192	10x	Illumina HiSeq	Borrador	NZ_JTZC01000112
AZPAE14689	12	México	7.252.889	254	72.849	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTXP01000216
AZPAE14694	12	Rumania	6.964.286	315	84.939	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTXK01000267
AZPAE14690	12	Rumania	6.730.564	142	165.199	10x	Illumina MiSeq	Borrador	NZ_JTXO01000105

\*Cob: Cobertura del genoma

\*\*Hasta 22 de julio de 2016

## Anexo B: Concentración inhibitoria mínima y determinantes de resistencia de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*

Cod. LGMB	Dilución en agar CLSI 2016						Dilución en caldo - método automatizado				Perfil de resistencia	Determinantes de resistencia identificados
	PTZ	CAZ	MER	GEN	AK	CIP	IMP	DOR	COL			
24pae07	16	4	16	2	1	0,25	-	1	-	MER	N/A	
24pae34	16	4	16	2	1	0,25	-	>2	-	MER	N/A	
24pae36	4	1	0,5	2	2	0,25	-	1	-	N/A	N/A	
24pae45	>128	>16	0,25	2	1	2	-	2	-	CAZ, PTZ	<i>blaSHV</i>	
24pae47	4	2	16	2	32	0,125	2	0,5	<=0,5	MER, AK	N/A	
24pae52	4	2	0,25	2	2	0,125	>=16	0,25	<=0,5	IMP	N/A	
24pae58	4	1	2	2	2	0,125	2	2	<=0,5	N/A	N/A	
24pae60	4	2	8	2	2	0,125	2	2	<=0,5	MER,	<i>blaSHV</i> ,	
24pae65	>128	>16	>32	>64	64	>16	>=16	>=8	<=0,5	MER, IMP, DOR, CAZ, PTZ GEN, AK, CIP	<i>blaKPC-2, sul1</i>	
24pae112	>128	>16	>32	>64	64	>16	>=16	>=8	<=0,5	MER, IMP, DOR, CAZ, PTZ GEN, AK, CIP	<i>blaTEM, blaCTXM, blaKPC-2, sul1</i>	
24pae116	8	2	4	2	2	0,125	2	2	<=0,5	N/A	<i>blaTEM</i> ,	
24pae136	16	4	32	2	2	0,125	>=16	>=8	<=0,5	MER, IMP, DOR	<i>blaSHV, blaTEM, blaVIM</i> ,	
24pae145	128	4	1	2	2	0,125	1	0,5	<=0,5	PTZ	N/A	
24pae146	8	4	1	32	2	0,125	2	0,5	<=0,5	GEN	N/A	
24pae150	4	4	>32	2	1	0,25	>=16	>=8	<=0,5	MER, IMP, DOR	N/A	
24pae153	>128	>16	>32	>64	2	>16	>=16	>=8	<=0,5	MER, IMP, DOR, CAZ, PTZ GEN, CIP	<i>blaKPC-2, sul1</i>	
24pae164	4	4	4	2	2	0,25	2	0,5	<=0,5	N/A	<i>blaSHV, blaTEM, blaCTXM</i> ,	
24pae167	4	2	0,25	2	2	0,125	-	2	-	N/A	<i>blaSHV, blaTEM</i> ,	
24pae177	4	2	2	2	1	0,125	-	<=0,5	-	N/A	<i>blaSHV, blaTEM</i> ,	
24pae186	>128	>16	2	2	2	0,125	-	-	-	CAZ, PTZ	N/A	
24pae188	128	>32	>64	0,5	16	>16	-	>2	-	MER, CAZ, PTZ CIP	<i>blaTEM, blaCTXM, blaVIM, aac(6)-Ib, sul1</i>	
24pae200	128	>16	16	>64	64	4	-	1	-	MER, CAZ, PTZ GEN, AK, CIP	<i>blaVIM, sul1</i>	
24pae204	128	>16	16	>64	64	16	-	1	-	MER, CAZ, PTZ GEN, AK, CIP	<i>blaVIM, sul1</i>	
24pae208	4	0,25	0,25	1	1	0,125	-	<=0,5	-	N/A	N/A	
24pae211	4	1	4	2	2	0,125	-	<=0,5	-	N/A	N/A	
24pae221	4	1	16	2	2	0,125	-	2	-	MER,	N/A	
24pae241	8	2	2	2	2	0,125	2	0,5	<=0,5	N/A	N/A	
24pae250	>128	>16	>32	>64	2	>16	>=16	>=8	<=0,5	MER, IMP, DOR, CAZ, PTZ GEN, CIP	<i>blaKPC-2, sul1</i>	
24pae263	4	2	2	2	2	0,125	-	<=0,5	-	N/A	N/A	
24pae271	4	2	32	2	64	0,25	-	>2	-	MER, AK	N/A	
24pae280	128	>16	>32	8	2	>16	-	-	-	MER, CAZ, PTZ CIP	<i>blaTEM, blaVIM, sul1</i>	
24pae286	8	2	1	2	2	0,125	1	0,25	<=0,5	N/A	N/A	
24pae290	4	4	32	2	1	1	2	4	<=0,5	MER	N/A	
24pae304	4	4	1	2	2	0,125	1	0,5	<=0,5	N/A	N/A	
24pae310	4	4	>32	2	2	0,25	<=0,25	4	<=0,5	MER	N/A	
24pae321	4	2	2	4	2	4	-	<=0,5	-	CIP	N/A	

24pae336	2	1	0,5	0,5	1	0,03	2	0,25	<=0,5	N/A	N/A
24pae343	2	1	1	0,5	2	0,125	2	2	<=0,5	N/A	N/A
24pae344	2	1	1	0,5	2	0,125	1	1	<=0,5	N/A	N/A
24pae371	2	1	1	0,5	2	0,06	2	0,5	1	N/A	N/A
24pae373	2	1	1	0,5	2	0,125	-	<=0,5	-	N/A	N/A
24pae376	4	1	>64	1	2	0,125	-	2	-	MER	<i>aac(6')-Ib</i>
24pae383	128	1	1	>64	16	>16	-	1	-	PTZ GEN, CIP	<i>aac(6')-Ib</i>
24pae384	4	1	0,5	1	2	2	-	<=0,5	-	N/A	N/A
24pae385	4	4	>64	1	16	>16	-	<=0,5	-	MER, CIP	N/A
24pae400	2	4	0,5	2	2	2	-	<=0,5	-	N/A	N/A
24pma403	16	32	>64	1	2	0,25	-	-	-	MER, CAZ	N/A
24pae408	4	4	>64	1	2	0,25	2	0,5	1	MER	N/A
24pae410	4	0,5	32	2	4	0,06	2	4	1	MER	N/A
24pae417	4	0,5	0,5	1	2		2	0,5	2	N/A	N/A
24pae428	4	0,5	0,5	2	4	0,06	-	<=0,5	-	N/A	N/A
24pae435	4	0,5	0,5	2	2	0,5	-	<=0,5	-	N/A	N/A
24pae450	4	0,5	>64	2	2	0,125	-	>2	-	MER	N/A
24pae451	2	0,25	0,5	1	1	0,06	-	<=0,5	-	N/A	N/A
24pae464	>128	0,5	>64	>64	>128	>16	-	>2	-	MER, PTZ GEN, AK, CIP	<i>blaVIM,sul1</i>
24pae482	2	0,5	1	1	1	0,03	-	<=0,5	-	N/A	N/A
24pae498	>256	>16	>32	>64	4	8	-	>2	-	MER, CAZ, PTZ GEN, CIP	<i>aac(6')-Ib, sul1</i>
24pae511	4	0,25	0,5	>64	0,5	0,03	-	<=0,5	-	GEN	<i>blaSHV</i>

