



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Caracterización genómica de factores de virulencia de aislados
clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* basados en WGS
provenientes de un hospital de Bogotá, Colombia

Nicole Osorio Certuche

Universidad Nacional de Colombia
Maestría en Ciencias Microbiología
Bogotá D.C, Colombia
2022

Caracterización genómica de factores de virulencia de aislados
clínicos de *pseudomonas aeruginosa* basados en WGS
provenientes de un hospital de Bogotá, Colombia

Nicole Osorio Certuche

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito para optar al título
de:

Magister en Ciencias-Microbiología

Director:

PhD., Emiliano Barreto Hernández

Codirectora:

Dra. Aura Lucia Leal

Línea de Investigación:

Biología molecular de agentes infecciosos

Grupos de Investigación:

Epidemiología molecular

Bioinformática

Enfermedades infecciosas

Universidad Nacional de Colombia

Maestría en Ciencias Microbiología

Bogotá D.C, Colombia

2023

A mis padres, por su apoyo incondicional y amor infinito.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Nicole Osorio C.

Nicole Osorio Certuche

Fecha:30/01/2023

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia y el Ministerio de Ciencia y tecnología por la financiación del macroproyecto “Diagnóstico molecular de resistencia y virulencia, y seguimiento epidemiológico de bacterias Gramnegativas multirresistentes causantes de IAAS, basado en secuenciación de genoma completo (WGS) y datos sociodemográficos y clínicos” del cual surgió este proyecto de investigación y a la institución hospitalaria participante por toda su colaboración.

Al profesor Emiliano Barreto Hernández por permitirme hacer parte de sus grupos de investigación; por todas sus enseñanzas, apoyo y dirección durante la ejecución de este trabajo. A la Doctora Aura Lucia Leal por su codirección y aportes en este proyecto.

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia y a cada una de las personas que lo conforman (Profesores, estudiantes, administrativos, y colaboradores), gracias por su amabilidad y ayuda durante este proceso.

A mis compañeros de los grupos de investigación de Epidemiología molecular y Bioinformática, por su compañía durante estos años y sus valiosos aportes a este trabajo. Especialmente a Mishelle Cuello, Sebastián Prada y Diego Talero.

A mis amigos y familia que de alguna manera u otra me apoyaron en todo el desarrollo de la maestría, en especial a Laura Martínez y Mónica Pla por sus consejos y palabras de aliento en todo momento

A mis padres, por todos sus esfuerzos y apoyo incondicional que me han brindado para que cumpla mis sueños académicos y profesionales; esto es por y para ustedes.

Resumen

Caracterización genómica de factores de virulencia de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* basados en WGS provenientes de un hospital de Bogotá, Colombia

En humanos la infección por *P. aeruginosa* es controlada por múltiples factores de virulencia y es una de las causas más recurrentes y graves de infecciones asociadas a la atención en salud. Por lo tanto, el objetivo general de este estudio fue caracterizar los perfiles genómicos de virulencia en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de un hospital universitario de Bogotá-Colombia, utilizando la tecnología de secuenciación de genoma completo (WGS). Este estudio prospectivo se realizó durante los años 2019 y 2021, en donde se secuenciaron 54 aislamientos provenientes de 37 pacientes de los servicios de UCI, hospitalización y Unidad quirúrgica, utilizando las plataformas illumina y Oxford Nanopore. En los genomas se encontraron un total de 246 genes de virulencia, encontrando la presencia de genes de gran importancia en la virulencia de esta bacteria, como el gen *pilA* que se detectó en el 48,1% de los aislamientos y el gen *algD* en el 100%. Para las toxinas la prevalencia fue para *exoU* de (16,6%), *exoT* (92,5%), *exoS* (79,6%) y *exoY* (88,8%). Adicionalmente se encontró la presencia de 16 secuencio-tipos (ST) ya reportados y se encontraron 13 ST nuevos. En conclusión, el uso de tecnologías como WGS permitió determinar el perfil de virulencia de aislados clínicos de *P. aeruginosa*, logrando un acercamiento global a los perfiles de virulencia de los aislamientos clínicos de esta bacteria en el país, siendo el primer reporte de la prevalencia de más de 200 genes de virulencia en Colombia para *P. aeruginosa*.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, WGS, factores de virulencia, Infecciones Asociadas a la Atención en Salud, secuencio-tipos.

Abstract

Genomic characterization of virulence factors of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* based on WGS from a hospital in Bogotá, Colombia

In humans, *P. aeruginosa* infection is controlled by multiple virulence factors and is one of the most recurrent and serious causes of healthcare-associated infections. The aim of this study was to characterize the virulence genomic profiles in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a hospital in Bogotá-Colombia, using whole genome sequencing (WGS) technology. A prospective study was carried out during the years 2019 and 2021, where 54 isolates from 37 patients from both the ICU and hospitalization services, and operating rooms were sequenced, using the illumina and Oxford Nanopore platforms. A total of 246 virulence genes were found in the genomes, finding the presence of genes of great importance in the virulence of this bacterium, such as the *pilA* gene that was detected in 48.1% of the isolates and the *algD* gene that found in the 100% of them. For toxins, the prevalence was for *exoU* de (16.6%), *exoT* (92.5%), *exoS* (79.6%) and *exoY* (88.8%). Additionally, the presence of 16 sequence-types (ST) already reported and 13 new ST were found. In conclusion, the use of technologies such as WGS made it possible to determine the virulence profile of clinical isolates of *P. aeruginosa*, achieving a global approach to the virulence profiles of the clinical isolates of this bacterium in the country, being the first report of the prevalence of more than 200 virulence genes in Colombia for *P. aeruginosa*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, WGS, Virulence factors, healthcare-associated infections, sequence-types.

Contenido

Resumen	VI
Abstract	VII
Lista de Figuras	X
Lista de Abreviaturas	XI
1: Marco teórico	1
1.1 IAAS	1
1.2 Grupo ESKAPE.....	1
1.3 Virulencia en bacterias	2
1.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.5 Factores de virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
1.5.1 Adherencia y motilidad.....	5
1.5.2 Biopelícula	6
1.5.3 Quorum sensing.....	8
1.5.4 Sistemas de secreción y toxinas.....	9
1.6 Técnicas para detección y caracterización de factores de virulencia.....	13
2: Estado del arte	15
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el mundo.....	15
2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en Colombia	16
3: Objetivos	17
3.1 Objetivo general.....	17
3.2 Objetivos específicos	17
4: Metodología	18
4.1 Origen de los aislamientos bacterianos y recolección de los datos clínicos	18
4.2 Recuperación y preservación de los aislamientos bacterianos.....	19
4.3 Extracción de DNA genómico	19
4.4 Librerías genómicas.....	19
4.5 Secuenciación.....	20
4.6 Flujo bioinformático	20
4.7 Genómica comparativa	21

4.8 Identificación de elementos de virulencia.....	22
5: Resultados y Discusión	23
5.1 Aislamientos bacterianos recolectados	23
5.2 Características clínicas y sociodemográficas.....	24
5.3 Extracción de DNA genómico	26
5.4 Librerías y secuenciación.....	26
5.4.1 Illumina	26
5.4.2 Oxford Nanopore	26
5.5 Características de los genomas	27
5.6 Análisis de elementos de virulencia y genómica comparativa	27
6: Conclusiones y recomendaciones	48
7: Anexos	50
Anexo A: Consentimiento informado.....	50
Anexo B: Formato de seguimiento epidemiológico	52
Anexo C: Protocolo de recolección, transporte y procesamiento general de aislamientos clínicos en el Laboratorio de Epidemiología Molecular	54
Anexo D: Resultados calidad, pureza y cuantificación DNAg	57
Anexo E: Resultados evaluación de los ensamblajes	59
Anexo F: Genes de virulencia encontrados	60
Anexo G: Perfiles alélicos de los ST	67
Anexo H: Presentaciones en eventos y reconocimientos	69
8: Bibliografía	71

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 5-1: Distribución de aislamientos por tipo de muestra	35
Figura 5-2: Número de participantes por rango de edad	36
Figura 5-3: Clasificación tipo IAAS	37
Figura 5-4: Presencia y ausencia de genes de adherencia	41
Figura 5-5: Presencia y ausencia de genes de sistemas de secreción.....	44
Figura 5-6: Presencia y ausencia de genes Biosurfactantes, Enzimas y anti-fagocitosis	47
Figura 5-7: Presencia y ausencia de genes de proteasas y regulación	49
Figura 5-8: Presencia y ausencia de genes de Quorum sensing y toxinas.....	51
Figura 5-9: Presencia y ausencia de genes de toma de hierro y fenacinas.....	53
Figura 5-10: Presencia y ausencia de otros genes.....	54
Figura 5-11: Proporciones de los ST encontrados en el estudio	55
Figura 5-12: Grupos clonales identificados.....	59

Lista de Abreviaturas

ADPRT: ADP ribosil transferasa

eDNA: DNA extracelular

GAP: proteína activadora de GTPasa

IAAS: Infecciones asociadas a la atención en salud

INS: Instituto Nacional de Salud

MUC1: Mucina respiratoria humana

NGS: Secuenciación de nueva generación

OMS: Organización Mundial para la salud

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

QS: *Quorum sensing*

UCI: Unidad de cuidados intensivos

WGS: Whole genome sequencing

1: Marco teórico

1.1 IAAS

Las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), previamente llamadas infecciones nosocomiales, son aquellos procesos infecciosos que ocurren mientras se recibe atención médica en un hospital u otro establecimiento prestador de salud. Las IAAS se manifiestan clínicamente a partir de las 48 horas o más después del ingreso, o dentro de los 30 días posteriores de haber recibido atención médica (Revelas, 2012)(Haque et al., 2018).

En el 2011 la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó a las IAAS como el evento adverso más común en pacientes hospitalizados (World Health Organization, 2011), seguido por eventos adversos por medicamentos y las complicaciones en quirófanos (Haque et al., 2018). Las IAAS se han convertido no solo en un problema de salud pública mundial, sino también en un problema en la seguridad del paciente; su aparición prolonga la estadía hospitalaria lo cual conlleva a un incremento del porcentaje de mortalidad y de la resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos , pero también representa un aumento en los gastos hospitalarios (World Health Organization, 2011) (García Armijos et al., 2021).

En países desarrollados 7 de cada 100 pacientes hospitalizados adquiere una IAAS, mientras que en países en vía de desarrollo este valor asciende hasta 10 pacientes de cada 100 hospitalizados. Las IAAS se pueden adquirir en diferentes servicios, sin embargo, en unidades de cuidados intensivos (UCI) el riesgo de adquirir una IAAS es mayor; esto se debe al uso de catéteres urinarios, catéteres venosos centrales y ventiladores (World Health Organization, 2011)(Haque et al., 2018).

1.2 Grupo ESKAPE

Un grupo de bacterias son las responsables de un gran porcentaje de las IAAS, estas bacterias se conocen como ESKAPE. Estas siglas corresponden a las iniciales de las bacterias *Enterococcus spp*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp* (Chávez-Jacobo, 2020) .

En el año 2017 la OMS publicó una lista de bacterias resistentes a antimicrobianos que merecen prioridad en la investigación y desarrollo de nuevos fármacos. Dentro de esta lista, las bacterias ESKAPE ocupan las primeras posiciones en críticamente prioritarias (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y la familia *Enterobacteriaceae*) y altamente prioritarias (*Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus*) (World Health Organization, 2017).

1.3 Virulencia en bacterias

La virulencia se describe como la habilidad de un organismo de infectar un huésped y causarle daño; que se define por la cantidad, daño o enfermedad que se manifieste en el huésped. La virulencia es una medida cuantitativa de la gravedad de la enfermedad, y se explica por los factores de virulencia de la bacteria o del patógeno que está infectando; por otro lado la enfermedad se explica por el repertorio de factores de virulencia del patógeno y la respuesta inmune del huésped (Sharma et al., 2017) (Diard & Hardt, 2017).

A lo largo de los años las bacterias y sus huéspedes han co-evolucionado, tiempo en el que las bacterias han modificado su virulencia para adaptarse a los sistemas de defensa del huésped. El proceso final de una enfermedad producida por una infección dependerá no solo de la virulencia de la bacteria, sino también de los factores de riesgo del huésped como lo son el sistema inmune, la edad, la dieta y otros factores que determinan su susceptibilidad a la infección (Beceiro et al., 2013).

En bacterias es muy importante el rol de los factores de virulencia; moléculas que ayudan a la bacteria a colonizar al huésped a nivel celular y los cuales pueden ser

secretados, asociados a la membrana, o de naturaleza citosólica. Los factores de virulencia asociados a la membrana son los que facilitan la adhesión de la bacteria y la evasión del sistema inmune de la célula huésped y los factores secretados, juegan un papel importante debido a que ayudan a la bacteria evadir la respuesta inmunitaria innata y adaptativa del huésped (Diard & Hardt, 2017). Por lo tanto si bien la función principal de estas moléculas es ayudar a colonizar al huésped a nivel celular, también evitan la defensa del sistema inmune del huésped; contribuyendo a la capacidad de la bacteria en causar una infección grave (Pelegri et al., 2021)(Reynolds & Kollef, 2021).

1.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria que se encuentra dentro del grupo ESKAPE; es un bacilo gram negativo aerobio y en algunas ocasiones anaerobio facultativo. Tiene la particularidad de encontrarse en una variedad de nichos como el agua, el suelo, las plantas, los animales y los humanos (Chávez-Jacobo, 2020)(Pelegri et al., 2021).

Adicionalmente este microorganismo se caracteriza por ser no fermentador de lactosa y tener la capacidad de utilizar fuentes de carbono y nitrógeno como acetato y amoníaco, obteniendo la energía por medio de la oxidación de azúcares. El género *Pseudomonas* crece entre los 20°C y los 42°C, aunque la especie *P. aeruginosa* crece a los 42°C lo que permite diferenciarla de otras especies como *P. fluorescens* y *P. putida* (Fragozo & Villalobos, 2016)(Paz-Zarza et al., 2019).

En humanos la infección por *P. aeruginosa* es una de las causas más recurrentes y graves de IAAS, afecta principalmente a pacientes inmunocomprometidos y hospitalizados en UCI (Spagnolo et al., 2021)(Genovese et al., 2020). El origen de la infección y transmisión de *P. aeruginosa* puede ser endógena o exógena; la primera se da por la selección mediada por antibióticos de *P. aeruginosa* de la microbiota del huésped, mientras que la exógena ocurre entre pacientes o entre el

ambiente y los pacientes, a través de los trabajadores de la salud, equipos médicos, entre otros.

Comúnmente la infección de esta bacteria se manifiesta como bacteriemia, neumonía o en infecciones de heridas y del tracto urinario. Otras infecciones de importancia clínica generadas por *P. aeruginosa* son las infecciones oculares, en quemaduras, del torrente sanguíneo, de oído e infecciones en pacientes con fibrosis quística (Reynolds & Kollef, 2021)(Pelegri et al., 2021).

El tamaño del genoma de *P. aeruginosa* puede estar entre 5,5 y 7 Mb, ésta variabilidad se debe a la presencia de un genoma accesorio el cual puede llegar a ocupar el 20% del genoma total de la bacteria y codifica para una gran variedad de genes de vías metabólicas, reguladores transcripcionales, genes de resistencia y de virulencia (Pelegri et al., 2021)(Subedi et al., 2018).El genoma de *P. aeruginosa* usado como referencia para comparar con otros genomas es el PAO1, el cual tiene un genoma aproximado de 6,3 Mbp con un 66,6% G+C y con 5700 genes codificados (de Sousa et al., 2021).

La variedad de mecanismos de adaptación, resistencia a diferentes clases de antibióticos y múltiples factores de virulencia han convertido *P. aeruginosa* en una amenaza para la salud pública mundial.

1.5 Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*

La infección de *P. aeruginosa* agrupa una serie de cuatro pasos generales. La adhesión y colonización son los dos primeros pasos importantes en la patogénesis de la bacteria, aquí las bacterias se adhieren a la superficie para lograr la colonización; en un tercer paso las bacterias que lograron la colonización empiezan a invadir los tejidos del huésped y por último en un cuarto paso se facilita la diseminación y la infección sistemática al dañar tejidos del huésped como la piel, las vías respiratorias, la sangre y las vías urinarias. Cada etapa de la infección está altamente influenciada y controlada por múltiples factores de virulencia (Sultan et al., 2021).

P. aeruginosa produce numerosos factores de virulencia, entre ellos se encuentran los factores de virulencia de adherencia como los pilis y flagelos; producción de biopelículas, *quorum sensing*, sistemas de secreción, toxinas, pigmentos, proteasas y otras enzimas (Park & Koo, 2022). Sin embargo, la presencia de estos factores de virulencia no es uniforme debido a que la mayoría están codificados dentro de elementos móviles, siendo parte del conjunto variable de genes que conforman el genoma accesorio. Adicionalmente el impacto de estos genes de virulencia en el resultado final de la infección en los pacientes puede diferir, ya que puede tener un rol importante en la gravedad o en favorecer el desarrollo de infecciones específicas (Horna & Ruiz, 2021).

1.5.1 Adherencia y motilidad

P. aeruginosa tiene un único flagelo polar y pilis tipo IV que son necesarios para su motilidad, adhesión, formación de biopelículas y exitosa infección, especialmente en las células del sistema respiratorio. Gracias al flagelo que genera una fuerza que mueve a la bacteria, este microorganismo puede tener motilidad en ambientes acuosos; el flagelo de *P. aeruginosa* consta de un filamento de flagelina polimerizada (FliC) dispuesta helicoidalmente, una proteína de caperuza (FliD), el gancho en la base del filamento (FlgE), proteínas de unión y membranas internas. FliC es la responsable de unirse a glicolípidos y proteoglicanos en la superficie de las células epiteliales del pulmón y por otro lado FliD es la que media la adhesión a la mucina respiratoria humana (MUC1) (Reynolds & Kollef, 2021)(Jurado-Martín et al., 2021).

Los pili son estructuras esenciales para el inicio del proceso de infección por su papel en la motilidad de la bacteria, los pili tipo IV de *P. aeruginosa* son apéndices retráctiles compuestos de una proteína monomérica llamada (i) pilina mayor (PilA) y de pilinas menos abundantes llamadas pilinas menores, las cuales se subdividen en (i) pilinas menores centrales que cumplen un rol importante en la formación del pili y en (ii) pilinas menores no centrales que están implicadas en la agregación, adhesión y captación de ADN (Jurado-Martín et al., 2021) . Para lograr una rápida

colonización en distintas superficies las fibras de los Pili tipo IV tienen ciclos de extensión, adhesión y retracción; generando la fuerza para impulsar la célula bacteriana hacia adelante. La extensión y retracción del pili se da gracias a dos ATPasas asociadas a la membrana citoplasmática, conocidas como PilB y PilT; la primera polimeriza las subunidades PilA mientras que la segunda las despolimeriza. Finalmente los Pili tipo IV también han sido relacionados con la formación y desarrollo de las biopelículas, especialmente por sus propiedades de adhesión y motilidad (Jurado-Martín et al., 2021).

1.5.2 Biopelícula

La capacidad de formar biopelículas es uno de los factores de virulencia más importantes en la patogenicidad de *P. aeruginosa* y está relacionada con infecciones crónicas y con infecciones asociadas a dispositivos, las biopelículas confieren ventajas en muchas situaciones de la infección y mejora la capacidad de la bacteria de resistir al sistema inmunitario del huésped, a los antibióticos y a las duras condiciones ambientales como la desecación, el estrés oxidativo o la radiación ultravioleta funcionales. (Pelegrin et al., 2021).

La biopelícula es un complejo de bacterias encerradas en una matriz de células conformado por polisacáridos, el ADN extracelular (eDNA), la piocianina y las proteínas. El alginato, Pel y Psl son los tres tipos de polisacáridos producidos por *P. aeruginosa* que proporcionan una integridad estructural a la biopelícula (Newman et al., 2017) (Sultan et al., 2021). El alginato es un polímero lineal no ramificado por ácido L-gulurónico y ácido D-manurónico y es el componente principal de las biopelículas mucoides. El operon algD se encarga de codificar las enzimas necesarias para la síntesis de alginato, este exopolisacárido tiene el rol de proporcionar soporte estructural y de protección a la biopelícula y sus grupos acetilo contribuyen a su alta viscosidad permitiendo la retención de nutrientes y agua. El alginato además protege a la bacteria contra la fagocitosis del huésped en los pulmones y elimina las especies de oxígeno reactivas que son liberadas por los macrófagos y los neutrófilos activados (Jurado-Martín et al., 2021).

Los sistemas Pel y Psl están involucrados en las primeras etapas de formación de biopelículas. (i) El operón Psl contiene muchos genes *Psl* que permiten aumentar la adhesión intercelular; el Psl se compone de un pentasacárido que contiene D-manosa, L-ramnosa y D-glucosa. (ii) El polisacárido Pel es rico en glucosa y está codificado por el operón *pelABCDEF* que contiene 6 genes. Tanto el alginato como el Psl inducen una fuerte respuesta de leucocitos polimorfo nucleares, lo que conduce a una liberación sustancial de especies de oxígeno reactivas que contribuye a la inflamación pulmonar; además pueden unirse a los antibióticos amino glucósidos, lo que dificulta su penetración en la biopelícula aumentando la resistencia a los antibióticos (de Sousa et al., 2021). Cuando se está formando la biopelícula una subpoblación de células se lisa y se libera eDNA. El eDNA se asocia con varios procesos, primero sirve como una fuente de nutrientes para las bacterias en la biopelícula, también ayuda a la organización y alineación celular a través de *twitching*, además actúa como quelante de cationes en la membrana externa para posteriormente activar el sistema de secreción que disemina factores de virulencia dentro del huésped. Por último el eDNA provoca que el entorno de la biopelícula se acidifique lo que limita la penetración de los agentes antimicrobianos (Thi et al., 2020)

El desarrollo de biopelículas de *P. aeruginosa* se divide en cinco etapas.

(i) La primera etapa es la unión reversible o adherencia inicial, donde las bacterias de vida libre se adhieren al sustrato por medio de sus flagelos, pero también pueden separarse según la concentración de bacterias o los cambios ambientales, como la fuerza física.

(ii) En la segunda etapa o fijación irreversible, hay una entrada continua de células móviles al sitio de iniciación de la biopelícula ya que se adhieren de forma irreversible al permanecer planas a lo largo de la superficie para protegerse de las barreras físicas, posteriormente las bacterias forman micro colonias e inicia la expresión de los genes *algC*, *algD* y *algU*, responsables de la síntesis de las sustancias poliméricas extracelulares de alginato.

(iii) En la tercera etapa, la proliferación celular y la pérdida de la motilidad de los orgánulos marcan el comienzo del proceso de maduración de la biopelícula, durante el cual se observa una regulación ascendente exponencial de ciertos genes.

(iv) En la cuarta etapa, una superficie desprovista de bacterias adheridas se llena con bacterias en reproducción, que finalmente cubren toda la superficie, transformándose en una estructura tridimensional y adoptando estructuralmente un ensamblaje multicelular en forma de hongo completando la maduración y espesamiento de la biopelícula.

(v) El quinto y último estado es el desprendimiento de células individuales o agregados de la biopelícula, la síntesis de los compuestos de la matriz disminuye y la matriz se escinde enzimáticamente lo que lleva a la dispersión de las células planctónicas hacia el medio ambiente, donde pueden volver a formar una nueva biopelícula en otro lugar (Thi et al., 2020)(de Sousa et al., 2021)(Sultan et al., 2021)

1.5.3 Quorum sensing

La comunicación intercelular en las bacterias incita respuestas coordinadas para mostrar rasgos de virulencia que son imposibles de lograr para una célula individual. El Quorum sensing (QS) es un sistema de comunicación bacteriana intercelular que depende de la densidad celular y consiste en múltiples vías de señalización que regulan sinérgicamente el comportamiento social y la virulencia bacteriana. En *P. aeruginosa* el QS controla directa o indirectamente la expresión de más del 10% del genoma y se han descrito 4 sistemas centrales denominados Las, Rhl, Pqs e Iqs (Azam & Khan, 2019)(Chadha et al., 2021).

Los sistemas QS dominantes en *P. aeruginosa* son Las y Rhl entre otros (pqs, iqs, etc); estos son sistemas de señalización de homoserina lactona N-acilada (acil-HSL). (i) El sistema Las comprende una sintasa auto inductora (lasI), que produce la lactona auto inductora N-3-oxo-dodecanoil-homoserina (3OC12-HSL). Por otro

lado, (ii) el sistema Rhl tiene una sintasa autoinductora (rhII) que produce N-butanoil-homoserina lactona (C4-HSL). (iii) El tercer sistema, pqs, implica una sintasa autoinductora, PqsABCDH, que produce señales de 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona o simplemente quinolona. (iv) El sistema final es iqs, que tiene una sintasa autoinductora, AmbBCDE, que produce 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído (IQS). Para estas enzimas autoinductoras de los 3 primeros sistemas hay unas proteínas receptoras conocidas como LasR, RhlR y PqsR, respectivamente, para el sistema iqs aún no se ha determinado completamente. La unión del auto inductor y las proteínas receptoras forman un complejo que conduce a la activación de la expresión génica de factores específicos de virulencia, la esporulación, la pigmentación, la formación de biopelículas y otras características patogénicas (Azam & Khan, 2019)(Brindhadevi et al., 2020).

1.5.4 Sistemas de secreción y toxinas

En *P. aeruginosa* hay múltiples vías de secreción que son las responsables de llevar algunas proteínas, toxinas y enzimas al exterior de la célula. Actualmente en organismos procariontes hay 9 sistemas de secreción descritos; 5 de estos sistemas han sido reportados en *P. aeruginosa*, estos son el T1SS, T2SS, T3SS, T5SS y T6SS, siendo el T3SS el más relevante (Azam & Khan, 2019). El T1SS ha sido relacionado con los sistemas Apr y Has, los cuales están involucrados en la captura del grupo hemo y en la adquisición y excreción de proteasas respectivamente. El T2SS secreta varios productos como enzimas proteolíticas, ADP-ribosil transferasas, fosfatasa alcalina, exotoxina A y otros; productos de este sistema de secreción como las elastasas y la fosfolifasa C juegan un papel importante en el desarrollo de las infecciones de *P. aeruginosa* en los pulmones.

La elastasa LasB, tiene la capacidad de destruir o inactivar tejidos en los organismos huéspedes; por otro lado, la LasA, tiene actividad proteolítica y degrada la elastina de las proteínas del huésped. La exotoxina A tiene actividad ADP-ribosil transferasa, lo que le confiere un papel importante en la inhibición de

la síntesis de proteínas del huésped, conduciendo a la muerte celular y la disminución de la respuesta a la infección por parte del organismo colonizado (Sauvage & Hardouin, 2020) (Horna & Ruiz, 2021).

Respecto al T4SS este se encuentra relacionado con los pili y la transferencia horizontal de genes; del T5SS el producto que está más descrito es la EstA, el cual desempeña un papel en la hidrólisis de ésteres de glicerol, en la síntesis de ramnolípidos y en la motilidad de la bacteria. Otro producto del T5SS es la proteasa LepA la cual ha estado involucrada en la modulación de la respuesta inmune (Horna & Ruiz, 2021). Por otro lado se encuentra el T6SS, fue el último sistema de secreción descrito en *P. aeruginosa* y se ha reportado que se encuentra asociado con la formación de la biopelícula y junto con el T3SS son los únicos sistemas capaz de inyectar directamente los efectores en las células del huésped (Chen et al., 2015) .

El T3SS tiene funciones relacionadas con la colonización bacteriana, la supervivencia y la replicación, este sistema de secreción es un sistema especializado en exportación de proteínas que forma un complejo de aguja entre la bacteria y las células del hospedero, para el transporte y secreción de productos, llamados también efectores los cuales tienen un rol fundamental en la patogenia de la bacteria y en la supervivencia de ésta en medios hostiles. Actualmente se han descrito 4 efectores en el T3SS de *P. aeruginosa*, estos son las 4 exotoxinas ExoS, ExoT, ExoY y ExoU. El T3SS está codificado por 36 genes en cinco operones, los cuales corresponden a cinco componentes funcionales: el complejo de aguja, el aparato de translocación, el regulador de proteínas, las chaperonas y las proteínas efectoras (Yang et al., 2022).

Las bacterias como *P. aeruginosa* inyectan las toxinas del T3SS a través de la superficie apical de las células epiteliales del huésped. La prevalencia de las exotoxinas en aislamientos clínicos varía entre estudios y el origen de la muestra y aunque cumplen con funciones específicas, en general destruyen el cito esqueleto

de las células y provocan una retracción de estas lo que puede conducir a la descamación celular; (Zheng et al., 2021).

Por su alta relevancia clínica, las más estudiadas y caracterizadas son la ExoS y la ExoU. En particular, la exotoxina ExoS la cual está codificada por el gen *ExoS*, es una proteína de 453 aminoácidos que presenta actividad tóxica bifuncional; en su extremo C terminal tiene una actividad de proteína activadora de GTPasa (GAP) y en su extremo N terminal actividad de ADP ribosil transferasa (ADPRT) (Paz-Zarza et al., 2019) (Horna & Ruiz, 2021) (J. J. Yang et al., 2022).

Algunos estudios han sugerido que los residuos que están en el dominio GAP se dirigen a pequeñas GTPasa como Rho, Rac y el ciclo de división celular 42 (CDC42) y las convierte en una forma inactiva, esto lleva a la interrupción de la adhesión célula a célula, bloqueando la organización del cito esqueleto de actina de la célula huésped lo que facilita la invasión de *P. aeruginosa* a través de las barreras epiteliales. También se ha demostrado que la región GAP de esta proteína puede contribuir a la apoptosis de la célula del huésped (Horna & Ruiz, 2021) (J. J. Yang et al., 2022). Por otro lado los residuos del dominio ADPRT contienen un sitio de unión para una proteína necesaria para la activación de la actividad ADPRT, una vez inyectada en el huésped la actividad ADPRT de ExoS se activa y obstaculiza el cito esqueleto de actina lo que conlleva a una interferencia en el tráfico vesicular y en la endocitosis, conduciendo a la muerte celular por apoptosis (J. J. Yang et al., 2022).

ExoU, es el efector más largo de *P. aeruginosa* y es el único del T3SS de esta bacteria que se encuentra codificado dentro de una isla genómica (Horna & Ruiz, 2021); ExoU es una fosfolipasa de 74kDa que pertenece a la familia de las fosfolipasas A2; después de su secreción se localiza en la membrana citoplasmática interna de las células eucariotas, donde ejerce su actividad al interactuar con la ubiquitina o con proteínas ubiquitinadas, produciendo la lisis de la célula huésped en un rango de 1 a 2 horas. ExoU tiene un dominio de localización de membrana, el cual permite que este efector se dirija a los fosfolípidos de la membrana plasmática de la célula huésped; adicionalmente

requiere la activación de un cofactor eucariota. (Springer et al., 2019) (J. J. Yang et al., 2022). Además de conducir rápidamente la lisis celular, ExoU también tiene un papel en la inducción del shock séptico, por lo que este efector mata las células epiteliales e inmunitarias del huésped lo cual ayuda a la invasión y diseminación bacteriana (J. J. Yang et al., 2022)(Behzadi et al., 2021).

ExoT comparte un 76% de homología con la exotoxina ExoS, e igualmente es una proteína GTPasa y ADP ribosiltransferasa la cual afecta la integridad y viabilidad de células epiteliales del organismo infectado. La citotoxina ExoT es de 457 aminoácidos (40kDa) y tienen un efecto similar a la ExoS, permitiendo la diseminación de *P. aeruginosa* evadiendo la fagocitosis y rompiendo las barreras epiteliales; además se ha reportado que ExoT inhibe la división celular en mamíferos, afectando los procesos de cicatrización de heridas (J. J. Yang et al., 2022) (Behzadi et al., 2021) (Kloth et al., 2018). Por último, ExoY, es una adenil ciclasa de 378 aminoácidos (42kDa), y su papel en la patogenicidad de la bacteria es poco conocida, debido a que este efector necesita de un cofactor de la célula huésped para su activación y su identidad aun es desconocida, por lo que se sigue realizando estudios para conocerla. En la actualidad se conoce que para tener una actividad enzimática completa ExoY debe de unirse a un cofactor proteico citosólico, también se ha demostrado que la actina F se une a ExoY, produciendo una estimulación de la actividad guanilil ciclasa de la toxina(Kloth et al., 2018)(J. J. Yang et al., 2022).

Por lo general en lo que se encuentra reportado, la mayoría de las cepas no tienen los cuatro genes que codifican para estas exotoxinas mencionadas anteriormente. En su mayoría las cepas de *P. aeruginosa* portan los genes *ExoT* y *ExoY*; pero casi todas solo portan el gen *ExoU* o *ExoS*, no ambos; con algunas excepciones donde se encuentran los dos. Las cepas que son ExoU positivas y ExoS negativas se conocen como cepas citotóxicas, y las ExoS positivas y ExoU negativas se conocen como cepas invasivas (J. J. Yang et al., 2022).

1.6 Técnicas para detección y caracterización de factores de virulencia.

Una de las técnicas moleculares más utilizadas es la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR. Esta técnica permite desde la detección de agentes etiológicos hasta la detección de sus genotipos de virulencia y resistencia con gran facilidad y rapidez. Aunque la detección de genes de virulencia por este método no confirma que la proteína este siendo producida tiene una gran utilidad para la ejecución de medidas preventivas tanto de tratamiento como de control (Méndez-álvarez & Pérez-roth, 2004).

El desarrollo de tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) ha sido fundamental para el avance de la investigación en microbiología. La secuenciación del genoma completo (WGS) ha entrado como una técnica en los laboratorios de investigación y ha sido identificada como una de las técnicas más prometedoras en la microbiología clínica (Bertelli & Greub, 2013) (Tagini & Greub, 2017) . Gracias a la WGS se ha podido ampliar el conocimiento de la variación genética, ensamblados de nuevos genomas y transcriptomas, secuenciación de ARN, identificación de cambios epigenéticos (Yin et al., 2018),e investigación de las propiedades de cepas bacterianas, como la presencia de resistencia a los antibióticos o factores de virulencia (Bertelli & Greub, 2013)

El crecimiento exponencial de los datos de las secuenciaciones de nueva generación ha promovido la creación y la liberación de herramientas para el análisis genómico en los últimos años. En cuanto al análisis bioinformático general para WGS normalmente contiene componentes como preparación de datos, alineación y ensamblaje, llamada de variantes, anotación y por último el análisis(Yin et al., 2018). Particularmente en *P. aeruginosa* los diversos estudios realizados por WGS para identificación de factores de virulencia, han permitido una mejor comprensión de las infecciones agudas y crónicas, ayudando al desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos (Tagini & Greub, 2017).

2: Estado del arte

2.1 *Pseudomonas aeruginosa* en el mundo

En los últimos años, los esfuerzos para las investigaciones de *Pseudomonas aeruginosa* han ido aumentando especialmente con la implementación de nuevas tecnologías como WGS. Si bien, esta bacteria ha sido un blanco para la investigación por su resistencia a múltiples antibióticos, recientemente también se han centrado esfuerzos en la evaluación de sus genes de virulencia, bien sea por métodos convencionales como PCR, donde solo se estudian algunos factores; como también el uso de WGS para caracterizar todos los elementos de virulencia.

Se han reportado varios estudios de factores de virulencia en aislamientos clínicos, tal es el caso del estudio realizado por Subedi *et al*, en el año 2018; donde utilizaron aislamientos clínicos de dos partes biográficas diferentes con dos focos de aislamiento distintos para realizar genómica comparativa, no solo del viruloma, sino también del resistoma (Subedi et al., 2018). Otros han sido los casos donde se utiliza WGS para un solo aislamiento, como fue el caso de Bangladés; donde secuenciaron una cepa multirresistente y también compararon su perfil de virulencia (Subedi et al., 2018)

También se han reportado identificación molecular de genes de virulencia por medio de PCR; como fue el estudio realizado en Irán donde evaluaron los genes oprI, oprL y toxA en 268 aislamientos de *P. aeruginosa* en muestras de quemaduras, heridas e infecciones pulmonares, con el fin de encontrar una relación entre esos factores de virulencia y alguna manifestación clínica en especial. (Aslani et al., 2012). Como el estudio anterior también se han reportado por PCR diferentes perfiles de virulencia en países como Corea, Egipto, Marruecos, México, Perú y Brasil (Luna de Araujo Jacome et al., 2012)(Correa, Yan et al., 2020)(Elmouaden et al., 2019)(González-Olvera et al., 2019).

2.2 *Pseudomonas aeruginosa* en Colombia

En Colombia han sido pocos los estudios que se han realizado para factores de virulencia de *P. aeruginosa* ya que en la última década los esfuerzos han estado dedicados a comprender la resistencia de esta bacteria y encontrar rápidamente la manera adecuada de usar los antibióticos en los pacientes infectados.

En la búsqueda bibliográfica se encontró un estudio que involucra virulencia de *P. aeruginosa* aislada de ambientes clínicos y ambientales del país, este estudio realizado en el 2004 tuvo como objetivo verificar la virulencia de la bacteria sin entrar en detalle en factores de virulencia específicos, probando cinco cepas ambientales y cinco clínicas de *P. aeruginosa* en dos modelos diferentes (*Drosophila melanogaster* y *Lactuca sativavar. Capita L*) (Vives-Flórez & Garnica, 2006).

En el 2018 se realizó una investigación basada en la red metabólica regulada por QS en la PA01, para la producción de la pioverdina un factor de virulencia que pertenece a la familia e los sideróforos; en este trabajo los investigadores buscaron generar la reconstrucción, modelamiento y simulación dinámica de esta red metabólica (Clavijo, 2018).

En el 2020, en Cartagena se analizó la resistencia bacteriana y evaluaron la capacidad productora de biopelículas en aislamientos clínicos y ambientales de la ciudad (Valle, 2020). Por último en el año 2021, realizó una caracterización de los genes PhoQ-PhoP de dos cepas MDR de *P. aeruginosa* haciendo uso de herramientas bioinformáticas (Rodríguez, 2021).