\*Los recuadros rojos indican resistencia al antibiótico según el CLSI 2016

- Antibiótico no evaluado

N/A: No aplica

## Anexo C: Identificación de la región variable de los integrones clase 1 en los aislamientos de *P. aeruginosa*

Código del aislamiento en el LGMB	Ciudad de aislamiento	Tamaño aproximado de <i>rv</i> <sup>a</sup> (kb)	Gen de resistencia evaluado	Tamaño aproximado de <i>rv</i> <sup>b</sup> (kb)	Tamaño aproximado de <i>rv</i> <sup>c</sup> (kb)
24pae65	Pereira	1,2	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	NA	NA
24pae112	Pereira	1,2	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	NA	NA
24pae153	Pereira	1,2	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	NA	NA
24pae188	Bogotá	2,9	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	1,2	1,6
24pae200	Montería	3	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	0,6	2,4
24pae204	Montería	3	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	0,6	2,4
24pae250	Pereira	1,2	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	NA	NA
24pae280	Bogotá	2,9	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	1,2	1,6
24pae376	Pereira	1,7	<i>aac</i> (6')-Ib	1,5	NA
24pae383	Pereira	1,5	<i>aac</i> (6')-Ib	1,4	NA
24pae464	Bogotá	NA	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	0,6	NA
24pae498	Cartagena	1,7	<i>aac</i> (6')-Ib	1,2	2,8

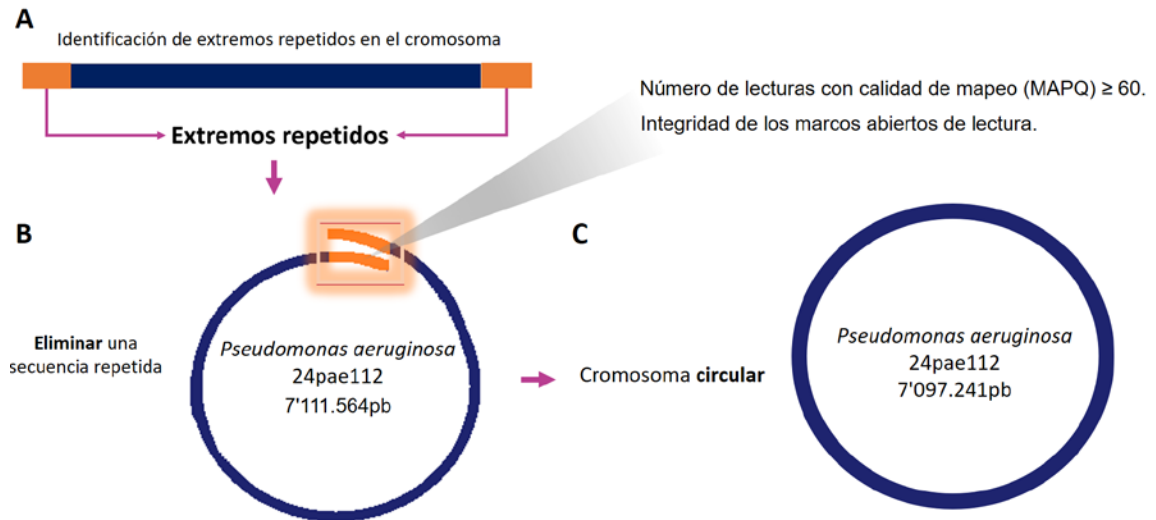
<sup>a</sup> Región variable desde *int11* hasta *qacED1*.

<sup>b</sup> Región variable desde *int11* hasta el gen de resistencia.

<sup>c</sup> Región variable desde el gen de resistencia hasta *qacED1*.

NA: No se observó amplificación.

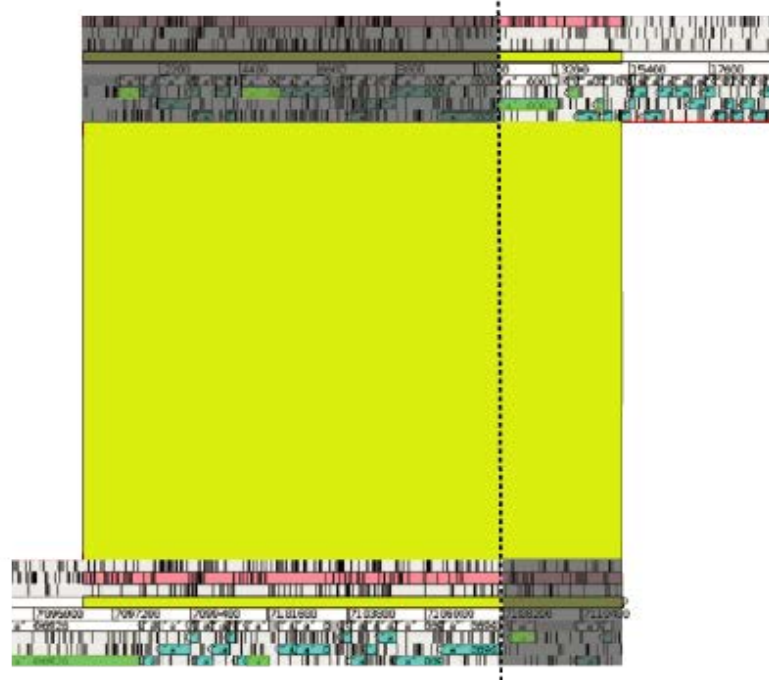
## Anexo D: Circularización del genoma de *Pseudomonas aeruginosa* 24pae112