3: Objetivos

Dada la importancia que tiene *P. aeruginosa* en las IAAS, el rol que cumplen los factores de virulencia a la hora de causar la infección, supervivir en el huésped en las primeras etapas, tener una colonización exitosa en diferentes tipos de ambientes y considerando el problema de que a la fecha hay pocos reportes de estudios enfocados en factores de virulencia de aislados clínicos de esta especie bacteriana en Colombia, se ve la necesidad de realizar este estudio de caracterización genómica de factores de virulencia de aislados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de un hospital universitario de alta complejidad de la ciudad de Bogotá.

Para este estudio se establecieron los siguientes objetivos:

3.1 Objetivo general

Caracterizar los perfiles genómicos de virulencia en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de un hospital universitario de Bogotá-Colombia.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Obtener la secuencia del genoma de aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*.
- 2) Identificar los elementos de virulencia presentes en los genomas de los aislamientos en estudio.
- 3) Comparar los elementos de virulencia presentes en los genomas de los diferentes aislamientos.

4: Metodología

4.1 Origen de los aislamientos bacterianos y recolección de los datos clínicos

En un hospital de tercer nivel en la ciudad de Bogotá D.C – Colombia se realizó un estudio prospectivo durante el periodo 2019-2021. Para este trabajo se recolectaron aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de pacientes con colonización y/o con infecciones asociadas a la atención en salud; los cuales aceptaron su participación en el estudio después de una socialización y firma de consentimientos informados (Anexo A “Consentimiento informado”) autorizados por el comité de ética del hospital participante (Proyecto CEI-2019-09-03).

Se obtuvo acceso a las historias clínicas de los pacientes que accedieron a participar y los cuales fueron identificados con un código numérico único; datos sociodemográficos como la edad, sexo y municipio de procedencia, y características clínicas como antecedentes, comorbilidades, hospitalización y uso previos de antimicrobianos; fueron recolectados y analizados desde el ingreso del hospital hasta el deceso o alta de los pacientes (desenlace). Cada ingreso a un servicio se definió como un evento, y para cada evento se analizaron datos como el número de cama o sala, fecha, diagnóstico, dispositivos, microorganismos aislados (los cuales se les asignó un código de identificación) y antibioticoterapia durante la permanencia. (Anexo B “Formato de Seguimiento Epidemiológico”).

Los aislamientos de *P. aeruginosa* se obtuvieron a partir de distintos tipos de muestra en el área de hospitalización, unidad quirúrgica y Unidad de cuidados intensivos (UCI) entre el mes de noviembre de 2019 hasta el mes de marzo de 2021. Para el transporte desde la institución hospitalaria hasta el laboratorio de epidemiología molecular del instituto de biotecnología de la Universidad nacional de Colombia (IBUN), se utilizó el protocolo de recolección, transporte y procesamiento general de aislamientos clínicos (Anexo C).

4.2 Recuperación y preservación de los aislamientos bacterianos

En el laboratorio de Epidemiología molecular se realizó la recuperación de los aislamientos en Agar Nutritivo (crecimiento por 24 horas) y posteriormente en el medio selectivo y diferencial para *P. aeruginosa*, Agar Cetrimide BD Pseudosel Agar (crecimiento por 48 horas). Una vez recuperados los aislamientos fueron criopreservados (por triplicado) y almacenados a -80°C en medio Skim Milk al 10% en el IBUN.

4.3 Extracción de DNA genómico

Después de la recuperación en medio selectivo, colonias bacterianas se sembraron en medio líquido BHI por 14 horas. Una vez se obtuvo el crecimiento deseado (2×10^9) se realizó la extracción del DNA genómico (DNAg) utilizando el kit comercial PureLink® Genomic DNA, siguiendo las instrucciones del fabricante para bacterias Gram negativas (Invitrogen, 2020). La verificación de la calidad y pureza del DNAg obtenido se hizo por espectrofotometría (NanoDrop), donde se evaluó la relación A260/A280 (DNA pureza óptima 1,8 - 2,0) y A260/A230 (DNA pureza óptima 2,0 - 2,2) (ThermoFisher, 2020a). La cuantificación del DNAg se hizo con un equipo Qubit (fluorometría) (ThermoFisher, 2020b), utilizando el Kit comercial Qubit dsDNA BR (Invitrogen, 2022) y la integridad se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1% con condiciones de 87 voltios por 35 – 40 minutos.

4.4 Librerías genómicas

Las librerías genómicas se hicieron por la plataforma Illumina, posteriormente se seleccionaron siete muestras para ser complementadas por la tecnología de secuenciación Oxford Nanopore.

Empleando el Kit comercial Illumina Dna Prep, se realizaron las librerías genómicas según las instrucciones del fabricante (Illumina, 2020b) con los DNAg que cumplieron con las calidades, purezas y cuantificación óptimas;

posteriormente la cuantificación de las librerías se hizo por Qubit 4.0 (Invitrogen), utilizando el kit comercial Qubit Qubit dsDNA HS (Invitrogen, 2022) y se determinó la calidad de las librerías utilizando el Analizador de fragmentos Qseq100 Bioptic (Bioptic, 2016) en donde se obtuvo la distribución y el tamaño de los fragmentos de cada librería. Las librerías fueron normalizadas a una concentración de 4nM y posterior a ellos se hizo un pool de todas las librerías ajustado a una concentración final de 12pM; como control se incluyó la librería de Illumina Phix la cual se encuentra concentrada a 10nM, un tamaño promedio de 500pb y una composición de bases equilibrada (Illumina, 2022).

Las librerías para la secuenciación por Oxford Nanopore se elaboraron basadas en el protocolo para preparación de librerías a partir de DNA genómico, utilizando el kit de ligación SQK-LSK109 y el kit de barcodes EXP-NBD196 (Oxford Nanopore Technologies, 2022a), posterior a la indexación se realizó la ligación del pool de las librerías. Por último la cuantificación del pool de se hizo con por Qubit 4.0 (Invitrogen), utilizando el kit comercial Qubit Qubit dsDNA HS (Invitrogen, 2022).

4.5 Secuenciación

En el área de secuenciación del IBUN, se realizaron las secuenciaciones por la tecnología Illumina y Oxford Nanopore. Para la plataforma Illumina, se utilizó el secuenciador Miseq (Illumina, 2020) en el que se empleó un kit v3 600 ciclos con lecturas pareadas de 300pb. Para la plataforma Oxford Nanopore se utilizó una celda de flujo FLO-MIN111 durante 48 horas en la plataforma MinION Mk1C (Oxford Nanopore Technologies, 2022b).

4.6 Flujo bioinformático

Una vez obtenidos los *reads*, se analizaron con el *Pipeline* diseñado por el Grupo de bioinformática de la Universidad Nacional de Colombia, el cual realizó el ensamblaje, identificación de *contigs* y anotación de los genomas.

Para el análisis de calidad de los *reads* obtenidos por lecturas pareadas de la plataforma Illumina, se utilizó el programa FastQC v0.11.5. (Babraham-Bioinformatics, 2020) ; seguido a esto se filtraron y limpiaron los *reads* con la herramienta Trimmomatic v 0.36 (Bolger et al., 2014) la cual permite la eliminación de adaptadores y de secuencias de baja calidad. Una vez terminado el proceso anteriormente mencionado se realizó una segunda evaluación de la calidad de los *reads* con FastQC v0.11.5.

En el caso de los *reads* obtenidos por la tecnología de Oxford Nanopore, se utilizó la herramienta Guppy v.6.2.7 que permite la “llamada de bases” (Basecalling), el filtrado de *reads* de baja calidad y la eliminación de los adaptadores; al igual que las secuencias obtenidas por Illumina se verificó la calidad con FastQC v0.11.5.

Posteriormente se realizó el ensamblaje *de novo* del genoma completo utilizando la herramienta SPAdes v 3.9 (Bankevich et al., 2012) para las secuencias obtenidas solo con Illumina; para los aislamientos que tenían secuencias por Illumina y Oxford Nanopore se ejecutó un ensamblaje híbrido con Unicycler (Wick et al., 2017) el cual permite la unificación de los *reads* cortos (Illumina) con los *reads* largos (Oxford Nanopore). Con la herramienta QUAST v5.0.2 (Gurevich et al., 2013) se realizó la calidad de los ensamblajes, utilizando como genoma de referencia a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 del NCBI (Centro nacional de información biotecnológica) con Refseq NC_002516.2.

4.7 Genómica comparativa

Se realizó la identificación y comparación de los secuencia tipos con los depositados en la base de datos pubMLST para *P. aeruginosa* (Jolley et al., 2018) usando el software MLST 2.22. (<https://github.com/tseemann/mlst>). En el análisis de MLST se utilizaron 7 secuencias de genes conservados los cuales son empleados para la asignación de los ST, en la bacteria *P. aeruginosa* estos genes son *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA*, y *trpE*.

Para la identificación de los grupos clonales se realizó una alineación de los *reads* con el genoma de referencia y un llamado de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), utilizando Snippy v4.3.6 (Seemann, 2020) un árbol filogenético de máxima probabilidad se infirió a partir del alineamiento múltiple de SNPs en RAxML v8.2.4 (Stamatakis, 2014) y la visualización del árbol y la presencia/ausencia de los genes de virulencia se realizó con la herramienta web iTol (Letunic & Bork, 2021).

4.8 Identificación de elementos de virulencia

Para la identificación de los genes de virulencia se utilizó la base de datos VFDB (Virulence factor data base) (Liu et al., 2019), la cual es específica para genomas bacterianos que producen infecciones en humanos. Esta base tiene un *pipeline* integrado y automático llamado VF-analyzer; el cual identifica sistemáticamente factores de virulencia conocidos y potenciales en genomas bacterianos (completos o de borrador). VF-analyzer tiene como primer paso (i) construir grupos ortólogos dentro del genoma de consulta y genomas de referencia para evitar los falsos positivos debido a genes parálogos, después (ii) realiza búsquedas de similitud de secuencias para identificar factores de virulencia específicos de la cepa y por último por un proceso de refinamiento (iii) especifica los factores de virulencia por grupos de genes (Liu et al., 2019). Por medio de la interfaz web se subieron cada uno de los ensamblajes obtenidos colocando el género bacteriano *Pseudomonas* como referencia, una vez cada trabajo finalizaba se visualizaban los resultados y se descargaron en un archivo .xls.

5: Resultados y Discusión

5.1 Aislamientos bacterianos recolectados

Un total de 54 aislamientos de *P. aeruginosa* provenientes de 37 pacientes fueron recolectados entre el mes de noviembre de 2019 y el mes de marzo de 2021. El número de aislamientos es mayor que el de historias ya que 13 pacientes tuvieron más de un aislamiento. Los aislamientos provenían de diferentes tipos de muestra distribuidas de la siguiente manera: Vías respiratorias (27,80 %), Infecciones del torrente sanguíneo (Bacteriemia) (22,20%), Vías urinarias (16,70%), Piel y tejido (16,70%), asociadas a catéter (9,30%) y otros (7,40%). (Figura 5-1).

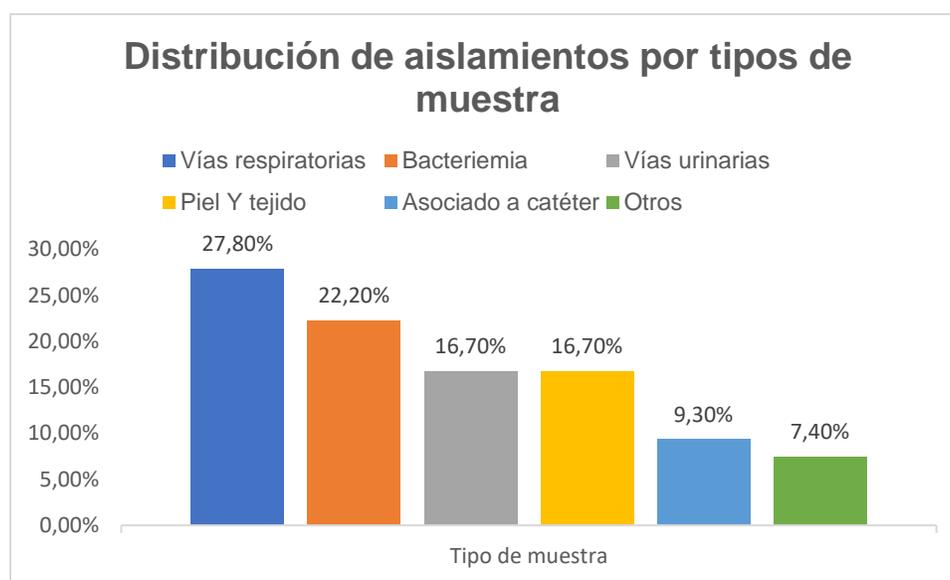


Figura 5-1. Distribución de aislamientos por tipo de muestra

Estos resultados concuerdan con lo encontrado en la literatura, en donde se ha reportado que *P. aeruginosa* es la responsable de muchas infecciones a nivel general, siendo la segunda causa de neumonía nosocomial y la tercera causa de

infecciones urinarias (Paz-Zarza et al., 2019) (Gomila et al., 2018), además de ser una causa grave de infecciones del torrente sanguíneo (Recio et al., 2020).

5.2 Características clínicas y sociodemográficas

Un total de 37 historias clínicas fueron analizadas durante el periodo de noviembre 2019 y marzo 2021; se encontró que el 51% de los pacientes eran hombres y 49% eran mujeres. En cuanto a la edad, en general se encontró que la mayoría estaban entre los 31 y 55 años (Figura 5-2), para las mujeres la media fue de 57 años mientras que la de hombres fue de 55 años.

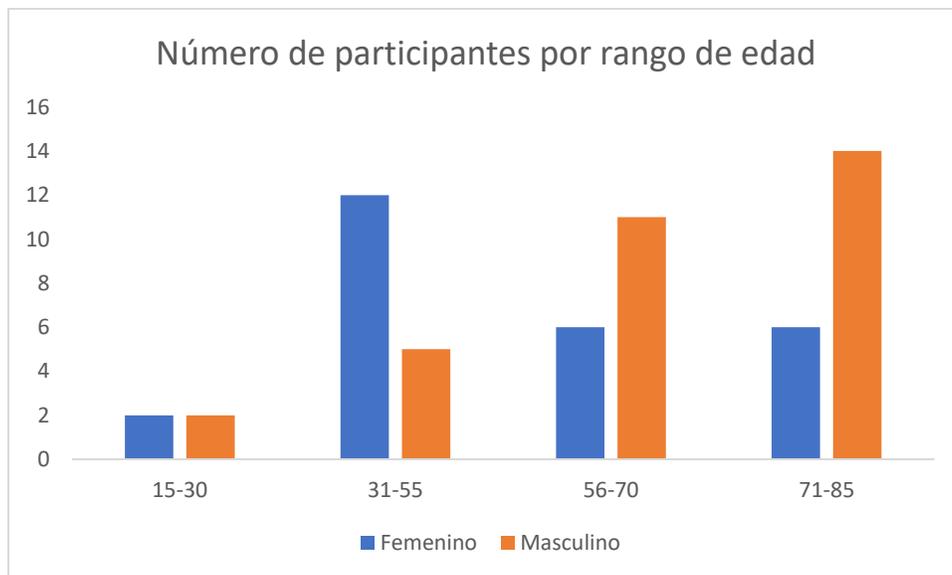


Figura 5-2: Número de participantes por rango de edad

De los 37 participantes al término de este estudio (marzo-2021); el 24,3% habían cursado o estaban cursando una infección por SARS-CoV2; en cuanto al desenlace el 67,6% habían sido dados de alta, mientras que el 29,7 % fallecieron; el 2,7% que corresponde a un paciente seguía activo en alguno de los servicios.

Los aislamientos se obtuvieron de pacientes que estaban internados en hospitalización, UCI y en salas de cirugía. El 50% de los aislamientos de este estudio fueron del servicio de UCI, un 46,3% de hospitalización y un 3,7% fueron aislados de sitio quirúrgico.

De los 54 aislamientos recolectados, 21 fueron descartados como IAAS, 16 fueron IAAS extrainstitucionales y 16 como IAAS institucionales; esta categorización fue realizada por el grupo de Epidemiología, control y prevención de infecciones, de la institución hospitalaria participante. (Figura 5-3)

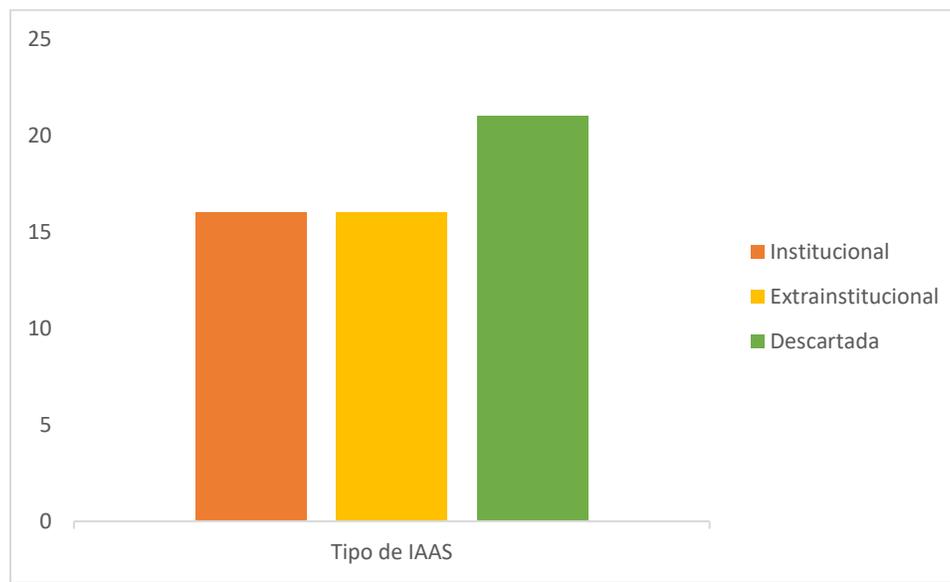


Figura 5-3. Clasificación tipo IAAS

De los 32 confirmados como IAAS (tanto institucionales como extraintitucionales) el 31,25% fueron asociadas a vías respiratorias, 21,8% a piel y tejido, 15,6% asociados a bacteriemia, 12,5% fueron asociados a catéter, 12,5 % a vías urinarias y 6,25% a otros; sin embargo en algunos países como Francia se ha encontrado que las IAAS más comunes son las del tracto urinario , seguido por la neumonía, infección de sitio quirúrgico e infecciones de piel y mucosa (Barahona et al., 2019). En Colombia para el año 2021 el comportamiento de las IAAS según el boletín epidemiológico del Instituto Nacional de Salud, el 2021 fue el año con mayor notificación de brotes de IAAS, desde la creación del sistema de vigilancia; donde *P. aeruginosa* fue el quinto microorganismo causante de brotes y la UCI COVID el servicio con más brotes reportados (Instituto Nacional de Salud, 2021).