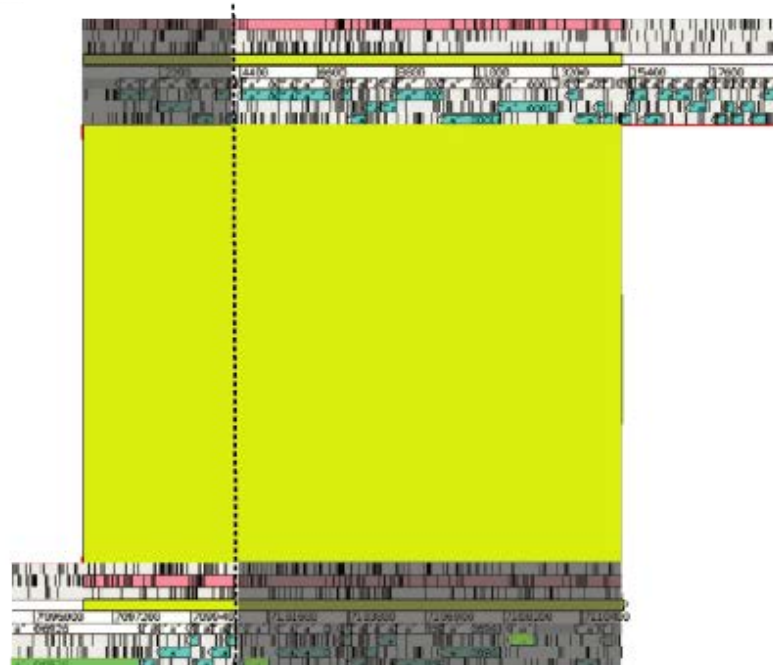
**Figura anexo D: Circularización del genoma de *P. aeruginosa* 24pae112.** (A) Ilustración de los extremos repetidos en el genoma de 24pae112. (B) Imagen de la secuencia a circularizar debido a la presencia de extremos repetidos, tamaño total del genoma y los criterios de selección para la eliminación de uno de ellos. (C) Imagen y tamaño total del cromosoma circularizado de 24pae112.

## Anexo E: Zona de “circularización” del genoma de *Pseudomonas aeruginosa* 24pae112

A



B



**Figura anexo E: Zona de “circularización” del genoma de *P. aeruginosa* 24pae112.** (A) Se ilustra la visualización en Artemis Comparison Tool (ACT) del alineamiento pareado por BLASTn en los extremos de la secuencia de 24pae112. El cuadrado amarillo representa la zona repetida, los rectángulos azules son las regiones codificantes idénticas en los extremos, los verdes son las regiones codificadas con diferencias de SNPs. La zona gris muestra la región de ADN que fue removida posterior al procedimiento y la línea punteada es la zona de corte seleccionada para la respectiva circularización con Circlator o (B) manual.

## Anexo F: Certificado de presentación de resultados en congreso internacional



### CERTIFICADO

Otorgado a:

Abril Riaño Deisy Julieth, Castro Cardozo Betsy, Moncada Guayazán María Victoria,  
 Corredor Rozo Zayda Lorena, Márquez Ortiz Ricaurte Alejandro, Olarte Narda, Valderrama Alberto,  
 Tovar Catalina, Buelvas Francisco, Moncayo José Ig, Guaca Yina, Reyes Niradiz,  
 Leal Aura L, Vanegas Gómez Natasha, Escobar Pérez Javier, Grupo de Resistencia Bacteriana

Por su participación como Autores del trabajo oral: **"CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y MOLECULAR DE Pseudomonas aeruginosa CAUSANTE DE INFECCIONES EN UCI DE TRES CIUDADES DE COLOMBIA"**, presentado en el VI CONGRESO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD FRANKLIN ROOSEVELT Y ENCUENTRO DE SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN DE LA ASOCIACIÓN CIENTÍFICA LATINA" (ASCILA), llevado a cabo los días 15, 16 y 17 de Octubre del año en curso, en el Auditorium de la Municipalidad Provincial de Huancayo, congreso que tuvo una duración de 36 horas (equivalente a 2 créditos).

Huancayo, Octubre de 2015.



Dra. Yda López-Sano Córdova  
 Presidenta de la Comisión de Gobierno  
 UNIVERSIDAD PRIVADA DE HUANCAYO  
 FACULTAD DE INGENIERÍA



Dra. Diana Andamayo Flores  
 Congreso Internacional de Ciencias de la Salud  
 Universidad Privada del Huancayo  
 FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PhD. Hugo Mendieta Zerón  
 Director  
 ASOCIACIÓN CIENTÍFICA LATINA A.E.  
 ASCILA

## Anexo G: Certificado de presentación de resultados en congreso nacional.



La Asociación Colombiana de Infectología - ACIN

Certifica que:

**DEISY JULIETH ABRIL RIAÑO**

Asistió en calidad de: **PONENTE**

**X** **ENCUENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN  
EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS**

Realizado los días 17, 18 y 19 de noviembre de 2016  
Hotel Intercontinental - Medellín

Intensidad: 24 horas

*Maria Angélica Mayo R.*  
**Dra. MARÍA ANGÉLICA MAYA R.**  
Presidente X Encuentro



**ACIN**  
ASOCIACIÓN COLOMBIANA  
DE INFECTOLOGÍA

*Pío López*  
**Dr. PÍO LÓPEZ**  
Presidente ACIN



## 10 Referencias bibliográficas

1. Judd WR, Ratliff PD, Hickson RP, Stephens DM, Kennedy CA. Clinical and economic impact of meropenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*-infected patients. *American journal of infection control*. 2016;44(11):1275-9.
2. Lautenbach E, Weiner MG, Nachamkin I, Bilker WB, Sheridan A, Fishman NO. Imipenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates: risk factors for infection and impact of resistance on clinical and economic outcomes. *Infection control and hospital epidemiology*. 2006;27(9):893-900.
3. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(12):5644-9.
4. Saavedra SY, Duarte C, Gonzalez MN, Realpe ME. [Characterization of isolates of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from seven Colombian provinces]. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*. 2014;34 Suppl 1:217-23.
5. Correa A, del campo R, Perenguez M, Blanco VM, Rodríguez-Baños M, Perez F, et al. Dissemination of High-Risk Clones of Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Colombia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(4):2421-4.
6. Kos VN, Deraspe M, McLaughlin RE, Whiteaker JD, Roy PH, Alm RA, et al. The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(1):427-36.
7. Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(4):1257-63.
8. Correa A, Del Campo R, Perenguez M, Blanco VM, Rodriguez-Banos M, Perez F, et al. Dissemination of high-risk clones of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in colombia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(4):2421-5.
9. Roy Chowdhury P, Scott M, Worden P, Huntington P, Hudson B, Karagiannis T, et al. Genomic islands 1 and 2 play key roles in the evolution of extensively drug-resistant ST235 isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Open biology*. 2016;6(3).
10. Nicolau CJ, Oliver A. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2010;28(1):19-28.
11. Meletis G, Exindari M, Vavatsi N, Sofianou D, Diza E. Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *HIPPOKRATIA* 2012;16(4):303-7.
12. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Frontiers in microbiology*. 2014;4:422.
13. Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis*. 2013;67(3):159-73.
14. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Frontiers in microbiology*. 2011;2:65.
15. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(4):582-610.
16. Poole K. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(17):2200-23.
17. Li H, Luo YF, Williams BJ, Blackwell TS, Xie CM. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *Int J Med Microbiol*. 2012;302(2):63-8.
18. Hauser AR, Ozer EA. *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Rev Microbiol*. 2011.
19. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(3):969-76.

20. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995;39(6):1211-33.
21. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(3):440-58, table of contents.
22. Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira MG, Rúbio FG, Noqueira ML, de Almeida MT, et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring blaCTX-M-2, blaGES-1 and blaGES-5, blaIMP-1 and blaSPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. *BMC Infectious Diseases*. 2012;12:176.
23. Garza-Ramos U, Barrios H, Reyna-Flores F, Tamayo-Legorreta E, Catalan-Najera JC, Morfin-Otero R, et al. Widespread of ESBL- and carbapenemase GES-type genes on carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: a multicenter study in Mexican hospitals. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2015;81(2):135-7.
24. Pakbatan Toupanlou S, Najar Peerayeh S, Pirhajati Mahabadi R. Class A and D Extended-Spectrum beta-Lactamases in Imipenem Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Burn Patients in Iran. *Jundishapur journal of microbiology*. 2015;8(8):e18352.
25. Pragasam AK, Vijayakumar S, Bakthavatchalam YD, Kapil A, Das BK, Ray P, et al. Molecular characterisation of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* during 2014 and 2015 collected across India. *Indian J Med Microbiol*. 2016;34(4):433-41.
26. Mustafa MH, Chalhoub H, Denis O, Deplano A, Vergison A, Rodriguez-Villalobos H, et al. Antimicrobial Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Cystic Fibrosis Patients in Northern Europe. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(11):6735-41.
27. Giakkoupi P, Tzouvelekis LS, Tsakris A, Loukova V, Sofianou D, Tzelepi E. IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(9):2247-53.
28. Mavroidi A, Tzelepi E, Tsakris A, Miriagou V, Sofianou D, Tzouvelekis LS. An integron-associated beta-lactamase (IBC-2) from *Pseudomonas aeruginosa* is a variant of the extended-spectrum beta-lactamase IBC-1. *J Antimicrob Chemother*. 2001;48(5):627-30.
29. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(3):622-32.
30. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(9):2598-603.
31. Castanheira M, Mendes RE, Walsh TR, Gales AC, Jones RN. Emergence of the extended-spectrum beta-lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(6):2344-5.
32. Wang C, Cai P, Chang D, Mi Z. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(6):1261-2.
33. Poirel L, Brinas L, Fortineau N, Nordmann P. Integron-encoded GES-type extended-spectrum beta-lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(8):3593-7.

34. Kotsakis SD, Papagiannitsis CC, Tzelepi E, Legakis NJ, Miriagou V, Tzouveleki LS. GES-13, a beta-lactamase variant possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):1331-3.
35. Bebrone C, Bogaerts P, Delbruck H, Bennink S, Kupper MB, Rezende de Castro R, et al. GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-Type beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(1):396-401.
36. Hong JS, Yoon EJ, Lee H, Jeong SH, Lee K. Clonal Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Sequence Type 235 Isolates Carrying blaIMP-6 and Emergence of blaGES-24 and blaIMP-10 on Novel Genomic Islands PAGI-15 and -16 in South Korea. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(12):7216-23.
37. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(4):1151-61.
38. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP, et al. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(4):1553-5.
39. Jacome PR, Alves LR, Cabral AB, Lopes AC, Maciel MA. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(9):4990.
40. Carrara-Marroni FE, Cayo R, Streling AP, da Silva AC, Palermo RL, Romanin P, et al. Emergence and spread of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian teaching hospital. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2015;3(4):304-6.
41. Garcia Ramirez D, Nicola F, Zarate S, Relloso 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(Pt 10):1565-70.
42. Robledo IE, Aquino EE, Vazquez GJ. Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(6):2968-70.
43. Falahat S, Shojapour M, Sadeghi A. Detection of KPC Carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Clinical Samples Using Modified Hodge Test and Boronic Acid Phenotypic Methods and Their Comparison With the Polymerase Chain Reaction. *Jundishapur J Microbiol*. 2016;9(9):e27249.
44. Paul D, Dhar Chanda D, Maurya AP, Mishra S, Chakravarty A, Sharma GD, et al. Co-Carriage of blaKPC-2 and blaNDM-1 in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Associated with Hospital Infections from India. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145823.
45. Hu YY, Gu DX, Cai JC, Zhou HW, Zhang R. Emergence of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 463 isolates in Hangzhou, China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(5):2914-7.
46. Murphy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR. Biochemical characterization of the acquired metallo-beta-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(2):582-7.
47. Salabi AE, Toleman MA, Weeks J, Bruderer T, Frei R, Walsh TR. First report of the metallo-beta-lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(1):582.
48. Hopkins KL, Meunier D, Findlay J, Mustafa N, Parsons H, Pike R, et al. SPM-1 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 in the UK. *J Med Microbiol*. 2016;65(7):696-7.
49. Moosavian M, Rahimzadeh M. Molecular detection of metallo-beta-lactamase genes, bla IMP-1, bla VIM-2 and bla SPM-1 in imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens in teaching hospitals of Ahvaz, Iran. *Iranian journal of microbiology*. 2015;7(1):2-6.

50. Al-Charrakh AH, Al-Awadi SJ, Mohammed AS. Detection of Metallo-beta-Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Public and Private Hospitals in Baghdad, Iraq. *Acta medica Iranica*. 2016;54(2):107-13.
51. Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Palepou MF, Babini GS, Douboyas J, et al. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(3):1290-2.
52. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000;44(4):891-7.
53. Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT, Tsai SH, Wu HM, et al. Metallo-beta-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(8):2224-8.
54. Pournaras S, Tsakris A, Maniati M, Tzouvelekis LS, Maniatis AN. Novel variant (bla(VIM-4)) of the metallo-beta-lactamase gene bla(VIM-1) in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(12):4026-8.
55. Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, Mert A, Fontana R, Rossolini GM, et al. Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(1):282-3.
56. Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol*. 2004;42(11):5094-101.
57. Pasteran F, Faccone D, Petroni A, Rapoport M, Galas M, Vazquez M, et al. Novel variant (bla(VIM-11)) of the metallo- $\beta$ -lactamase bla(VIM) family in a GES-1 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(1):474-5.
58. Marchiaro P, Tomatis PE, Mussi MA, Pasteran F, Viale AM, Limansky AS, et al. Biochemical characterization of metallo-beta-lactamase VIM-11 from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(6):2250-2.
59. Juan C, Beceiro A, Gutierrez O, Alberti S, Garau M, Perez JL, et al. Characterization of the new metallo-beta-lactamase VIM-13 and its integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(10):3589-96.
60. Mazzariol A, Mammina C, Koncan R, Di Gaetano V, Di Carlo P, Cipolla D, et al. A novel VIM-type metallo-beta-lactamase (VIM-14) in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from a neonatal intensive care unit. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(5):722-4.
61. Schneider I, Keuleyan E, Rasshofer R, Markovska R, Queenan AM, Bauernfeind A. VIM-15 and VIM-16, two new VIM-2-like metallo-beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgaria and Germany. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(8):2977-9.
62. Siarkou VI, Vitti D, Protonotariou E, Ikonomidis A, Sofianou D. Molecular epidemiology of outbreak-related *pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant blaVIM-17 metallo-beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(4):1325-30.
63. Castanheira M, Bell JM, Turnidge JD, Mathai D, Jones RN. Carbapenem Resistance among *Pseudomonas aeruginosa* Strains from India: Evidence for Nationwide Endemicity of Multiple Metallo- $\beta$ -Lactamase Clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the Newly Characterized VIM-18). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53(3):1225-7.