Los resultados de este estudio concuerdan con el comportamiento que se ha reportado en estudios previos, ya que las infecciones de vías respiratorias son las

infecciones más frecuentes especialmente en pacientes de UCI (Bhatta et al., 2019), además la especie *P. aeruginosa* es considerada como la bacteria que predomina en las infecciones del tracto respiratorio y es la segunda que más se relaciona con la neumonía asociada a ventilación mecánica (X. Yang et al., 2021).

5.3 Extracción de DNA genómico

Los resultados de la extracción de DNA genómico de los 54 aislamientos de *P. aeruginosa*, estuvieron en los rangos óptimos de cuantificación y de calidad para A260/A280 (1,8 - 2,0) y A260/A230 (2,0 - 2,2) (Anexo D “Resultados extracción DNAg”); con esta calidad se descartó cualquier contaminación de proteínas, fenoles, carbohidratos y sales.

Para verificar la calidad se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % a 87 voltios por 35-40 minutos; en el cual se ajustó el DNA genómico a una concentración final de 50 ng, en donde no se evidenció en ninguna de las bandas signos de contaminación o degradación.

5.4 Librerías y secuenciación

5.4.1 Illumina

Las librerías realizadas por illumina tuvieron concentraciones promedio de 21 ng/uL y un tamaño promedio de fragmentos de 598 pb; con estos resultados posteriormente se realizó la normalización a 4nM para finalmente secuenciar.

Las secuencias obtenidas tuvieron métricas de calidad optimas, el puntaje de calidad o Q-Score (Q30) fue mayor igual a 70% y el rango de clusterización fue de 1200-1400k/mm.

5.4.2 Oxford Nanopore

Los 7 DNAg de los aislamientos seleccionados para secuenciar por esta plataforma, tuvieron una cuantificación del pool posterior a la indexación de 10,4

ng/ul y una vez fue adicionada la mezcla de adaptadores (AMII) la cuantificación final fue de 8,4 ng/uL.

Antes de iniciar la secuenciación, se realizó una verificación del número de pozos de la celda de flujo; en este caso se encontraron 1367 poros disponibles. La cantidad de poros encontrados permitió realizar la secuenciación debido a que por recomendación de fábrica una celda nueva debe de tener como mínimo 800 poros disponibles.

5.5 Características de los genomas

Una vez obtenidas las secuencias, se les realizó la eliminación de adaptadores y el filtrado de secuencias de baja calidad. Posterior a eso se hizo el ensamblaje de los genomas, en este estudio se realizó un ensamblaje *de novo*.

El ensamblaje se realizó con la herramienta SPAdes para las lecturas de Illumina y se utilizaron los tamaños de K-mer sugeridos: 21,33,55,77,99 y 127. Para los 7 genomas secuenciados por ambas plataformas fueron ensamblados con los resultados de las lecturas cortas y las lecturas largas con Unicycler (en las figuras mostradas más adelante estos genomas serán diferenciados por un *). La evaluación por QUAST dio como resultado ensamblajes con un tamaño promedio de 6751292 pb, siendo el genoma más pequeño de 6.223.964 pb y el más grande de 7.513.447 pb. Las profundidades estuvieron entre los 49 X y los 200 X; con una profundidad promedio de 85 X.

El porcentaje de guanina y citosina (%GC) estuvo entre 65.53 % y 66.75 %, el N50 se encontraron valores entre 6.936 y 7.154.863 y el NG50 entre 7.419 y 7.154.863. Los resultados para cada de los genomas se pueden encontrar en el Anexo E “Resultados de la evaluación de los ensamblajes”.

5.6 Análisis de elementos de virulencia y genómica comparativa

En total 54 aislamientos fueron analizados utilizando la herramienta web VFAnalyzer. Fueron encontrados 246 genes de virulencia distintos (Anexo F

“Genes de virulencia encontrados”); los cuales se dividen de la siguiente manera: 81 genes de adherencia, 17 genes de producción de fenacinas, 25 de antifagocitosis, 3 de biosurfactante 5 de enzimas, 41 de toma de hierro, 4 de proteasas, 5 de quorum sensing, 2 de regulación, 51 de sistemas de secreción, 7 de toxinas y 5 de genes que han sido reportados en otros géneros o especies bacterianas y que no cumplen con ninguna de las clasificaciones anteriormente mencionadas. Sin embargo, no todos los genomas tienen la presencia de todos los 246 genes de virulencia, para cada clasificación se pueden observar la presencia o ausencia de los genes para cada aislamiento.

Como se puede observar en la figura 5-4, para los genes de adherencia la gran mayoría están presentes en todos los genomas, a excepción del gen *fimt* y *pilA* que estuvieron ausentes en más de la mitad de los genomas. El gen *pilA* se encontró en el 48,1% de los aislamientos, esto concuerda con otros estudios realizados donde el gen *pilA* se detectó en menos de la mitad de los aislamientos estudiados ; aunque estos estudios detectaron el gen por medio de PCR y no por WGS; en Irán encontraron el gen *pilA* en el 24,7% de los aislamientos (Haghi et al., 2018); mientras que en un estudio realizado por Bogiel y colaboradores en el 2021 reportaron la presencia del gen *pilA* en el 15.9% de sus aislamientos (Bogiel et al., 2021).

Llama la atención los resultados de la presencia en todos los aislamientos el gen *pilB*; debido a que en la revisión bibliográfica no se encontró ningún estudio que reportara su presencia en el 100% de los aislamientos, por el contrario la presencia de este gen se ha reportado en baja proporción; entre el 4,7% y el 33,3% (Haghi et al., 2018), (Liew et al., 2019), (Bogiel et al., 2021), (Bazghandi et al., 2021), (Guo et al., 2022).

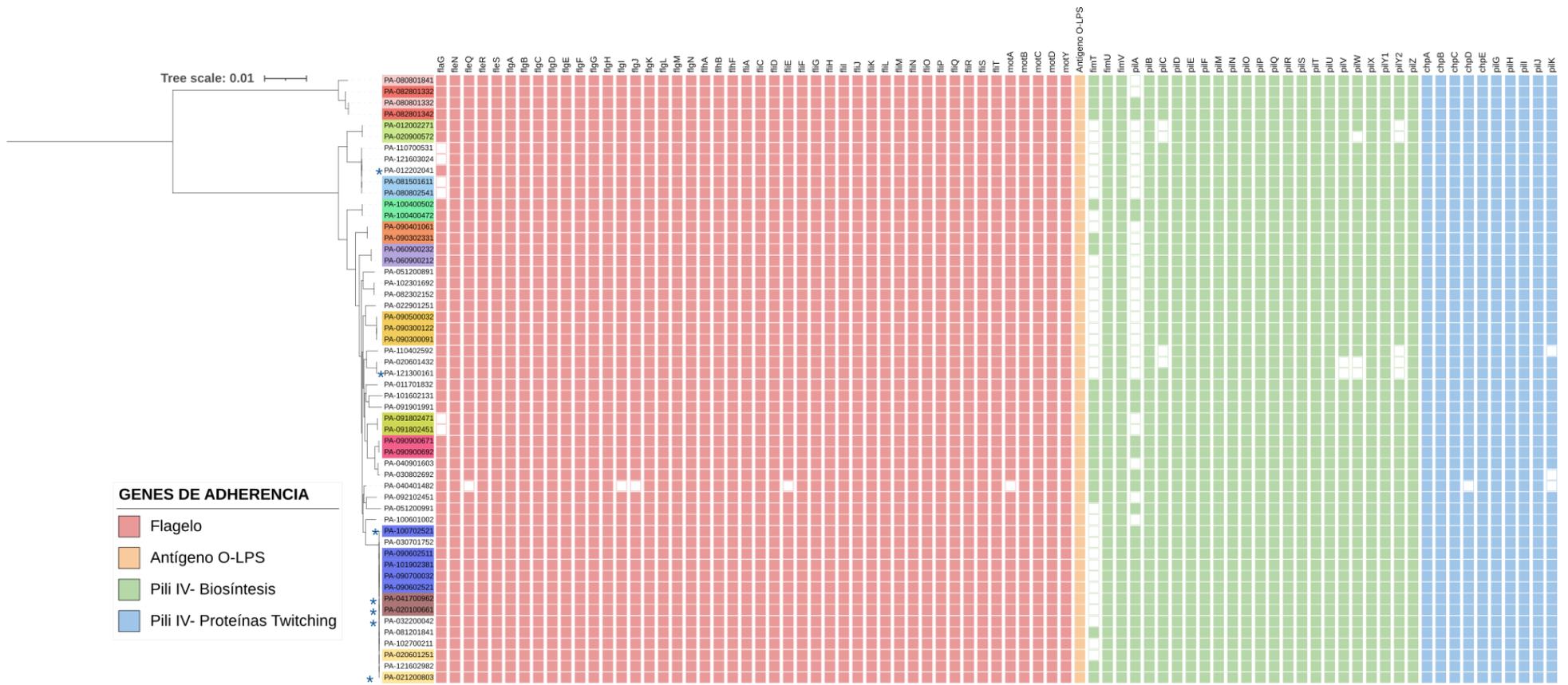


Figura 5-4: Presencia y ausencia de genes de adherencia.

Los sistemas de secreción fueron muy variados (Figura 5-5). Los genes de los sistemas de secreción de hcp estuvieron presentes en todos los genomas; sin embargo, hay una particularidad y es que los primeros 4 genomas que se ven en el árbol tienen ausencia de todos los demás genes de sistemas de secreción, pero presentaron dos genes del TSS3 del género *Vibrio*. La particularidad de este grupo de 4 genomas, coincide con las características de virulencia reportadas para el del *P. aeruginosa* PA7, y es que tal cual como se reportó para este genoma, falta un grupo completo de más de 30 genes que codifican para el TSS3 de esta bacteria y tampoco están ninguno de los genes que codifican los efectores, algo que es poco usual entre las cepas de *P. aeruginosa* (Elbourne et al., 2010).

Para las exotoxinas o también conocidas como efectores, la prevalencia fue para *exoU* de (16,6%), *exoT* (92,5%), *exoS* (79,6%) y *exoY* (88,8%). Respecto a la prevalencia del gen *exoU*, el cual proporciona a la bacteria un papel en la inducción del shock séptico, ya que este efector mata las células epiteliales e inmunitarias del huésped lo cual ayuda a la invasión y diseminación bacteriana es similar a lo reportado en un estudio en Sudan donde lo encontraron en el 24,3% de los aislamientos clínicos estudiados y en Perú donde lo reportaron en el 22,8% de los aislamientos (Horna et al., 2019) (Babour et al., 2020), pero es diferente a lo encontrado en estudios clínicos de Polonia, Egipto y Corea donde la presencia del gen estuvo entre el 50% y el 96,3 % de los aislamientos (Bogiel et al., 2021),(Hassuna et al., 2020),(Park & Koo, 2022).

En cuanto al *exoS*, un gen de virulencia importante en las bacterias que lo tienen, ya que le confiere a la bacteria la oportunidad de obstaculizar el cito esqueleto de actina conduciendo a la muerte celular por apoptosis de las células eucariotas; encontramos una proporción que es mayor a la reportada en Sudan, Corea y Polonia (Babour et al., 2020) (Babour et al., 2020) (Park & Koo, 2022); pero menor a la encontrada por los investigadores de Perú y Brasil donde reportaron una presencia del *exoS* en el 100% de los aislamientos (Horna et al., 2019) (Correa, Yan et al., 2020)

Generalmente, *exoU* y *exoS* son mutuamente excluyentes como lo reportado por Subedi y colaboradores en el 2018 (Subedi et al., 2018); sin embargo, en nuestros resultados se observó que en el 3,7% de los aislamientos hay presencia de ambos genes. Lo cual ya ha sido reportado y estudiado en países de Latinoamérica como Perú, donde se ha encontrado una alta prevalencia de este genotipo *exoU* + y *exoS*+ en aislamientos de *P. aeruginosa* multirresistentes (Horna et al., 2019) y en Brasil donde este genotipo fue encontrado en el 55,6% de los aislamientos, los cuales tenían porcentajes mayores al 50% de resistencia a antibióticos como los carbapenémicos, cefalosporinas y fluoroquinolonas (Correa, Yan et al., 2020).

Para el gen *exoT* los resultados se acercan a lo reportado a nivel general, pues en los demás reportes este gen tuvo presencia en el 100% de los aislamientos, por último el efector *exoY*, al igual que el *exoT* tuvo una prevalencia parecida a lo reportado por los otros estudios donde se encontró entre un 98,3% y un 100% (Horna et al., 2019)(Bogiel et al., 2021)(Park & Koo, 2022).

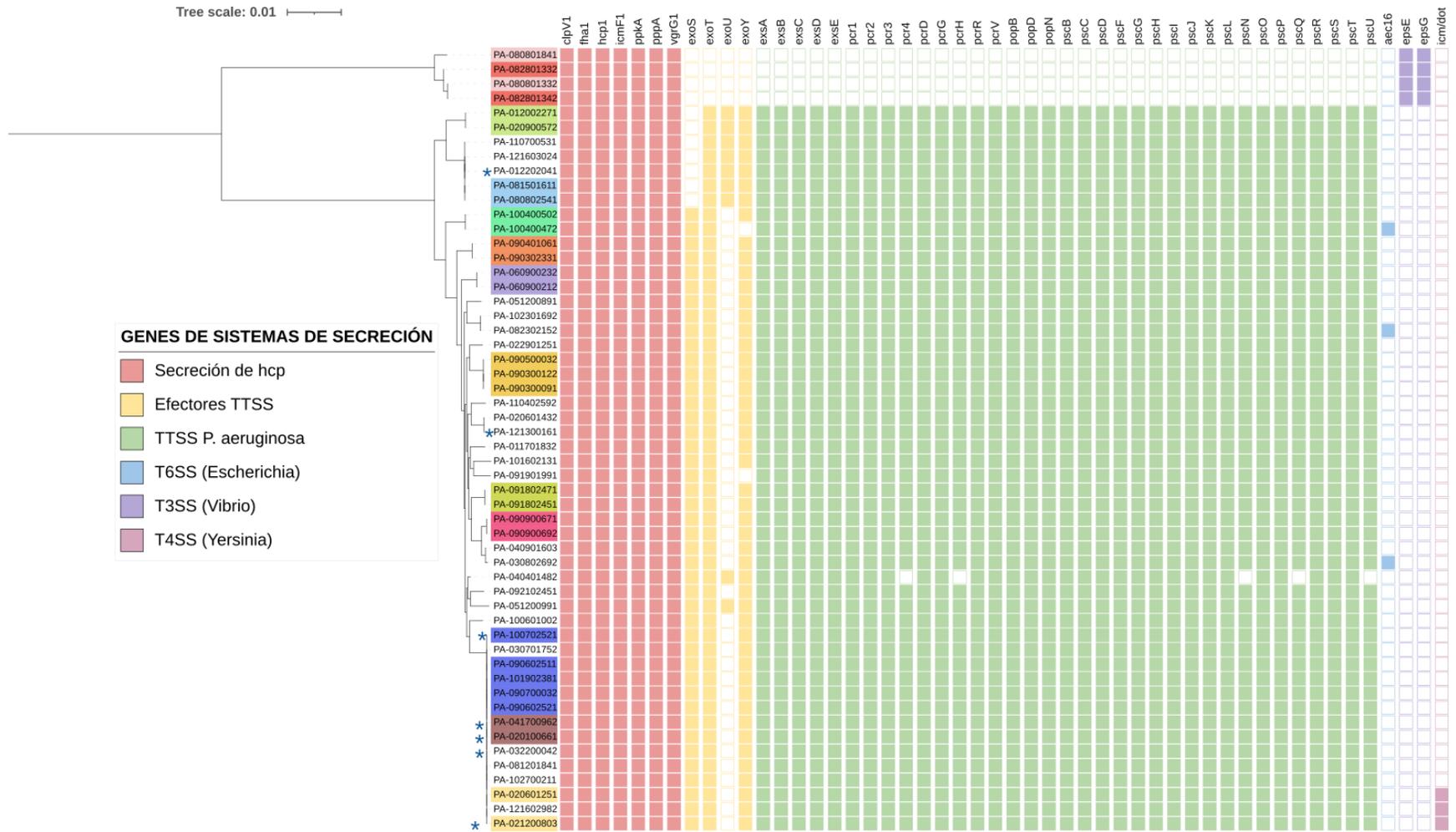


Figura 5-5. Presencia y ausencia de genes de sistemas de secreción

Para los genes de los biosurfactantes (Figura 5-6) se puede ver la particularidad que al igual que con algunos genes de sistema de secreción, el grupo de los primeros 4 genomas hay ausencia del gen *rhIC*, lo cual vuelve a concordar con las características del genoma PA7, dado que se reportó que este gen, el cual codifica para la biosíntesis de ramnolípidos estaba ausente en ese genoma; sin embargo para la PA7 si se reportó la presencia del gen *pclH* lo cual difiere con lo encontrado en este estudio donde hubo un ausencia en estos 4 genomas (Elbourne et al., 2010).

Los ramnolípidos tienen una acción antimicrobiana lo que le proporciona una ventaja a aquellas bacterias que tienen estos genes, ya que excluyen otros microorganismos del nicho colonizado, además ayuda en la motilidad reduciendo la tensión superficial. Por el lado de las enzimas las cuales son importantes en la virulencia de la bacteria porque en general le confieren a esta bacteria la facilidad de causar un fallo sistémico generalizado a causa del incremento en la permeabilidad vascular, encontramos que una de ellas, la fosfolipasa D solo se encontró en 16 genomas (29,6%), en otro estudio en donde se realizó WGS, tampoco fue presente en todos los genomas y se encontró en 13 de 22 aislamientos secuenciados (Subedi et al., 2018), además en un estudio WGS de la cepa multirresistente y productora de biopelícula MZ4A, este gen tampoco fue reportado (Nain & Karim, 2021).

Para dos genomas se reportó la presencia del gen de enolosa de *Streptococcus*, estos dos genomas son de aislamientos que pertenecer a un mismo paciente ;que si bien según su historia clínica no tuvo aislamientos de ninguna bacteria del género *Streptococcus* si tuvo una infección por la bacteria *Klebsiella pneumoniae*. por lo que cabe la posibilidad que se generó alguna contaminación o hubo una transferencia horizontal de genes; sin embargo, con los análisis realizados no se puede confirmar esta hipótesis.

En cuanto a los genes de antifagocitosis entre los cuales se encuentran los relacionados con la biosíntesis y regulación de alginato estuvieron presentes entre un 87% y un 100%. El alginato es uno de los principales componentes que forman

la matriz de la biopelícula que algunas cepas producen y tienen un rol clave en la adherencia de la bacteria (Sultan et al., 2021), la enzima GDP-manosa deshidrogenasa la cual es codificada por el gen *algD* es la enzima principal de tres implicadas en la vía de la biosíntesis del alginato. Se encontró el gen *algD* en el 100% de los aislamientos, esta prevalencia ya ha sido reportada en otras investigaciones como la realizada en Corea en pacientes con infección de vías urinarias (Park & Koo, 2022). Sin embargo Elmouaden y colaboradores en el 2019 utilizaron aislamientos de diferentes infecciones de un laboratorio de microbiología de una institución hospitalaria, y reportaron para el gen *algD* una prevalencia de 87,7% (Elmouaden et al., 2019).

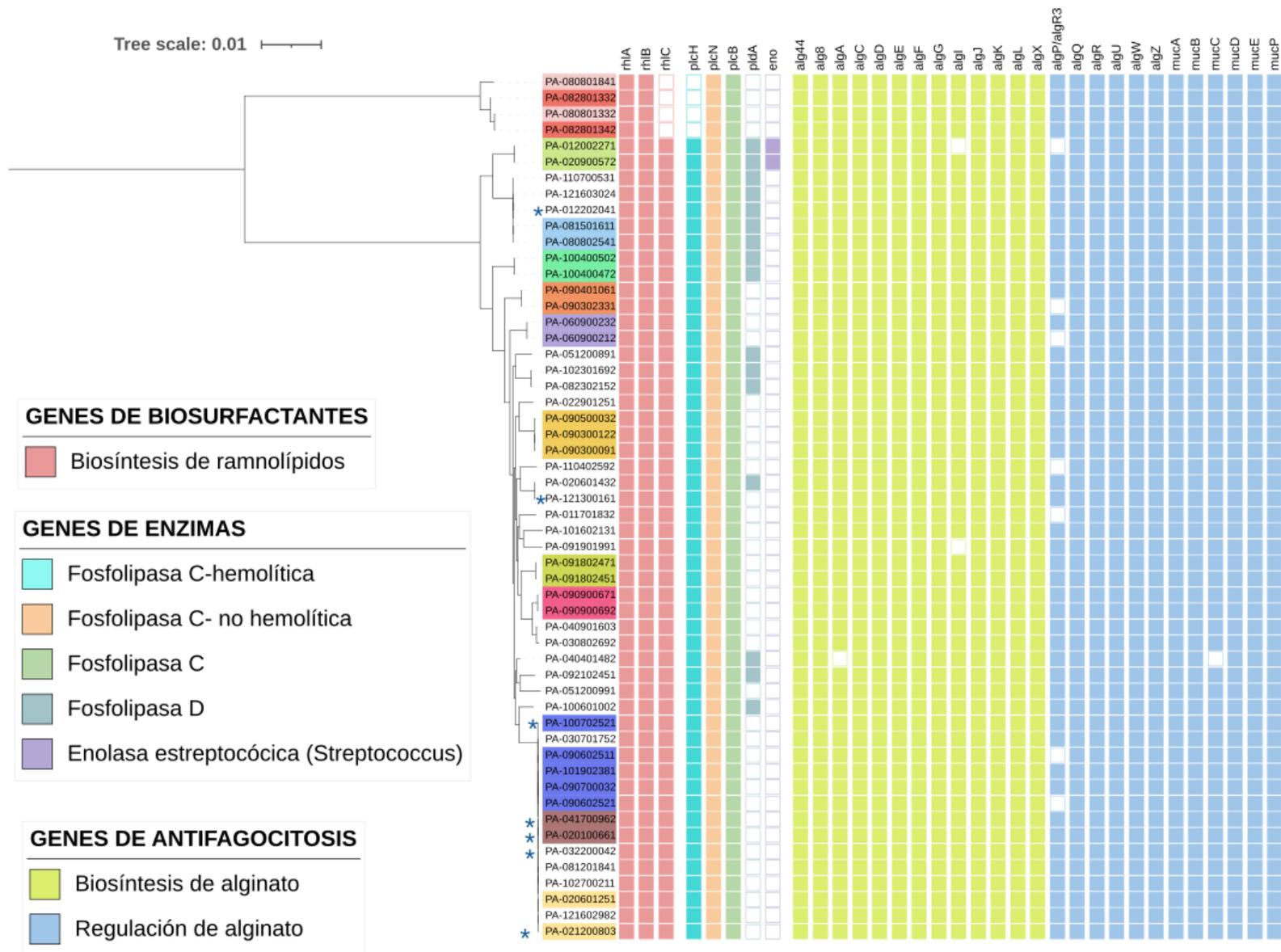


Figura 5-6. Presencia y ausencia de genes Biosurfactantes, Enzimas y anti-fagocitosis

En la figura 5-7 se puede observar que hay presencia de todos los genes de proteasas en el 100 % los genomas, y un 99% de los sistemas de dos componentes. Lo encontrado ya se había reportado en otros estudios de diferentes países , por detección de genes por PCR como *lasB* donde fue encontrado en todos los aislamientos clínicos provenientes de diferentes infecciones (Aslani et al., 2012) (Babour et al., 2020).

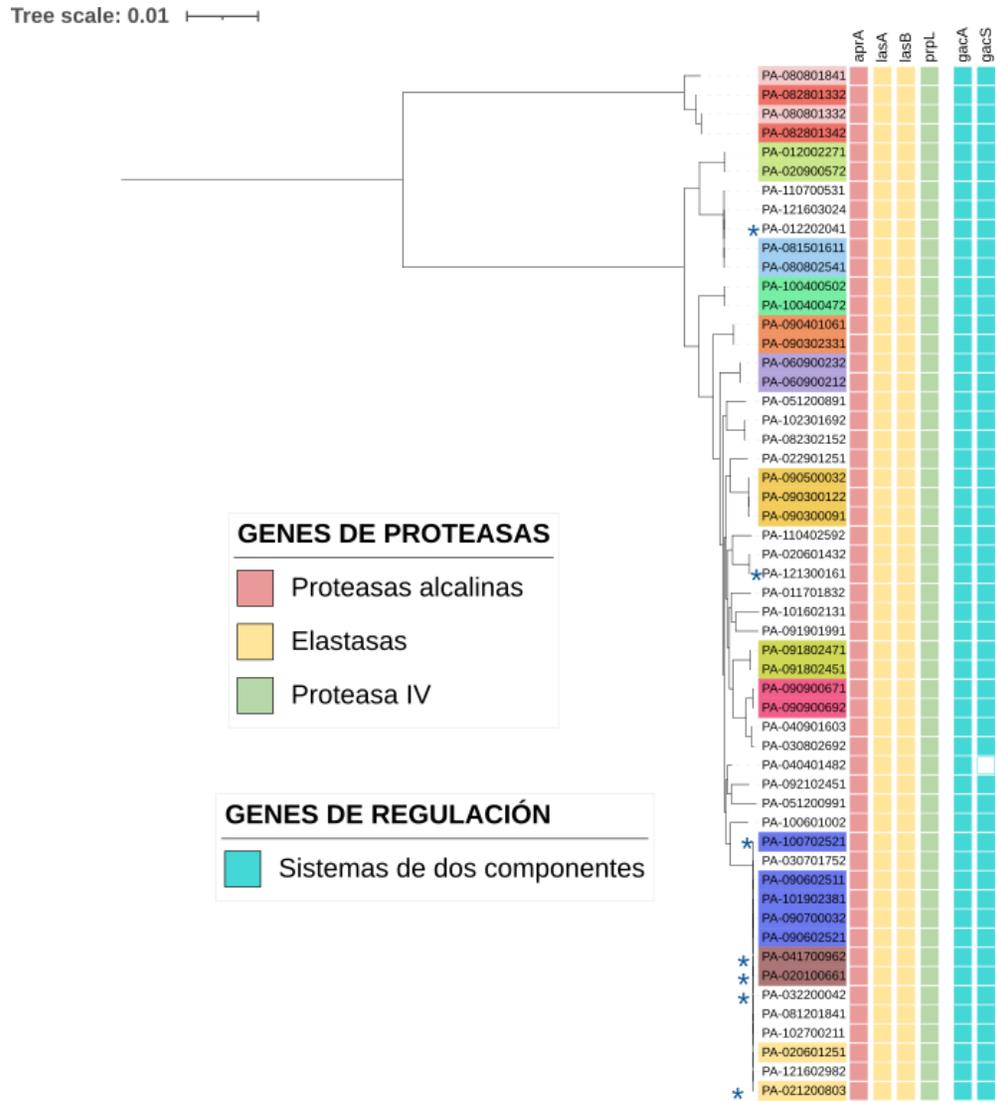


Figura 5-7: Presencia y ausencia de genes de proteasas y regulación

En la figura 5-8 se puede rectificar la importancia del QS en las bacterias un mecanismo basado en la comunicación intercelular que permite la adaptación de una población bacteriana a los cambios micro ambientales, pues todos los genomas tienen presencia de estos genes; llama la atención que en el caso de las exolisinas (un tipo de toxinas) solo se encontró presencia en los primeros 4 genomas; sin embargo se ha reportado que las cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* que carecen de los genes del sistema de secreción de tipo III emplean, las exolisina (ExIA). Esto concuerda con lo encontrado en nuestro grupo atípico donde encontramos la ausencia de los sistemas de secreción y hay presencia de las exolisinas, y le confiere a la bacteria una actividad de formación de poros en las células del huésped que precede a la ruptura de la membrana celular de las células nucleadas; además la *toxA* también se encontró ausente en este grupo y es otra de las características que tiene el genoma PA7 (Elbourne et al., 2010).

En el grupo de las toxinas otro gen en particular que se reportó solo en dos genomas fue la alfa hemolisina de *E. coli*; lo cual hace pensar una contaminación de la muestra o la presencia de este gen gracias a los elementos móviles; sin embargo, de acuerdo con la historia clínica, ninguno de los pacientes tuvo un aislamiento confirmado para *E. coli* durante su estancia en la institución.

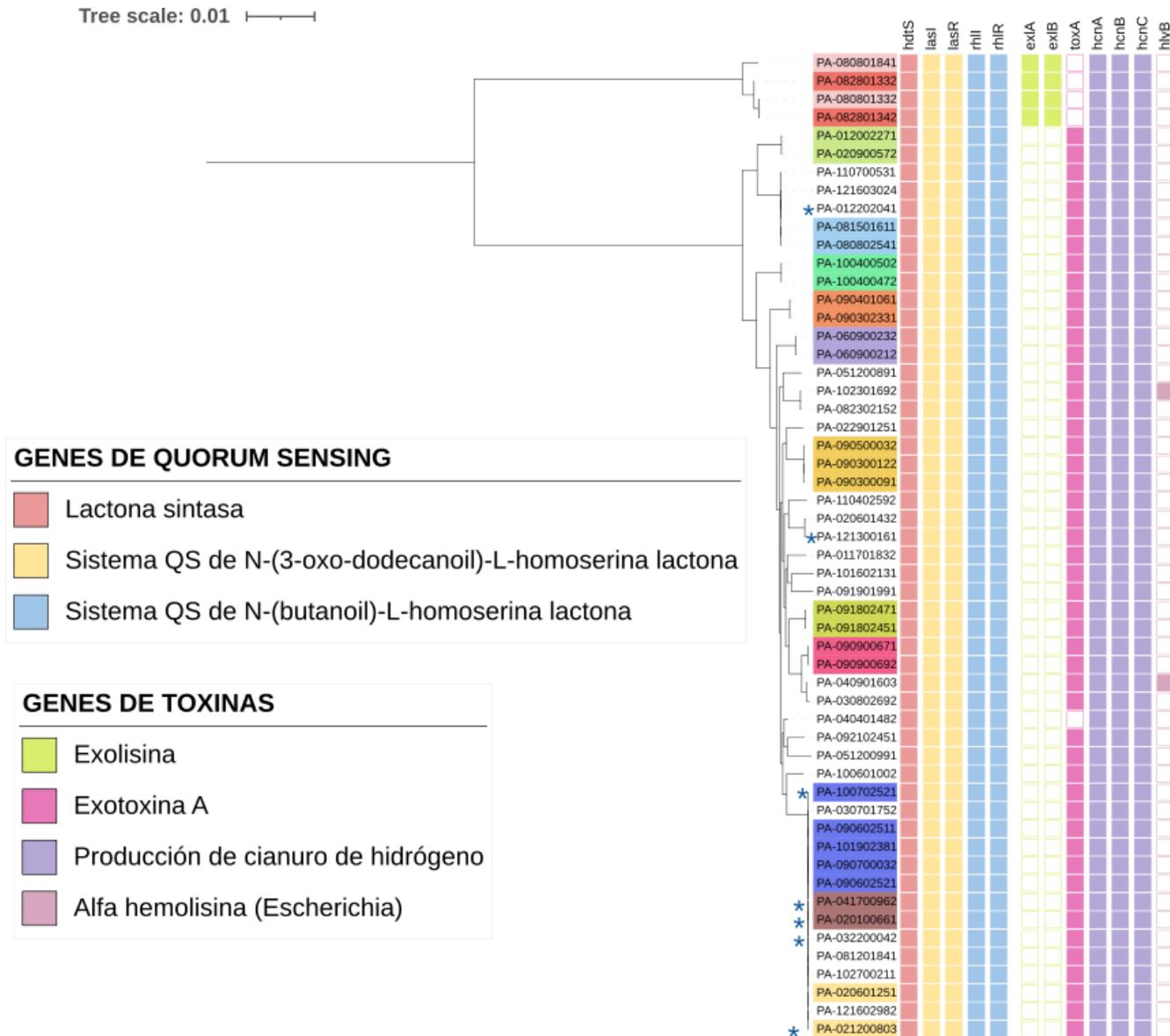


Figura 5-8: Presencia y ausencia de genes de Quorum sensing y toxinas.

En cuanto a los genes de toma de hierro y biosíntesis de fenacinas (Figura 5-9), tenemos los siderofos, dos metabolitos que *P. aeruginosa* secreta para obtener hierro de su entorno; vemos como la piocelina esta presente casi en todos los genomas, mientras que la pioverdina tuvo mayor variabilidad. La producción de estos metabolitos involucra dos operones que impulsan la producción de fenacinas mediante dos enzimas modificadoras PhzM y PhzS. Dado a que hay una alta conservación de la secuencia entre los operones phz1 y phz2 (identidad de nucleótidos > 98 %) se puede observar en la imagen que en la parte de las fenacinas está presente una de las dos variantes del gen. Las fenacinas como factor de virulencia son importantes ya que pueden alterar la función de las células epiteliales del huésped, además pueden actuar como un antibiótico frente a otros microorganismos que compiten por los mismos recursos en el huésped (Higgins et al., 2018).

Por último, se vio en 10 genomas la presencia de al menos un gen que no se encuentra en ninguna de las categorías anteriores pero que se ha reportado en otros géneros o especies bacterianas (Figura 5-10). La presencia de estos genes en los genomas puede deberse a contaminación de los aislamientos, error de la herramienta web o por una posible transferencia de elementos móviles entre las bacterias que están circulando en la institución hospitalaria.

Para el caso de los aislamientos que presentaron proteínas de *Mycobacterium* y *Klebsiella* fueron de un mismo paciente que también tenía una infección confirmada por *Klebsiella pneumoniae* lo que hace pensar que pueda haber pasado por algún elemento móvil este gen asociado a bombas de flujo.

En el caso de los dos aislamientos que presentaron un gen relacionado con el género *Barrotella*, pertenecen a un mismo paciente que si bien tenía también infección por otra bacteria, no era de este género si no por *E. coli*.

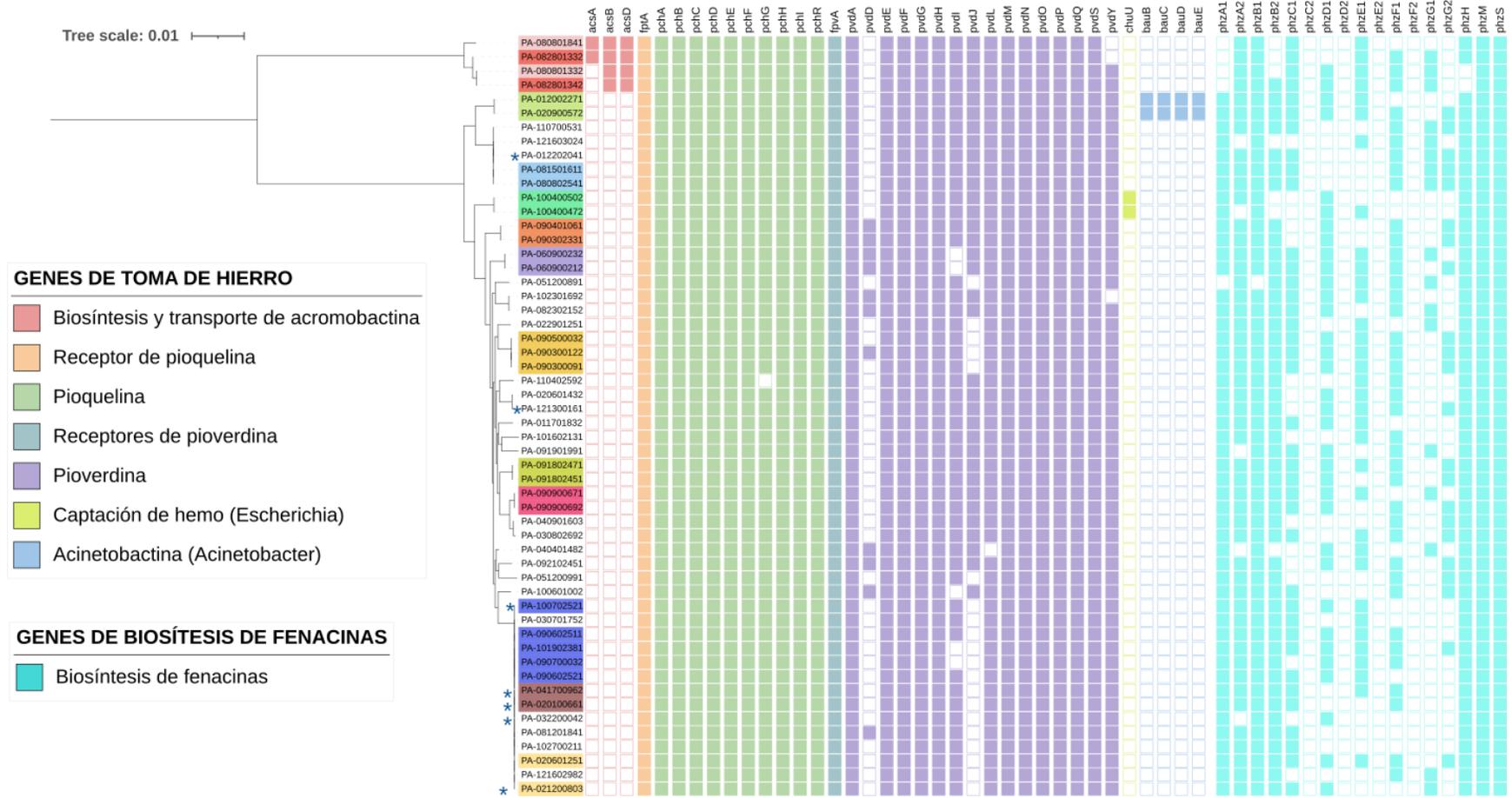


Figura 5-9: Presencia y ausencia de genes de toma de hierro y biosíntesis de fenacinas