64. Duljasz W, Gniadkowski M, Sitter S, Wojna A, Jebelean C. First Organisms with Acquired Metallo- $\beta$ -Lactamases (IMP-13, IMP-22, and VIM-2) Reported in Austria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53(5):2221-2.
65. Iraz M, Duzgun AO, Cicek AC, Bonnin RA, Ceylan A, Saral A, et al. Characterization of novel VIM carbapenemase, VIM-38, and first detection of GES-5 carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* in Turkey. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;78(3):292-4.
66. El-Mahdy TS. Identification of a novel metallo-beta-lactamase VIM-28 located within unusual arrangement of class 1 integron structure in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Egypt. *Jpn J Infect Dis*. 2014;67(5):382-4.
67. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(3):373-83.
68. Sevillano E, Gallego L, Garcia-Lobo JM. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathol Biol (Paris)*. 2009;57(6):493-5.
69. El Garch F, Bogaerts P, Bebrone C, Galleni M, Glupczynski Y. OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(10):4828-33.
70. Borah VV, Saikia KK, Hazarika NK. First report on the detection of OXA-48 beta-lactamase gene in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* co-infection isolated from a patient in a Tertiary Care Hospital in Assam. *Indian J Med Microbiol*. 2016;34(2):252-3.
71. Martínez Rojas DDV. Betalactamasas tipo AmpC: Generalidades y métodos para detección fenotípica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2009;29:78-83.
72. Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(5):1766-71.
73. D'Angelo RG, Johnson JK, Bork JT, Heil EL. Treatment options for extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC-producing bacteria. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2016;17(7):953-67.
74. Girlich D, Naas T, Nordmann P. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(6):2043-8.
75. Guan X, Xue X, Liu Y, Wang J, Wang Y, Wang J, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance--current knowledge and future perspectives. *J Int Med Res*. 2013;41(1):20-30.
76. Yonezawa M, Takahata M, Matsubara N, Watanabe Y, Narita H. DNA gyrase *gyrA* mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995;39(9):1970-2.
77. Salma R, Dabboussi F, Kassaa I, Khudary R, Hamze M. *gyrA* and *parC* mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Nini Hospital in north Lebanon. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2013;19(1):77-81.
78. Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A, Sato K. 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. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(8):2263-8.
79. Meeks HD, Song H, Michailidou K, Bolla MK, Dennis J, Wang Q, et al. BRCA2 Polymorphic Stop Codon K3326X and the Risk of Breast, Prostate, and Ovarian Cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2016;108(2).
80. Voituron N, Jeton F, Cholley Y, Hasnaoui-Saadani RE, Marchant D, Quidu P, et al. Catalyzing role of erythropoietin on the nitric oxide central pathway during the ventilatory responses to hypoxia. *Physiol Rep*. 2014;2(2):e00223.
81. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Primary mechanisms mediating aminoglycoside resistance in the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate PA7. *Microbiology*. 2012;158(Pt 4):1071-83.

82. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy. 2010;13(6):151-71.
83. Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(2):479-87.
84. Brettin T, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Olsen GJ, et al. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. Sci Rep. 2015;5:8365.
85. Jochumsen N, Marvig RL, Damkiaer S, Jensen RL, Paulander W, Molin S, et al. The evolution of antimicrobial peptide resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is shaped by strong epistatic interactions. Nature communications. 2016;7.
86. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaiou DK. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy. 2010;13(4-5):132-8.
87. Aguayo A, Mella S, Riedel G, Bello H, Dominguez M, Gonzalez-Rocha G. [Colistin in the post-antibiotic era]. Rev Chilena Infectol. 2016;33(2):166-76.
88. Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Mol Biol Rev. 2010;74(4):621-41.
89. Munoz DM, Cassiani PJ, Li L, Billy E, Korn JM, Jones MD, et al. CRISPR Screens Provide a Comprehensive Assessment of Cancer Vulnerabilities but Generate False-Positive Hits for Highly Amplified Genomic Regions. Cancer discovery. 2016;6(8):900-13.
90. Brown-Jaque M, Calero-Caceres W, Muniesa M. Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. Plasmid. 2015;79:1-7.
91. Fernandez MB, Tossi V, Lamattina L, Cassia R. A Comprehensive Phylogeny Reveals Functional Conservation of the UV-B Photoreceptor UVR8 from Green Algae to Higher Plants. Frontiers in plant science. 2016;7:1698.
92. Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. FEMS microbiology reviews. 2009;33(2):376-93.
93. Liang X, Pham XQ, Olson MV, Lory S. Identification of a genomic island present in the majority of pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of bacteriology. 2001;183(3):843-53.
94. Morales-Espinosa R, Soberon-Chavez G, Delgado-Sapien G, Sandner-Miranda L, Mendez JL, Gonzalez-Valencia G, et al. Genetic and phenotypic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* population with high frequency of genomic islands. PloS one. 2012;7(5):e37459.
95. Battle SE, Rello J, Hauser AR. Genomic islands of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS microbiology letters. 2009;290(1):70-8.
96. Snyder LA, Loman NJ, Faraj LA, Levi K, Weinstock G, Boswell TC, et al. Epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a six-year-long hospital outbreak using high-throughput whole genome sequencing. Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2013;18(42).
97. Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. Br J Pharmacol. 2008;153 Suppl 1:S347-57.
98. Vilacoba E, Quiroga C, Pistorio M, Famiglietti A, Rodriguez H, Kovensky J, et al. A blaVIM-2 plasmid disseminating in extensively drug-resistant clinical *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* isolates. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2014;58(11):7017-8.
99. Bonnin RA, Poirel L, Nordmann P, Eikmeyer FG, Wibberg D, Pühler A, et al. Complete sequence of broad-host-range plasmid pNOR-2000 harbouring the metallo- $\beta$ -lactamase gene blaVIM-2 from *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2013;68(5):1060-5.

100. Li H, Toleman MA, Bennett PM, Jones RN, Walsh TR. Complete Sequence of p07-406, a 24,179-base-pair plasmid harboring the blaVIM-7 metallo-beta-lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(9):3099-105.
101. Rodriguez-Andrade E, Hernandez-Ramirez KC, Diaz-Perez SP, Diaz-Magana A, Chavez-Moctezuma MP, Meza-Carmen V, et al. Genes from pUM505 plasmid contribute to *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2016;109(3):389-96.
102. Sepulveda-Robles O, Kameyama L, Guarneros G. High diversity and novel species of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(12):4510-5.
103. Kwan T, Liu J, Dubow M, Gros P, Pelletier J. Comparative genomic analysis of 18 *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *Journal of bacteriology*. 2006;188(3):1184-7.
104. Oliver A, Mulet X, Lopez-Causape C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2015;21-22:41-59.
105. Pirnay JP, De Vos D, Cochez C, Bilocq F, Vanderkelen A, Zizi M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* displays an epidemic population structure. *Environmental microbiology*. 2002;4(12):898-911.
106. Pirnay JP, Bilocq F, Pot B, Cornelis P, Zizi M, Van Eldere J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS one*. 2009;4(11):e7740.
107. Pena C, Cabot G, Gomez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, et al. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2015;60(4):539-48.
108. Cholley P, Thouverez M, Hocquet D, van der Mee-Marquet N, Talon D, Bertrand X. Most multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in eastern France belong to a few clonal types. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(7):2578-83.
109. Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Dominguez MA, Zamorano L, Juan C, et al. Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(11):5527-35.
110. Castanheira M, Deshpande LM, Costello A, Davies TA, Jones RN. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(7):1804-14.
111. Ranellou K, Kadlec K, Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, Schwarz S, et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates of the international clonal complex 11 carrying the blaPER-1 extended-spectrum beta-lactamase gene in Greece. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(2):357-61.
112. Libisch B, Poirel L, Lepsanovic Z, Mirovic V, Balogh B, Paszti J, et al. Identification of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates of the international clonal complex CC11 from Hungary and Serbia. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2008;54(3):330-8.
113. Empel J, Filczak K, Mrowka A, Hryniewicz W, Livermore DM, Gniadkowski M. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(9):2829-34.
114. Viedma E, Juan C, Acosta J, Zamorano L, Otero JR, Sanz F, et al. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(11):4930-3.
115. Glupczynski Y, Bogaerts P, Deplano A, Berhin C, Huang TD, Van Eldere J, et al. Detection and characterization of class A extended-spectrum-beta-lactamase-

- producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgian hospitals. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(5):866-71.
116. Seok Y, Bae IK, Jeong SH, Kim SH, Lee H, Lee K. Dissemination of IMP-6 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 in Korea. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(12):2791-6.
117. Koutsogiannou M, Drougka E, Liakopoulos A, Jelastopulu E, Petinaki E, Anastassiou ED, et al. Spread of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clones in a university hospital. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(2):665-8.
118. Kim MJ, Bae IK, Jeong SH, Kim SH, Song JH, Choi JY, et al. Dissemination of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* of sequence type 235 in Asian countries. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013;68(12):2820-4.
119. Edelstein MV, Skleenova EN, Shevchenko OV, D'Souza JW, Tapalski DV, Azizov IS, et al. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2013;13(10):867-76.
120. Liakopoulos A, Mavroidi A, Katsifas EA, Theodosiou A, Karagouni AD, Miriagou V, et al. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* from central Greece: molecular epidemiology and genetic analysis of class I integrons. *BMC Infectious Diseases*. 2013;13- 505.
121. Rojo-Bezares B, Estepa V, Cebollada R, de Toro M, Somalo S, Seral C, et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital: characterization of metallo-beta-lactamases, porin OprD and integrons. *Int J Med Microbiol*. 2014;304(3-4):405-14.
122. Hong JS, Kim JO, Lee H, Bae IK, Jeong SH, Lee K. Characteristics of Metallo-beta-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. *Infect Chemother*. 2015;47(1):33-40.
123. Cho HH, Kwon KC, Sung JY, Koo SH. Prevalence and Genetic Analysis of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST235 Isolated from a Hospital in Korea, 2008-2012. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 2013;43(4):414-9.
124. Mano Y, Saga T, Ishii Y, Yoshizumi A, Bonomo RA, Yamaguchi K, et al. Molecular analysis of the integrons of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected by nationwide surveillance programs across Japan. *BMC microbiology*. 2015;15:41.
125. Pfennigwerth N, Geis G, Gatermann SG, Kaase M. Description of IMP-31, a novel metallo-beta-lactamase found in an ST235 *Pseudomonas aeruginosa* strain in Western Germany. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2015;70(7):1973-80.
126. Fleteau C, Janvier F, Delacour H, Males S, Ficko C, Andriamanantena D, et al. Recurrent pyelonephritis due to NDM-1 metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a patient returning from Serbia, France, 2012. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2012;17(45).
127. Jones RN, Guzman-Blanco M, Gales AC, Gallegos B, Castro AL, Martino MD, et al. Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2013;17(6):672-81.
128. Turano H, Gomes F, Medeiros M, Oliveira S, Fontes LC, Sato MI, et al. Presence of high-risk clones of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* (ST79) and SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* (ST277) in environmental water samples in Brazil. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2016;86(1):80-2.
129. de Almeida Silva KC, Calomino MA, Deutsch G, de Castilho SR, de Paula GR, Esper LM, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn center. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*. 2016.



130. Galetti R, Andrade LN, da Costa Darini AL. Pseudomonas aeruginosa carrying blaCTX-M-2 in Brazil: The occurrence of 'high-risk clones'? Journal of global antimicrobial resistance. 2015;3(2):153-4.
131. Rosenthal VD, Maki DG, Mehta Y, Leblebicioglu H, Memish ZA, Al-Mousa HH, et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 43 countries for 2007-2012. Device-associated module. American journal of infection control. 2014;42(9):942-56.
132. Rosenthal VD, Maki DG, Salomao R, Álvarez-Moreno C, Mehta Y, Higuera F, et al. Device-Associated Nosocomial Infections in 55 Intensive Care Units of 8 Developing Countries. Annals of Internal Medicine. 2006;145(8):582-91.
133. World Health Organization. Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide. World Health Organization, 2011.
134. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. Infection control and hospital epidemiology. 2013;34(1):1-14.
135. Villalobos AP, Barrero LI, Rivera SM, Ovalle MV, Valera D. Vigilancia de infecciones asociadas a la atención en salud, resistencia bacteriana y consumo de antibióticos en hospitales de alta complejidad, Colombia, 2011. Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud. 2014;34(0):67.
136. Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana de Bogotá. Boletín Informativo GREBO. Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana de Bogotá, 2015.
137. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2014. Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, , 2015.
138. Bogotá-GREBO Gpecdlrbd. Boletín informativo: Co-producciones de carbapenemasas un fenómeno en aumento y de difícil detección en el laboratorio de microbiología con pruebas fenotípicas. Bogotá-Colombia: 2016.
139. Pública PdVE-SdS. Boletín Epidemiológico Medellín saludable. Medellín-Colombia: Secretaría de Salud de Medellín, 2016.
140. (CLSI) CaLSI. M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. Wayne, PA 19087 USA: 2015; 2015. p. 237.
141. Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. APMIS. 2007;115(12):1400-8.
142. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. Journal of clinical microbiology. 2002;40(6):2153-62.
143. Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2012;67(4):906-9.
144. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in Acinetobacter spp. Int J Antimicrob Agents. 2006;27(4):351-3.
145. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of aac(6)-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2006;50(11):3953-5.
146. Jacoby GA, Chow N, Waites KB. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2003;47(2):559-62.
147. Koljalg S, Truusalu K, Vainumae I, Stsepetova J, Sepp E, Mikelsaar M. Persistence of Escherichia coli clones and phenotypic and genotypic antibiotic resistance in recurrent urinary tract infections in childhood. Journal of clinical microbiology. 2009;47(1):99-105.