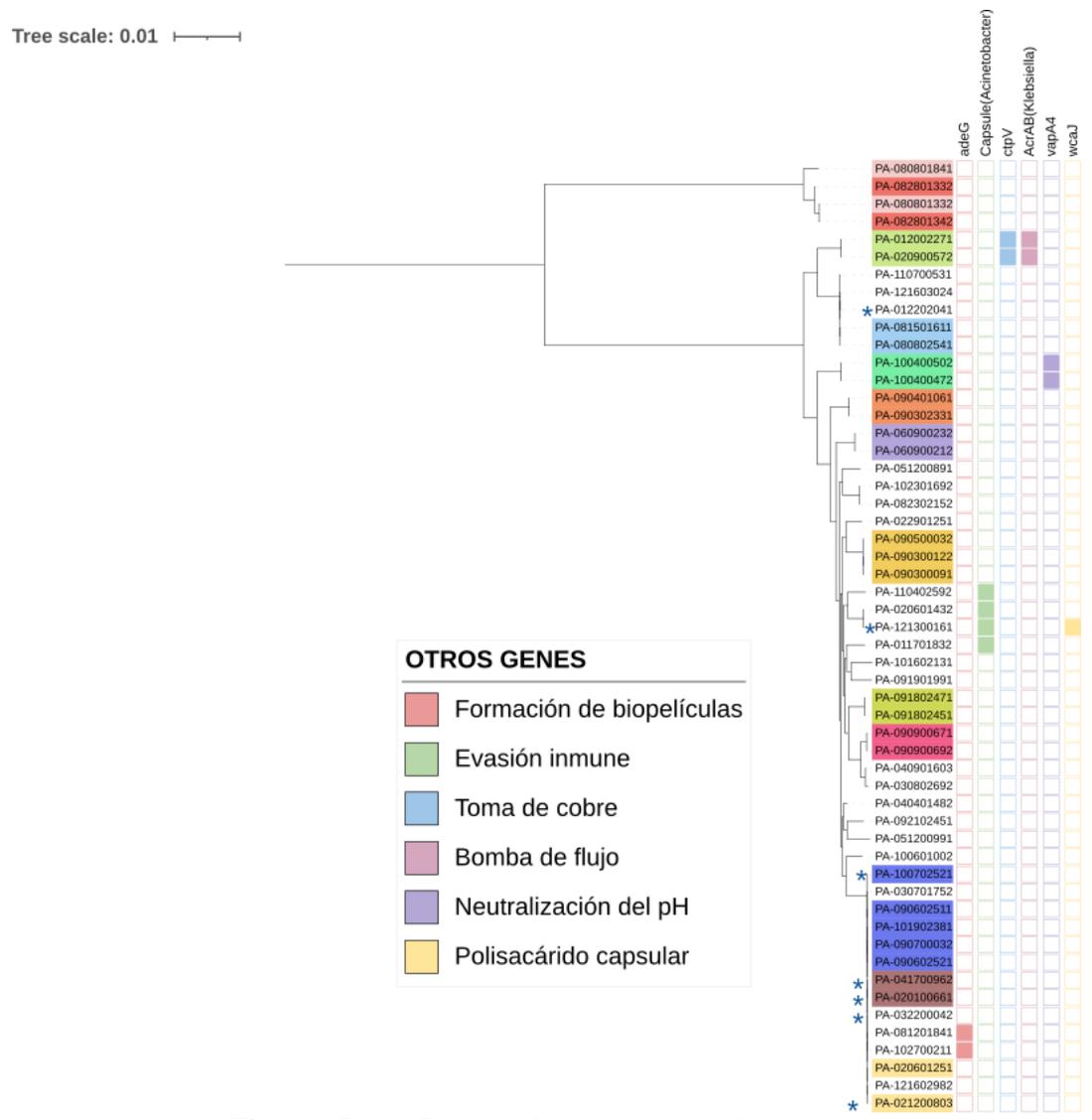


Figura 5-10: Presencia y ausencia de otros genes

La tipificación por medio de MLST dio como resultado 16 secuencio-tipos (ST) en los aislamientos de este estudio (Anexo G “Perfiles alélicos”). Los ST encontrados en este estudio fueron: ST2211, ST357, ST235, ST2148, ST1602, ST244, ST3230, ST603, ST274, ST1290, ST2412, ST179, ST155, ST166, ST3613, ST111 y para 13 aislamientos se detectaron ST nuevos. El ST que tuvo más presencia fue el ST111 en el 25,93% de los aislamientos, seguido por los no determinados con un 24,07% y el ST 235 con 9,26% (Figura 5-11).

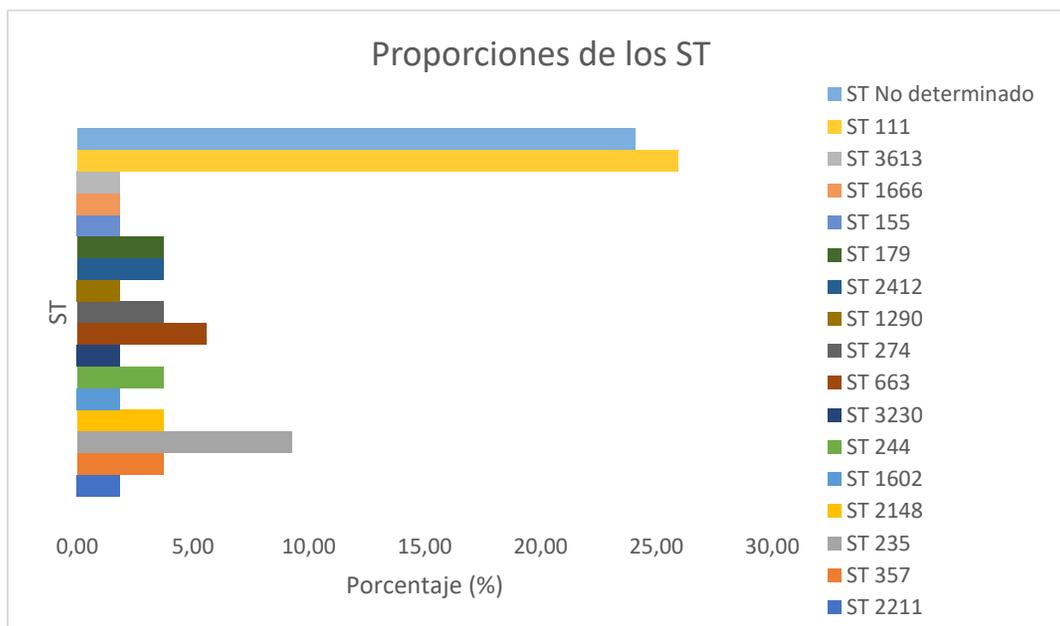


Figura 5-11 Proporciones de los ST encontrados en el estudio

Dentro de este estudio se encontraron varios ST que son considerados de riesgo alto especialmente por su relación con la presencia de genes de resistencia a antibióticos y que son una amenaza para los centros de atención de salud alrededor del mundo por su rápida dispersión ;estos son los ST111, ST235, ST244 y ST357 (Barrio-tofiño et al., 2020).

EL ST235 es el clon más prevalente a nivel internacional y se ha reportado en todos los continentes, además de ser de alto riesgo por estar asociado con mal desenlace clínico en gran parte por la resistencia a múltiples antibióticos (Treepong et al., 2018). Si bien en este estudio no fue el clon más prevalente, se

presentó en 5 aislamientos que corresponden al 9.26% del total; además se ha encontrado que si bien tiene una relación con genes de resistencia, también con genes de virulencia como la exotoxina ExoU (Yoon & Jeong, 2021); lo cual concuerda con este estudio ya que los aislamientos identificados como ST235 cumplen con esta característica (Figura 5-5). Para el caso ST111 es considerado como el segundo clon de alto riesgo más extendido a nivel mundial después del ST235; sin embargo en este estudio fue el más prevalente de todos y además de estar altamente relacionado con los fenotipos MDR/XDR se ha reportado que es un clon que su genotipo es *exoS* positivo (Barrio-tofiño et al., 2020), lo cual concuerda con lo encontrado en este estudio; ya que todos los aislamientos con ST111 tienen la presencia del gen *exoS* (Figura 5-5). En Colombia por medio de estudios de comportamiento microbiológico de mecanismos genéticos en *P. aeruginosa* y estudios con aislamientos resistentes ya se había reportado previamente la presencia del ST235 y del ST111 (Bravo-Ojeda, 2020) (Riaño-Abril, 2016) (Correa et al., 2015).

Adicionalmente se ha empezado a estudiar la relación de los secuencias tipos ST111 y ST235 con la producción de biopelículas en *P. aeruginosa*, Redfern y colaboradores en el 2021 encontraron en aislamientos ST111 Y ST235 varios genes accesorios asociados con una mayor producción de biopelículas (Redfern et al., 2021).

Aunque los Secuencia - tipos generalmente se han relacionado con el resistoma, hay algunos ST que se relacionan más con las características de la virulencia de la bacteria que con la presencia de un gen de resistencia; tal es el caso del ST244 que presenta un genotipo *exoS* positivo y *exoU* negativo (Barrio-tofiño et al., 2020). En este estudio se encontraron dos aislamientos ST244, y los cuales al igual a lo reportado tienen la presencia *exoS* y ausencia de *exoU*; sin embargo, no fueron los únicos con estas características y otros aislamientos con el mismo perfil genotípico *exoS*+ y *exoU*- fueron identificados con otro secuencia tipo, por lo que se puede llegar a pensar que hay otra característica dentro de la virulencia además de estos dos genes que se encuentre relacionada con el ST244.

Otro ST que ha tenido reportes relacionados con virulencia es el ST 357, como fue el caso de un brote en Japón, donde encontraron que un brote del ST357 se relacionaba con la presencia del gen de virulencia *exoU* (Kainuma et al., 2018), si bien los aislamientos de este estudio que se identificaron como ST357 tienen la presencia del gen *exoU*, no fueron los únicos que poseen este gen (Figura 5-5). Si bien no fue el clon que predominó en este estudio, en Latinoamérica se ha reportado en países como Perú que este secuencia tipo es el más encontrado junto al ST111 (Tickler et al., 2022).

Por medio del análisis genómico completo, se encontraron dos grandes grupos de *P. aeruginosa*, uno primer clado que es atípico que se encuentra en una baja frecuencia, es atípico porque solo tiene un 94% de identidad respecto a los genomas de referencia comunes como la PAO1 y un segundo grupo de que tienen más de un 97% de identidad con el genoma de referencia; dentro de este segundo grupo se identificaron relaciones clonales en los 54 aislamientos analizados (figura 5-12), los aislamientos resaltados con el mismo color significan que pertenecen al mismo paciente.

Para el grupo 1 la distancia de SNP estuvo entre 7 y 27; este grupo clonal pertenece al ST de alto riesgo ST235, y se puede llegar a pensar como origen del brote el aislamiento PA-121603024, detectado en un paciente del servicio de UCI en el mes de noviembre de 2019. Posteriormente fue hallado el aislamiento PA-012202041 en enero del año 2020 en un paciente del servicio de hospitalización; sin embargo, ambos pacientes fueron llevados a salas de cirugía y estuvieron en el Quirófano 1. Aunque con los otros tres aislamientos del grupo no se encontró ningún nexo epidemiológico, se observa como el brote se disemina y se mantiene a lo largo del tiempo en los diferentes servicios; ya que estos fueron aislados entre agosto (Hospitalización) y noviembre (UCI) del año 2020 y no tienen en común ninguna cama o quirófano.

Para el grupo 2, la distancia de SNP fue de 89 y es un grupo de dos aislamientos que pertenecen a distintos pacientes y fueron catalogados como ST244. El origen

de brote fue el aislamiento PA-121300161, presentado en un paciente de hospitalización y fue aislado en el mes de diciembre del 2019; sin embargo, este paciente en ese mismo mes estuvo en los quirófanos 1 y 2. Después se encuentra el aislamiento PA- 020601432, aislado en un paciente del servicio de UCI en febrero del 2020; pero adicionalmente este paciente fue llevado al quirófano 1 en el mes de enero; mismo quirófano donde fue llevado el paciente que originó el brote.

Para el grupo clonal 3 que fueron catalogados como ST de algo riesgo ST111, se tienen 14 aislamientos, de los cuales 5 aislamientos son de un mismo paciente. El brote inicio con los aislamientos PA- 020601251 y PA-021200803 que pertenecen al mismo paciente y fueron aislados en el mes de febrero del 2020 en el servicio de UCI, el brote se mantiene incluso hasta el mes de marzo del año 2021 con el aislamiento PA-030701752. Que este brote se haya mantenido por más de 12 meses y en todos los servicios apunta que hay una alta persistencia del ST111 en la institución y que puede mantenerse aun después del corte final de esta investigación.

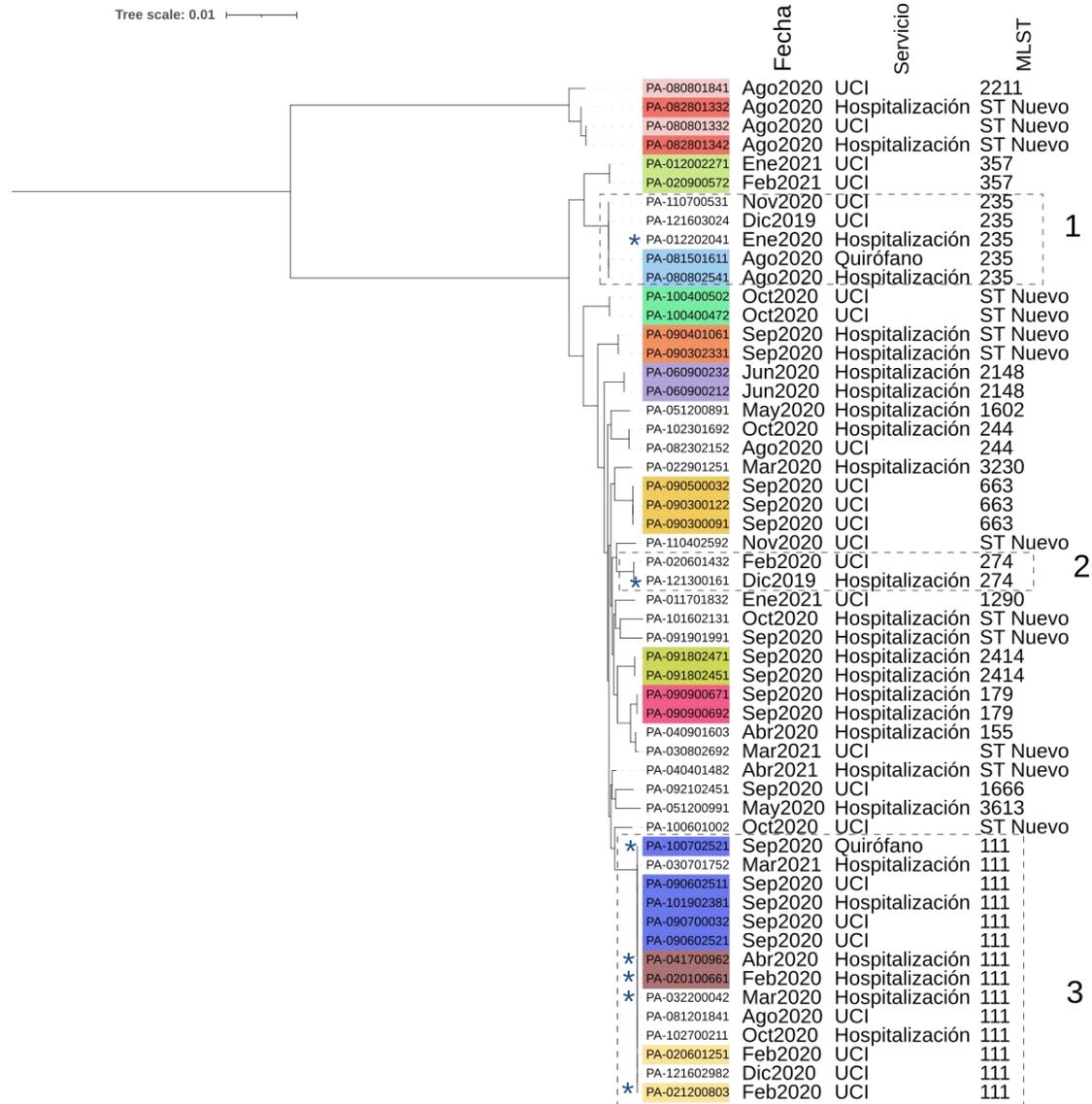


Figura 5-12: Grupos clonales identificados

6: Conclusiones y recomendaciones

El uso de tecnologías como WGS permitió determinar en este estudio el perfil de virulencia de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de un hospital universitario de Bogotá- Colombia durante el periodo 2019-2021, además de determinar el comportamiento clonal que tiene esta bacteria dentro de la institución participante.

Gracias a esta investigación se logró un acercamiento global a los perfiles de virulencia de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* en el país, siendo el primer reporte de la prevalencia de más de 200 genes de virulencia para esta bacteria en Colombia.

Los hallazgos de este estudio evidenciaron un posible core en algunas clases de factores de virulencia (adherencia, antifagocitosis, proteasas, QS, regulación) en los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*.

Se encontraron dos grupos de *P. aeruginosa*, donde se evidenció una diferencia en los perfiles de virulencia de sistemas de secreción y toxinas, lo cual coincide con lo reportado para los genes de virulencia en los genomas de referencia PA7 y PAO1 respectivamente.

Se detectó la circulación del genotipo *exoU* + y *exoS*+, el cual es poco común pero que ya ha sido reportado en otros países de Latinoamérica, especialmente en aislamientos clínicos multirresistentes.

Se hallaron algunos genes de virulencia reportados inicialmente en otros géneros bacterianos, lo que lleva a suponer una posible transferencia horizontal de genes entre las bacterias que circulan en la institución hospitalaria.

Adicionalmente se confirmó la presencia de por lo menos 16 secuencias ya descritas y de las cuales se encuentran varias de alto riesgo ST111, ST235, ST244 y ST357 y de propagación no solo en el país, sino a nivel mundial; asimismo se encontraron 13 ST nuevos y que hace pensar la importancia de seguir realizando estudios epidemiológicos no solo en la institución participante si

no a nivel local, regional y nacional ya que muchos de los aislamientos fueron de pacientes remitidos desde varias partes del país.

Se sugiere en futuros estudio, construir un *pipeline* que permita diferenciar los genes cromosomales y los de plásmidos para genes de virulencia; ya que *P. aeruginosa* posee un genoma accesorio donde no solo se encuentran genes de resistencia sino también de virulencia, lo que lo hace un genoma variable en tamaño; además ayudaría a concluir si los genes encontrados en este estudio que pertenecen a otro género bacteriano se debió a contaminación o efectivamente son genes presentes por elementos móviles.

Se recomienda incluir aislamientos de más instituciones hospitalarias de Bogotá y de otras ciudades del país para aumentar el conocimiento y tener información más precisa sobre la variación de los perfiles de virulencia de esta especie bacteriana.

Para futuros estudios sería de gran utilidad comparar el perfil de virulencia con el de resistencia de los aislamientos, debido a que muchos comportamientos de resistencia a antibióticos reportados en la literatura están relacionados con los genotipos de virulencia, en particular con la presencia y/o ausencia de los efectores *exoU* y *exoS*.

Dado el contexto de pandemia en el que se desarrolló esta investigación, sería pertinente realizar estudios en el futuro donde se compare los perfiles de virulencia de aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* en pacientes co-infectados con SARS-CoV2 y pacientes sin la infección viral.

Por último, se sugiere hacer de manera continua los estudios genómicos de los perfiles de virulencia de aislamientos clínicos *P. aeruginosa* en el país, ya que son genes claves para el éxito de colonización de la bacteria en el huésped y de producir una infección grave.

7: Anexos

Anexo A: Consentimiento informado

Diagnóstico molecular de resistencia, virulencia y seguimiento epidemiológico de bacterias Gram negativas multirresistentes causantes de IAAS, basado en secuenciación de genoma completo (WGS) y datos sociodemográficos y clínicos

Investigador principal: PhD. Emiliano Barreto Hernández

Código: _____

Iniciales del paciente _____ C.C. _____

INFORMACION PARA EL PACIENTE

Objetivo: realizar el diagnóstico molecular y el seguimiento epidemiológico de la resistencia y la virulencia de bacterias Gram negativas multirresistentes causantes de IAAS, a través de la implementación de una plataforma de secuenciación de genoma completo.

Justificación: mediante este formato se solicita su colaboración para participar en una investigación que tiene como objetivo realizar el diagnóstico molecular y el seguimiento epidemiológico de la resistencia y la virulencia de bacterias Gram negativas multirresistentes.

El estudio permitirá conocer los patrones de resistencia y virulencia de los microorganismos causantes de infecciones asociadas a la atención en salud.

SU PARTICIPACIÓN ES ABSOLUTAMENTE VOLUNTARIA Y NO AFECTARÁ SU ATENCIÓN MÉDICA

Procedimientos del estudio: para este estudio no se realizarán procedimientos o toma de muestras adicionales a las que su médico tratante ha ordenado. Los datos que queremos generar serán obtenidos mediante estudios que se realizarán a la(s) bacteria(s) obtenida(s) de los cultivos realizados durante la permanencia en esta institución y de la información que se encuentra en su historia clínica. Debido a lo anterior, si acepta participar en este estudio, NO será sometido intervenciones invasivas o mínimamente invasivas adicionales a las que recibiría si no acepta participar.

Su participación inicia a partir de la firma del presente consentimiento informado, en donde se autoriza el uso del microorganismo(s) aislado(s) a partir de cultivo(s), durante los 36 meses previstos para la realización del presente proyecto.

La(s) bacteria(s) obtenida(s) de cultivo(s) que será(n) utilizada(s) en esta investigación, se conservará(n) y almacenará(n) en el cepario del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia por dos métodos: congelación a -80°C y liofilización.

Beneficios

La participación en este estudio no plantea ningún riesgo presente o a futuro para usted.

Confidencialidad

Solo el investigador principal y sus colaboradores sabrán que usted está participando en el estudio. Los registros que se hagan se harán identificándolo sólo con un código y no con el nombre. En caso de publicación de los resultados de este estudio, usted no será identificado por el nombre.

CONSENTIMIENTO INFORMADO	
VERSIÓN 01	
FECHA: 30-Agosto-2019	
Página: 1	
CONFIDENCIAL	COMITÉ DE ÉTICA

Contacto: preguntas, aclaraciones e información adicional

En caso de dudas, preguntas o requerir aclaraciones, consultar con Mónica Rocío Aguilera Lozano líder de Epidemiología Área de Calidad, Corporación SALUDUN- Hospital Universitario Nacional, al teléfono 3904888 ext 12621 o al correo electrónico: monica.aguilera@hun.edu.co.

CONSENTIMIENTO

Para la realización de este estudio, permito el acceso al personal médico autorizado del Hospital Universitario Nacional de Colombia y a los investigadores de la Universidad Nacional de Colombia, adscritos al proyecto de investigación; a la recolección y análisis de la(s) bacteria(s) aisladas a partir de cultivo(s) y a la información clínica necesaria para el cumplimiento de los objetivos de este proyecto de investigación.

Autorizo informar los resultados clínicos de este estudio a las instituciones científicas designadas por los investigadores del proyecto y a las entidades que participen en esta investigación, para que los resultados se publiquen o se presenten en revistas de científicas y en congresos académicos, siempre y cuando se conserve la absoluta confidencialidad de mi nombre y datos personales.

Después de haber leído y entendido lo anterior, acepto voluntariamente participar en el estudio, firmando este formulario de consentimiento informado.

ACEPTO PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO: SI _____ NO _____

Iniciales del paciente

Firma del paciente y/o huella

Documento de Identidad

Fecha

Nombre del testigo

Firma y C.C. del testigo

Teléfono y dirección

Parentesco

Persona que dirige el consentimiento informado

Firma y C.C

CONSENTIMIENTO INFORMADO
VERSIÓN 01
FECHA: 30-Agosto-2019
Página: 1
CONFIDENCIAL

COMITÉ DE ÉTICA

Anexo B: Formato de seguimiento epidemiológico

 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE BOGOTÁ	FORMATO DE SEGUIMIENTO EPIDEMIOLÓGICO
--	--

INFORMACIÓN PACIENTE	
Código interno del paciente	
Nombres	
Apellidos	
Tipo de identificación	
N.º de identificación	
Sexo biológico	Masculino <input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Sin determinar <input type="checkbox"/>
Fecha de nacimiento (DD/MM/AA)	
Municipio de procedencia	
Departamento de procedencia	

DATOS ESTANCIA HOSPITALARIA	
Fecha de ingreso al hospital (DD/MM/AA)	
Hospital	
Ciudad	

DATOS REMISIÓN				
Hospitalización previa (Últimos 3 a 6 meses)		SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		
Institución de remisión				
Ciudad				
Fecha de remisión (DD/MM/AA)				
Tiempo en el sitio de remisión (días)				
Dispositivos reportados (Sitio de remisión)				
Antibioticoterapia (Durante la estancia en el sitio de remisión)				
Uso de antimicrobianos a nivel intrahospitalario		SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		
Antibiótico	Dosis	Vía de administración	Inicio (DD/MM/AA)	Finalización (DD/MM/AA)
Pruebas/exámenes de laboratorio				
Examen realizado	Fecha (DD/MM/AA)	Resultado		
Reporte de IAAS				
Fecha de reporte de IAAS:				
Tipo de IAAS:				
Datos adicionales				



FORMATO DE SEGUIMIENTO EPIDEMIOLÓGICO

EVENTO				
N.º Evento				
Servicio				
N.º Cama o Sala				
Fecha de ingreso (DD/MM/AA)				
Diagnóstico de ingreso al servicio				
Dispositivos				
Dispositivos		Fecha de colocación (DD/MM/AA)	Fecha de retiro DD/MM/AA	
Procedimientos				
Procedimiento		Sala/Quirófano	Fecha	
Antibioticoterapia				
Antibiótico	Dosis	Vía de administración	Inicio (DD/MM/AA)	Finalización (DD/MM/AA)
Muestras				
Tipo de muestra	Fecha de recepción laboratorio (DD/MM/AA)	Fecha de resultado (DD/MM/AA)	Resultado	Código aislamiento
Sangre _____				
Orina _____				
Secreción de herida _____				
Espudo _____				
Lavado bronco alveolar _____				
S. traqueal _____				
LCR _____				
Piel y tejidos blandos _____				
Otro _____				
¿Otro? _____				
Sangre _____				
Orina _____				
Secreción de herida _____				
Espudo _____				
Lavado bronco alveolar _____				
S. traqueal _____				
LCR _____				
Piel y tejidos blandos _____				
Otro _____				
¿Otro? _____				
Reporte de IAAS				
Fecha de reporte de IAAS:				
Tipo de IAAS:				
Datos de egreso del servicio				
Fecha de salida (DD/MM/AA)				
Motivo de egreso del servicio				

Anexo C: Protocolo de recolección, transporte y procesamiento general de aislamientos clínicos en el Laboratorio de Epidemiología Molecular

Laboratorio de Epidemiología Molecular Universidad Nacional de Colombia	RECOLECCIÓN, TRANSPORTE Y PROCESAMIENTO GENERAL DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS	Fecha: 30/08/2019
		Edición N°1

RECOLECCIÓN, TRANSPORTE Y PROCESAMIENTO GENERAL DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS EN EL LABORATORIO DE EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR (IBUN)

Este documento es propiedad del Laboratorio de Epidemiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá). La información en el contenido no podrá reproducirse total ni parcialmente.

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este documento es establecer las directrices para asegurar la calidad de los aislados clínicos, partiendo desde la recolección, hasta la llegada de las cepas al laboratorio.

2. FUNDAMENTO

Para la obtención de resultados óptimos en el laboratorio, se debe partir de la calidad de los aislamientos; es decir, la correcta recolección, rotulación, embalaje, verificación y transporte al laboratorio en las condiciones adecuadas para los estudios que se requieran.

3. RECOLECCIÓN DE LOS AISLAMIENTOS CLÍNICOS

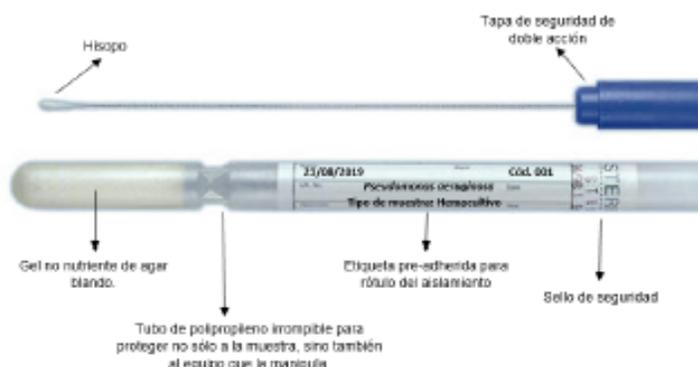
Las muestras provenientes de pacientes que cumplan los criterios de inclusión definidos en el protocolo, serán remitidas al laboratorio de Epidemiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, previo diligenciamiento del consentimiento informado, formato de identificación de los aislamientos y anexando el reporte del equipo automatizado.

Para que la recolección de los aislamientos sea realizada de forma adecuada evitando la contaminación, es indispensable que siga las siguientes instrucciones:

3.1. A partir de un cultivo puro del microorganismo, resiembre en forma masiva el aislamiento en un medio primario (BHI, Agar Sangre ó tripticasa de soya) incúbelo por 24 horas a temperatura de 35°C.

3.2. Abra el empaque del medio de transporte en condiciones asépticas y márkelo, indicando fecha, tipo de muestra, género / especie del microorganismo y código de la muestra (Esto se registrá a las normas internas del Hospital Universitario Nacional). (Ver Fig. 1 "Características del medio de transporte y rotulación")

Fig. 1 Características del medio de transporte y rotulación



Laboratorio de Epidemiología Molecular Universidad Nacional de Colombia	RECOLECCIÓN, TRANSPORTE Y PROCESAMIENTO GENERAL DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS	Fecha: 30/08/2019
		Edición N°1

3.3. En cabina de flujo laminar, recoja la totalidad del aislamiento de la caja de petri con el escobillón estéril del medio de transporte e introdúzcalo en el medio, asegurándose de que quede totalmente sellado.

3.4. El medio de transporte debe mantenerse a temperatura ambiente en un lugar limpio y seco.

4. TRANSPORTE

- Introducir el aislamiento en el empaque absorbente que tiene la capacidad de tres medios de transporte (encontrará dos empaques absorbentes con capacidad de 6 medios de transporte).



- Luego introduzca el empaque absorbente dentro de la bolsa plástica y proceda a sellarla desprendiendo la cinta adhesiva y volteando hacia adentro la bolsa de plástico de manera que quede completamente sellado.



Laboratorio de Epidemiología Molecular Universidad Nacional de Colombia	RECOLECCIÓN, TRANSPORTE Y PROCESAMIENTO GENERAL DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS	Fecha: 30/08/2019
		Edición N°1

- Coloque la bolsa dentro de la caja de plástico, cierre la tapa y coloque la etiqueta para asegurar que no quede abierta.



- Introducir en el sobre de manila de burbujas la caja con los aislamientos, el formato de identificación de los aislamientos y el reporte del equipo automatizado. Selle el sobre.



El envío al laboratorio debe ser lo más rápido posible con objeto de asegurar la supervivencia de microorganismos de difícil crecimiento. Cuando tenga listo el envío, favor comunicarse al Grupo Laboratorio de Epidemiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia para programar la recogida del paquete, Tel 3165000 ext 16976 o Cel.3108548560.

5. PROCESAMIENTO

En el Laboratorio de Epidemiología Molecular, en condiciones de asepsia y haciendo uso de la cabina de bioseguridad, se procederá a Inoculación de la muestra en los medios de cultivo correspondientes para su recuperación.

6. CONSERVACION

Una vez recuperados los microorganismos, se verificará la pureza de los aislamientos y serán preservados por dos métodos: congelación a -80°C y liofilización, para ser almacenados en el cepario del Laboratorio de Epidemiología Molecular.

Anexo D: Resultados calidad, pureza y cuantificación DNAG

Identificación del aislamiento	Qubit Concentración ng/μL	NanoDrop		
		Concentración ng/μL	A260/A280	A260/A230
PA-121602982	12,7	24,3	2,02	2,05
PA-040401482	16,7	44,3	2,01	2,19
PA-092102451	18,4	51,2	1,95	2,11
PA- 110402592	20,9	40,3	1,95	2
PA-091901991	22,9	33,7	1,82	2
PA-121603024	26,21	58,7	1,95	2,24
PA-032200042	26,32	39,9	1,87	1,99
PA-021200803	26,45	53,1	1,9	2,01
PA-030802692	26,8	25	1,94	1,82
PA-102301692	29	30,6	1,88	1,91
PA-022901251	29,81	48,4	1,91	2,12
PA-040901603	30,29	67,2	1,99	2,06
PA-041700962	34,41	46,6	1,88	2,02
PA- 102700211	35,8	58,6	1,87	1,98
PA-020601432	36,24	77,1	1,93	2,07
PA-020100661	37,86	70,1	1,95	2,25
PA-011701832	38,2	64,4	1,91	1,5
PA-060900232	42,9	56,2	1,93	1,98
PA-100702521	43,3	48	1,98	2
PA-101902381	43,7	129	1,9	1,95
PA-051200991	44,3	80,2	1,91	2,71
PA-101602131	48,7	74,3	1,98	2,2
PA-012202041	49,81	68	1,9	2
PA-020601251	52,91	88	1,93	2,08
PA-051200891	53,9	72,3	1,88	2,27
PA-121300161	54,68	168,5	2	2,09
PA-110700531	60,4	95,3	1,88	2,24
PA-100601002	62,1	44,7	1,85	2,1
PA-012002271	68,7	259,3	1,93	1,95
PA-090900692	69,2	85,1	1,91	2,48
PA-100400502	72	58,4	1,82	1,95
PA-091802471	76,6	81,7	1,86	2,2
PA- 020900572	76,6	256,6	2,02	2,02
PA-080801841	81	129,7	1,91	2,34
PA-090302331	81,1	89,9	1,87	1,98
PA-090300122	120	134,7	1,91	2,47
PA-090602511	131	149,7	1,91	2,23

PA-090401061	136	131,5	1,87	2,32
PA-081201841	140	147	1,91	1,91
PA-090500032	140	141,1	1,89	2,37
PA-082801332	150	149,9	1,9	2,31
PA-082302152	167,1	160	2,14	1,98
PA-090700032	180	188,4	1,88	2,1
PA-090300091	186	175,1	1,86	1,99
PA- 030701752	208	179,8	1,89	2,1
PA-080802541	209	189,2	1,88	2,24
PA-081501611	209	274,6	1,88	1,98
PA-090602521	248	267,3	1,89	2,09
PA-080801332	318	689,9	1,92	2,25

Anexo E: Resultados evaluación de los ensamblajes

CODIGO AISLAMIENTO	PROFUNDIDAD DEL ENSAMBLAJE	NÚMERO DE CONTIGS	TAMAÑO DEL GENOMA	%GC	N50	NG50	L50	LG50	OBSERVACIONES
PA-040401482	66 X	1385	6677901	65.94	6936	7419	279	250	
PA-030802692	81 X	231	6413209	66.35	54562	54763	32	31	
PA-121602982	52 X	307	7259733	66.53	46169	55245	43	33	
PA-012002271	75 X	257	7035581	65.85	58219	66483	36	29	
PA-091901991	85 X	207	6770923	66.04	70550	80879	26	22	
PA-110402592	105 X	150	6228048	66.54	101178	101178	18	18	
PA-090900692	59 X	116	7483357	65.53	141218	165190	19	15	
PA-090900671	64 X	120	7479980	65.53	141218	165626	19	16	
PA-081501611	67 X	78	6862475	65.99	187816	198314	12	10	
PA-080801841	74 X	57	6333055	66.63	202515	202515	9	9	
PA-080802541	83 X	81	6862962	65.99	188492	218325	12	10	
PA-121603024	65 X	82	6867294	65.99	212358	226695	12	10	
PA-110700531	119 X	79	6885513	65.94	235482	241200	10	9	
PA-051200891	60 X	51	6428922	66.35	232250	243005	9	8	
PA-100400502	159 X	43	6743962	66.24	247368	260820	8	7	
PA-090602511	65 X	75	7071814	65.80	244025	265958	11	9	
PA-030701752	61 X	75	7072729	65.80	252340	265958	10	9	
PA-100601002	60 X	57	6483314	66.20	265163	267060	9	8	
PA-102301692	130 X	50	6633844	66.13	265095	274672	8	7	
PA-082801332	71 X	51	6333464	66.64	245467	275142	8	7	
PA-101902381	68 X	64	7081088	65.78	265958	286965	10	8	
PA-090602521	78 X	61	7076448	65.80	287089	291769	10	8	
PA-081201841	61 X	82	7173997	65.68	293799	296930	8	7	
PA-082302152	68 X	61	7008471	65.93	259463	299430	10	8	
PA-090700032	65 X	70	7071745	65.80	266397	308086	9	8	
PA-020601251	135 X	81	7256543	65.64	285380	308180	9	7	
PA-092102451	99 X	48	6432121	66.38	320026	320026	7	7	
PA-102700211	102 X	68	7169922	65.69	269374	327172	9	7	
PA-060900232	70 X	49	6223964	66.28	336570	336570	7	7	
PA-091802471	67 X	42	6341457	66.47	344211	344211	7	7	
PA-090300122	72 X	46	6292662	66.50	360486	360486	7	7	
PA-090300091	91 X	49	6290380	66.50	368330	368330	7	7	
PA-090500032	75 X	50	6290627	66.50	371324	371324	7	7	
PA-060900212	81 X	42	6411381	66.36	361354	374640	7	6	
PA-022901251	90 X	44	6325535	66.50	402178	402178	7	7	
PA-020601432	57 X	42	6362526	66.46	403555	403555	7	7	
PA-020900572	111 X	54	7092001	65.91	397311	404682	7	6	
PA-091802451	87 X	45	6339112	66.47	350016	407575	7	6	
PA-101602131	49 X	29	6549508	66.24	428058	428058	5	5	
PA-100400472	71 X	37	6749565	66.22	355914	446275	6	5	
PA-051200991	61 X	39	6388765	66.40	395349	478816	6	5	
PA-011701832	92 X	29	6272502	66.57	496900	496900	5	5	
PA-082801342	91 X	37	6278227	66.75	504390	504390	4	4	
PA-040901603	98 X	41	6848750	65.94	454422	509866	6	5	
PA-080801332	105 X	31	6276150	66.75	707815	707815	4	4	
PA-090401061	72 X	22	6293867	66.49	769234	769234	3	3	
PA-090302331	86 X	23	6902933	66.40	977407	977407	3	3	
PA-020100661	200 X	48	7395971	65.57	1287076	1780069	3	2	Ensamblaje Híbrido
PA-032200042	106 X	18	6998206	65.88	1134860	3194670	2	1	Ensamblaje Híbrido
PA-021200803	111 X	23	7371253	65.60	2951826	3231191	2	1	Ensamblaje Híbrido
PA-041700962	63 X	27	7513447	65.44	4756025	4756025	1	1	Ensamblaje Híbrido
PA-121300161	75 X	3	6407470	66.40	5334467	5334467	1	1	Ensamblaje Híbrido
PA-012202041	73 X	2	7000231	65.88	6957516	6957516	1	1	Ensamblaje Híbrido
PA-100702521	145 X	1	7154863	65.75	7154863	7154863	1	1	Ensamblaje Híbrido