148. Marquez C, Labbate M, Raymondo C, Fernandez J, Gestal AM, Holley M, et al. Urinary tract infections in a South American population: dynamic spread of class 1 integrons and multidrug resistance by homologous and site-specific recombination. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(10):3417-25.
149. Herschleb J, Ananiev G, Schwartz DC. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protocols*. 2007;2(3):677-84.
150. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*. 1995;33(9):2233-9.
151. Chin C-S, Alexander DH, Marks P, Klammer AA, Drake J, Heiner C, et al. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat Meth*. 2013;10(6):563-9.
152. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2010;26(5):589-95.
153. Milne I, Bayer M, Cardle L, Shaw P, Stephen G, Wright F, et al. Tablet--next generation sequence assembly visualization. *Bioinformatics*. 2010;26(3):401-2.
154. Krumsiek J, Arnold R, Rattei T. Gepard: a rapid and sensitive tool for creating dotplots on genome scale. *Bioinformatics*. 2007;23(8):1026-8.
155. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*. 1990;215(3):403-10.
156. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics*. 2008;9:75.
157. Carver TJ, Rutherford KM, Berriman M, Rajandream MA, Barrell BG, Parkhill J. ACT: the Artemis Comparison Tool. *Bioinformatics*. 2005;21(16):3422-3.
158. Hunt M, Silva ND, Otto TD, Parkhill J, Keane JA, Harris SR. Circlator: automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads. *Genome Biol*. 2015;16:294.
159. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072-5.
160. Gardner SN, Slezak T, Hall BG. kSNP3.0: SNP detection and phylogenetic analysis of genomes without genome alignment or reference genome. *Bioinformatics*. 2015;31(17):2877-8.
161. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014;30(14):2068-9.
162. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MT, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*. 2015;31(22):3691-3.
163. Huson DH, Scornavacca C. Dendroscope 3: an interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Syst Biol*. 2012;61(6):1061-7.
164. Huson DH, Richter DC, Rausch C, Dezulian T, Franz M, Rupp R. Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics*. 2007;8:460.
165. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(11):2640-4.
166. McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, et al. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(7):3348-57.
167. Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud L, et al. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(1):212-20.

168. Huang W, Li L, Myers JR, Marth GT. ART: a next-generation sequencing read simulator. *Bioinformatics*. 2012;28(4):593-4.
169. Alikhan NF, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC genomics*. 2011;12:402.
170. Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic acids research*. 2016;44(W1):W16-21.
171. Langille MG, Brinkman FS. IslandViewer: an integrated interface for computational identification and visualization of genomic islands. *Bioinformatics*. 2009;25(5):664-5.
172. Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream MA, et al. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics*. 2000;16(10):944-5.
173. Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics*. 2011;27(7):1009-10.
174. Hirsch EB, Tam VH. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research*. 2010;10(4):441-51.
175. Miyoshi-Akiyama T, Kuwahara T, Tada T, Kitao T, Kirikae T. Complete genome sequence of highly multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* NCGM2.S1, a representative strain of a cluster endemic to Japan. *Journal of bacteriology*. 2011;193(24):7010.
176. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Shimada K, Shiroma A, Nakano K, Teruya K, et al. A Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolate Harboring Two Copies of bla<sub>IMP</sub>-34 Encoding a Metallo-beta-Lactamase. *PLoS one*. 2016;11(4):e0149385.
177. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 2000;406(6799):959-64.
178. Martinez E, Perez JE, Buelvas F, Tovar C, Vanegas N, Stokes HW. Establishment and multi drug resistance evolution of ST235 *Pseudomonas aeruginosa* strains in the intensive care unit of a Colombian hospital. *Res Microbiol*. 2014;165(10):852-6.
179. Coordinators NR. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic acids research*. 2017;45(D1):D12-D7.
180. Cazares A, Mendoza-Hernandez G, Guarneros G. Core and accessory genome architecture in a group of *Pseudomonas aeruginosa* Mu-like phages. *BMC genomics*. 2014;15:1146.
181. Pourcel C, Midoux C, Bourkaltseva M, Pleteneva E, Krylov V. Complete Genome Sequence of PM105, a New *Pseudomonas aeruginosa* B3-Like Transposable Phage. *Genome announcements*. 2016;4(2).
182. Kropinski AM. Sequence of the genome of the temperate, serotype-converting, *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage D3. *Journal of bacteriology*. 2000;182(21):6066-74.
183. Nakayama K, Kanaya S, Ohnishi M, Terawaki Y, Hayashi T. The complete nucleotide sequence of phi CTX, a cytotoxin-converting phage of *Pseudomonas aeruginosa*: implications for phage evolution and horizontal gene transfer via bacteriophages. *Molecular microbiology*. 1999;31(2):399-419.
184. Hill DF, Short NJ, Perham RN, Petersen GB. DNA sequence of the filamentous bacteriophage Pf1. *Journal of molecular biology*. 1991;218(2):349-64.
185. Larbig KD, Christmann A, Johann A, Klockgether J, Hartsch T, Merkl R, et al. Gene islands integrated into tRNA(Gly) genes confer genome diversity on a *Pseudomonas aeruginosa* clone. *Journal of bacteriology*. 2002;184(23):6665-80.
186. Klockgether J, Reva O, Larbig K, Tummler B. Sequence analysis of the mobile genome island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa* C. *Journal of bacteriology*. 2004;186(2):518-34.

187. Battle SE, Meyer F, Rello J, Kung VL, Hauser AR. Hybrid pathogenicity island PAGI-5 contributes to the highly virulent phenotype of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in mammals. *Journal of bacteriology*. 2008;190(21):7130-40.
188. Hayden HS, Gillett W, Saenphimmachak C, Lim R, Zhou Y, Jacobs MA, et al. Large-insert genome analysis technology detects structural variation in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains from cystic fibrosis patients. *Genomics*. 2008;91(6):530-7.
189. Rau MH, Marvig RL, Ehrlich GD, Molin S, Jelsbak L. Deletion and acquisition of genomic content during early stage adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to a human host environment. *Environmental microbiology*. 2012;14(8):2200-11.
190. Martinez E, Marquez C, Ingold A, Merlino J, Djordjevic SP, Stokes HW, et al. Diverse mobilized class 1 integrons are common in the chromosomes of pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(4):2169-72.
191. Liebert CA, Hall RM, Summers AO. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1999;63(3):507-22.
192. Tato M, Coque TM, Baquero F, Canton R. Dispersal of carbapenemase blaVIM-1 gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(1):320-7.
193. Gootz TD, Lescoe MK, Dib-Hajj F, Dougherty BA, He W, Della-Latta P, et al. Genetic organization of transposase regions surrounding blaKPC carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(5):1998-2004.
194. Buehrle DJ, Shields RK, Clarke LG, Potoski BA, Clancy CJ, Nguyen MH. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia: Risk Factors for Mortality and Microbiologic Treatment Failure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016.
195. Weist K, Hogberg LD. ECDC publishes 2015 surveillance data on antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in Europe. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2016;21(46).
196. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infection control and hospital epidemiology*. 2016;37(11):1288-301.
197. Xu A, Zheng B, Xu YC, Huang ZG, Zhong NS, Zhuo C. National epidemiology of carbapenem-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative bacteria isolated from blood samples in China in 2013. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2016;22 Suppl 1:S1-8.
198. Rossi Goncalves I, Dantas RC, Ferreira ML, Batistao DW, Gontijo-Filho PP, Ribas RM. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*. 2016.
199. Radan M, Moniri R, Khorshidi A, Gilasi H, Norouzi Z, Beigi F, et al. Emerging Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Carrying blaIMP Among Burn Patients in Isfahan, Iran. *Archives of trauma research*. 2016;5(3):e33664.
200. Kaye KS, Pogue JM. Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria: Epidemiology and Management. *Pharmacotherapy*. 2015;35(10):949-62.
201. Khan MA, Faiz A. Antimicrobial resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa* in tertiary care hospitals of Makkah and Jeddah. *Annals of Saudi medicine*. 2016;36(1):23-8.

202. U.S. Department of Health and Human Services. Antibiotic Resistance Threats in United States. Centers for disease control and prevention., 2013.
203. Chen Z, Niu H, Chen G, Li M, Li M, Zhou Y. Prevalence of ESBLs-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from different wards in a Chinese teaching hospital. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(10):19400-5.
204. Hamdy Mohammed E, Elsadek Fakhr A, Mohammed El sayed H, Al Johery SE, Abdel Ghani Hassanein W. Spread of TEM, VIM, SHV, and CTX-M  $\beta$ -Lactamases in Imipenem-Resistant Gram-Negative Bacilli Isolated from Egyptian Hospitals. *Int J Microbiol*. 2016;2016.
205. Rafiee R, Eftekhar F, Tabatabaei SA, Minaee Tehrani D. Prevalence of Extended-Spectrum and Metallo beta-Lactamase Production in AmpC beta-Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates From Burns. *Jundishapur journal of microbiology*. 2014;7(9):e16436.
206. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(7):1584-90.
207. Pitout JD, Chow BL, Gregson DB, Laupland KB, Elsayed S, Church DL. Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: emergence of VIM-2-producing isolates. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(2):294-8.
208. Turton JF, Wright L, Underwood A, Witney AA, Chan YT, Al-Shahib A, et al. High-Resolution Analysis by Whole-Genome Sequencing of an International Lineage (Sequence Type 111) of *Pseudomonas aeruginosa* Associated with Metallo-Carbapenemases in the United Kingdom. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(8):2622-31.
209. Guzvinec M, Izdebski R, Butic I, Jelic M, Abram M, Koscak I, et al. Sequence types 235, 111, and 132 predominate among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Croatia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(10):6277-83.
210. Moyo S, Haldorsen B, Aboud S, Blomberg B, Maselle SY, Sundsfjord A, et al. Identification of VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* from Tanzania is associated with sequence types 244 and 640 and the location of blaVIM-2 in a TniC integron. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(1):682-5.
211. Edelstein MV, Skleenova EN, Shevchenko OV, D'Souza J W, Tapalski DV, Azizov IS, et al. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *The Lancet Infectious diseases*. 2013;13(10):867-76.
212. Feng W, Sun F, Wang Q, Xiong W, Qiu X, Dai X, et al. Epidemiology and resistance characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the respiratory department of a hospital in China. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2017;8:142-7.
213. Marvig RL, Johansen HK, Molin S, Jelsbak L. Genome analysis of a transmissible lineage of *Pseudomonas aeruginosa* reveals pathoadaptive mutations and distinct evolutionary paths of hypermutators. *PLoS genetics*. 2013;9(9):e1003741.
214. Hong JS, Yoon EJ, Lee H, Jeong SH, Lee K. Clonal dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* ST235 carrying blaIMP-6 and emergence of blaGES-24 and blaIMP-10 on novel genomic islands PAGI-15 and -16 in Korea. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016.
215. Vanegas JM, Cienfuegos AV, Ocampo AM, Lopez L, del Corral H, Roncancio G, et al. Similar frequencies of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing KPC and VIM carbapenemases in diverse genetic clones at tertiary-care hospitals in Medellin, Colombia. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(11):3978-86.
216. Naas T, Bonnin RA, Cuzon G, Villegas MV, Nordmann P. Complete sequence of two KPC-harboring plasmids from *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013;68(8):1757-62.

217. Martínez T, Vazquez GJ, Aquino EE, Martínez I, Robledo IE. ISEcp1-mediated transposition of blaKPC into the chromosome of a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* from Puerto Rico. *J Med Microbiol.* 2014;63(Pt 12):1644-8.
218. Pecora ND, Li N, Allard M, Li C, Albano E, Delaney M, et al. Genomically Informed Surveillance for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in a Health Care System. *MBio.* 2015;6(4):e01030.
219. Kitchel B, Rasheed JK, Endimiani A, Hujer AM, Anderson KF, Bonomo RA, et al. Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2010;54(10):4201-7.
220. Cuzon G, Naas T, Nordmann P. Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in blaKPC gene mobilization. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2011;55(11):5370-3.
221. Roy Chowdhury P, Merlino J, Labbate M, Cheong EY, Gottlieb T, Stokes HW. Tn6060, a transposon from a genomic island in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate that includes two class 1 integrons. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2009;53(12):5294-6.
222. Roy Chowdhury P, Scott MJ, Djordjevic SP. Genomic islands 1 and 2 carry multiple antibiotic resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* ST235, ST253, ST111 and ST175 and are globally dispersed. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2017;72(2):620-2.