Anexo F: Genes de virulencia encontrados

Vfclass	Virulence factors	Related genes
Adherence	Flagella	flaG
		fleN
		fleQ
		fleR
		fleS
		flgA
		flgB
		flgC
		flgD
		flgE
		flgF
		flgG
		flgH
		flgI
		flgJ
		flgK
		flgL
		flgM
		flgN
		flhA
		flhB
		flhF
		fliA
		fliC
		fliD
		fliE
		fliF
		fliG
fliH		
fliI		
fliJ		
fliK		
fliL		
fliM		
fliN		
fliO		
fliP		

	fliQ
	fliR
	fliS
	fliT
	motA
	motB
	motC
	motD
	motY
LPS O-antigen (<i>P. aeruginosa</i>)	Undetermined
Type IV pili biosynthesis	fimT
	fimU
	fimV
	pilA
	pilB
	pilC
	pilD
	pilE
	pilF
	pilM
	pilN
	pilO
	pilP
	pilQ
	pilR
	pilS
	pilT
pilU	
pilV	
pilW	
pilX	
pilY1	
pilY2	
pilZ	
Type IV pili twitching motility related proteins	chpA
	chpB
	chpC
	chpD
	chpE
	pilG
	pilH

		pill
		pilJ
		pilK
Antimicrobial activity	Phenazines biosynthesis	phzA1
		phzA2
		phzB1
		phzB2
		phzC1
		phzC2
		phzD1
		phzD2
		phzE1
		phzE2
		phzF1
		phzF2
		phzG1
		phzG2
		phzH
		phzM
phzS		
Antiphagocytosis	Alginate biosynthesis	alg44
		alg8
		algA
		algC
		algD
		algE
		algF
		algG
		algI
		algJ
		algK
		algL
		algX
	Alginate regulation	algP/algR3
		algQ
		algR
		algU
		algW
		algZ
mucA		
mucB		

		mucC
		mucD
		mucE
		mucP
Biosurfactant	Rhamnolipid biosynthesis	rhIA
		rhIB
		rhIC
Enzyme	Hemolytic phospholipase C	plcH
	Non-hemolytic phospholipase C	plcN
	Phospholipase C	plcB
	Phospholipase D	pldA
	Streptococcal enolase(Streptococcus)	eno
Iron uptake	Achromobactin biosynthesis and transport	acsA
		acsB
		acsC
		acsD
		cbrA
		cbrB
		cbrC
		cbrD
	Pyochelin receptor	fptA
	Pyochelin	pchA
		pchB
		pchC
		pchD
		pchE
		pchF
		pchG
		pchH
		pchI
		pchR
	Pyoverdine receptors	fpvA
	Pyoverdine	pvdA
		pvdD
		pvdE
pvdF		
pvdG		
pvdH		
pvdI		
pvdJ		
pvdL		

		pvdM
		pvdN
		pvdO
		pvdP
		pvdQ
		pvdS
		pvdY
	Heme uptake(<i>Escherichia</i>)	chuU
	Acinetobactin(<i>Acinetobacter</i>)	bauB
		bauC
		bauD
		bauE
Protease	Alkaline protease	aprA
	Elastase	lasA
		lasB
	Protease IV	prpL
Quorum sensing	Acylhomoserine lactone synthase	hdtS
	N-(3-oxo-dodecanoyl)-L-homoserine lactone QS system	lasI
		lasR
	N-(3-oxo-hexanoyl)-L-homoserine lactone QS system	ahlI
		ahlR
N-(butanoyl)-L-homoserine lactone QS system	rhlI	
	rhlR	
Regulation	GacS/GacA two-component system	gacA
		gacS
Secretion system	Hcp secretion island-1 encoded type VI secretion system (H-T6SS)	Undetermined
		clpV1
		fha1

		hcp1
		icmF1
		ppkA
		pppA
		vgrG1
	P. aeruginosa TTSS translocated effectors	exoS
		exoT
		exoU
		exoY
	P. aeruginosa TTSS	exsA
		exsB
		exsC
		exsD
		exsE
		pcr1
		pcr2
		pcr3
		pcr4
		pcrD
		pcrG
		pcrH
		pcrR
		pcrV
		popB
		popD
		popN
		pscB
		pscC
		pscD
		pscE
		pscF
		pscG
		pscH
	pscl	
	pscJ	
	pscK	
	pscl	
	pscN	
	pscO	
	pscP	
	pscQ	

		pscR
		pscS
		pscT
		pscU
	ACE T6SS(<i>Escherichia</i>)	aec16
	EPS type II secretion system(<i>Vibrio</i>)	epsE
		epsG
	icm/dot type IVB locus(<i>Yersinia</i>)	*
Toxin	Exolysin	exlA
		exlB
	Exotoxin A (ETA)	toxA
	Hydrogen cyanide production	hcnA
		hcnB
		hcnC
Alpha-hemolysin(<i>Escherichia</i>)	hlyB	
Biofilm formation	AdeFGH efflux pump/transport autoinducer(<i>Acinetobacter</i>)	adeG
Immune evasion	Capsule(<i>Acinetobacter</i>)	*
Copper uptake	Copper exporter(<i>Mycobacterium</i>)	ctpV
Efflux pump	AcrAB(<i>Klebsiella</i>)	*
Others	Virulence-associated proteins(<i>Bartonella</i>)	vapA4
Others	Capsular polysaccharide(<i>Vibrio</i>)	wcaJ

Anexo G: Perfiles alélicos de los ST

Codigo aislamiento	ST	acsA	aroE	guaA	mutL	nuoD	ppsA	trpE
PA-011701832	1290	acsA(39)	aroE(22)	guaA(36)	mutL(3)	nuoD(58)	ppsA(7)	trpE(2)
PA-012002271	357	acsA(2)	aroE(4)	guaA(5)	mutL(3)	nuoD(1)	ppsA(6)	trpE(11)
PA-012202041	235	acsA(38)	aroE(11)	guaA(3)	mutL(13)	nuoD(1)	ppsA(2)	trpE(4)
PA-020100661	111	acsA(17)	aroE(5)	guaA(5)	mutL(4)	nuoD(4)	ppsA(4)	trpE(3)
PA-020601251	111	acsA(17)	aroE(5)	guaA(5)	mutL(4)	nuoD(4)	ppsA(4)	trpE(3)
PA-020601432	274	acsA(23)	aroE(5)	guaA(11)	mutL(7)	nuoD(1)	ppsA(12)	trpE(7)
PA-020900572	357	acsA(2)	aroE(4)	guaA(5)	mutL(3)	nuoD(1)	ppsA(6)	trpE(11)
PA-021200803	111	acsA(17)	aroE(5)	guaA(5)	mutL(4)	nuoD(4)	ppsA(4)	trpE(3)
PA-022901251	3230	acsA(6)	aroE(5)	guaA(11)	mutL(3)	nuoD(4)	ppsA(33)	trpE(14)
PA-030701752	111	acsA(17)	aroE(5)	guaA(5)	mutL(4)	nuoD(4)	ppsA(4)	trpE(3)
PA-030802692	No determinado	acsA(28)	aroE(5)	guaA(36)	mutL(3)	nuoD(3)	ppsA(13)	trpE(14)
PA-032200042	111	acsA(17)	aroE(5)	guaA(5)	mutL(4)	nuoD(4)	ppsA(4)	trpE(3)
PA-040401482	No determinado	acsA(6)	aroE(410)	guaA(60)	mutL(~13)	nuoD(29)	ppsA(94)	trpE(3)
PA-040901603	155	acsA(28)	aroE(5)	guaA(36)	mutL(3)	nuoD(3)	ppsA(13)	trpE(7)
PA-041700962	111	acsA(17)	aroE(5)	guaA(5)	mutL(4)	nuoD(4)	ppsA(4)	trpE(3)
PA-051200891	1602	acsA(11)	aroE(162)	guaA(7)	mutL(7)	nuoD(1)	ppsA(3)	trpE(3)
PA-051200991	3613	acsA(84)	aroE(3)	guaA(26)	mutL(71)	nuoD(1)	ppsA(7)	trpE(53)
PA-060900212	2148	acsA(17)	aroE(20)	guaA(6)	mutL(34)	nuoD(4)	ppsA(6)	trpE(19)
PA-060900232	2148	acsA(17)	aroE(20)	guaA(6)	mutL(34)	nuoD(4)	ppsA(6)	trpE(19)
PA-080801332	No determinado	acsA(87)	aroE(262)	guaA(114)	mutL(87)	nuoD(53)	ppsA(109)	trpE(~129)
PA-080801841	2211	acsA(87)	aroE(34)	guaA(114)	mutL(37)	nuoD(86)	ppsA(100)	trpE(170)
PA-080802541	235	acsA(38)	aroE(11)	guaA(3)	mutL(13)	nuoD(1)	ppsA(2)	trpE(4)
PA-081201841	111	acsA(17)	aroE(5)	guaA(5)	mutL(4)	nuoD(4)	ppsA(4)	trpE(3)
PA-081501611	235	acsA(38)	aroE(11)	guaA(3)	mutL(13)	nuoD(1)	ppsA(2)	trpE(4)
PA-082302152	244	acsA(17)	aroE(5)	guaA(12)	mutL(3)	nuoD(14)	ppsA(4)	trpE(7)
PA-082801332	No determinado	acsA(87)	aroE(262?)	guaA(114)	mutL(37?)	nuoD(86?)	ppsA(109?)	trpE(~129)
PA-082801342	No determinado	acsA(87)	aroE(262)	guaA(114)	mutL(87)	nuoD(53)	ppsA(109)	trpE(~129)
PA-090300091	663	acsA(6)	aroE(5)	guaA(11)	mutL(29)	nuoD(3)	ppsA(15)	trpE(1)
PA-090300122	663	acsA(6)	aroE(5)	guaA(11)	mutL(29)	nuoD(3)	ppsA(15)	trpE(1)
PA-090302331	No determinado	acsA(23)	aroE(25)	guaA(11)	mutL(3)	nuoD(4)	ppsA(15)	trpE(9)
PA-090401061	No determinado	acsA(23)	aroE(25)	guaA(11)	mutL(3)	nuoD(4)	ppsA(15)	trpE(9)
PA-090500032	663	acsA(6)	aroE(5)	guaA(11)	mutL(29)	nuoD(3)	ppsA(15)	trpE(1)
PA-090602511	111	acsA(17)	aroE(5)	guaA(5)	mutL(4)	nuoD(4)	ppsA(4)	trpE(3)
PA-090602521	111	acsA(17)	aroE(5)	guaA(5)	mutL(4)	nuoD(4)	ppsA(4)	trpE(3)
PA-090700032	111	acsA(17)	aroE(5)	guaA(5)	mutL(4)	nuoD(4)	ppsA(4)	trpE(3)
PA-090900671	179	acsA(36)	aroE(27)	guaA(28)	mutL(3)	nuoD(4)	ppsA(13)	trpE(7)
PA-090900692	179	acsA(36)	aroE(27)	guaA(28)	mutL(3)	nuoD(4)	ppsA(13)	trpE(7)
PA-091802451	2414	acsA(15)	aroE(5)	guaA(11)	mutL(3)	nuoD(4)	ppsA(42)	trpE(9)
PA-091802471	2414	acsA(15)	aroE(5)	guaA(11)	mutL(3)	nuoD(4)	ppsA(42)	trpE(9)

PA-091901991	No determinado	acsA(6)	aroE(1)	guaA(11)	mutL(3)	nuoD(3)	ppsA(4)	trpE(14)
PA-092102451	1666	acsA(17)	aroE(76)	guaA(5)	mutL(5)	nuoD(2)	ppsA(4)	trpE(10)
PA-100400472	No determinado	acsA(127)	aroE(13)	guaA(5)	mutL(11)	nuoD(4)	ppsA(~126)	trpE(5)
PA-100400502	No determinado	acsA(127)	aroE(13)	guaA(5)	mutL(11)	nuoD(4)	ppsA(~126)	trpE(5)
PA-100601002	No determinado	acsA(11)	aroE(5)	guaA(12)	mutL(34)	nuoD(4)	ppsA(13)	trpE(7)
PA-100702521	111	acsA(17)	aroE(5)	guaA(5)	mutL(4)	nuoD(4)	ppsA(4)	trpE(3)
PA-101602131	No determinado	acsA(17)	aroE(5)	guaA(11)	mutL(6)	nuoD(1)	ppsA(15)	trpE(1)
PA-101902381	111	acsA(17)	aroE(5)	guaA(5)	mutL(4)	nuoD(4)	ppsA(4)	trpE(3)
PA-102301692	244	acsA(17)	aroE(5)	guaA(12)	mutL(3)	nuoD(14)	ppsA(4)	trpE(7)
PA-102700211	111	acsA(17)	aroE(5)	guaA(5)	mutL(4)	nuoD(4)	ppsA(4)	trpE(3)
PA-110402592	No determinado	acsA(15)	aroE(101)	guaA(5)	mutL(3)	nuoD(4)	ppsA(25)	trpE(7)
PA-110700531	235	acsA(38)	aroE(11)	guaA(3)	mutL(13)	nuoD(1)	ppsA(2)	trpE(4)
PA-121300161	274	acsA(23)	aroE(5)	guaA(11)	mutL(7)	nuoD(1)	ppsA(12)	trpE(7)
PA-121602982	111	acsA(17)	aroE(5)	guaA(5)	mutL(4)	nuoD(4)	ppsA(4)	trpE(3)
PA-121603024	235	acsA(38)	aroE(11)	guaA(3)	mutL(13)	nuoD(1)	ppsA(2)	trpE(4)

Anexo H: Presentaciones en eventos y reconocimientos



Las Facultades de Ciencias de las Sedes Bogotá y Medellín

Certifican que

Nicole Osorio Certuche

C.C. 1115086252

Participó como ponente en modalidad de póster
en la sesión de Biotecnología en Salud en el Evento

**III Simposio Virtual de Estudiantes y Egresados en Biotecnología
y áreas afines**

Con el trabajo titulado

"Evaluación del viruloma de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de IAAS"

Cuyos autores son: Nicole Osorio Certuche, Emiliano Barreto Hernández, Mishelle Cuello Mejía, Aura Lucia Leal,
Sebastián Prada Padilla, Diego Talero Osorio, Jorge Alberto Cortes, Mónica Aguilera, María Teresa Reguero

Realizado del 20 al 22 de septiembre de 2022

Con una intensidad de 24 horas

Dado en Bogotá D.C., el 22 de septiembre de 2022

Daniel Uribe Vélez
Coordinador
Posgrados en Biotecnología y
Microbiología
Facultad de Ciencias
Sede Bogotá

Arley David Zapata Zapata
Director
Área Curricular en Biotecnología
Facultad de Ciencias
Sede Medellín

SP9-2022



Las Facultades de Ciencias de las Sedes Bogotá y Medellín

Otorgan el presente reconocimiento a

Nicole Osorio Certuche

C.C. 1115086252

Como ganadora por la mejor ponencia presentada en modalidad de póster
en la sesión de Biotecnología en Salud, en el Evento

**III Simposio Virtual de Estudiantes y Egresados en Biotecnología
y áreas afines**

Con el trabajo titulado

"Evaluación del viruloma de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* causantes de IAAS"

Cuyos autores son: Nicole Osorio Certuche, Emiliano Barreto Hernández, Mishelle Cuello Mejía, Aura Lucia Leal,
Sebastián Prada Padilla, Diego Talero Osorio, Jorge Alberto Cortes, Mónica Aguilera, María Teresa Reguero

Realizado del 20 al 22 de septiembre de 2022

Con una intensidad de 24 horas

Dado en Bogotá D.C., el 22 de septiembre de 2022

Daniel Uribe Vélez
Coordinador
Posgrados en Biotecnología y
Microbiología
Facultad de Ciencias
Sede Bogotá

GSP9-2022

Arley David Zapata Zapata
Director
Área Curricular en Biotecnología
Facultad de Ciencias
Sede Medellín

8: Bibliografía

- Aslani, M. M., Nikbin, V. S., Sharafi, Z., Hashemipour, M., Shahcheraghi, F., & Ebrahimipour, G. H. (2012). Molecular identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins. *Iranian Journal of Microbiology*, *4*(3), 118–123.
- Azam, M. W., & Khan, A. U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*, *24*(1), 350–359. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003>
- Babour, I. A., Mohamed, M. B., & Shehabi, A. A. (2020). Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from various clinical specimens in Khartoum/Sudan: Antimicrobial resistance and virulence genes. *The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents*, *10*(1), 1–8. <https://doi.org/10.3823/840>
- Babraham-Bioinformatics. (2020). *FastQC*. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, *19*(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Barahona, N., Rodriguez, M., & De Moya, Y. (2019). Importancia De La Vigilancia Epidemiológica En El Control De Las Infecciones Asociadas a La Atención En Salud. *Biociencias*, *14*(1), 79–96. <https://doi.org/10.18041/2390-0512/biociencias.1.5440>
- Barrio-tofiño, E., López-causapé, C., & Oliver, A. (2020). *association with horizontally-acquired β -lactamases: 2020 update*. 56. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106196>
- Bazghandi, S. A., Arzanlou, M., Peeridogaheh, H., Vaez, H., Sahebkar, A., & Khademi, F. (2021). Prevalence of virulence genes and drug resistance profiles of *pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens. *Jundishapur Journal of Microbiology*, *14*(8). <https://doi.org/10.5812/jjm.118452>
- Beceiro, A., Tomás, M., & Bou, G. (2013). Antimicrobial resistance and virulence: A successful or deleterious association in the bacterial world? *Clinical Microbiology Reviews*, *26*(2), 185–230. <https://doi.org/10.1128/CMR.00059-12>
- Behzadi, P., Baráth, Z., & Gajdács, M. (2021). It's not easy being green: A narrative review on the microbiology, virulence and therapeutic prospects of multidrug-resistant *pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*, *10*(1), 1–29. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010042>

- Bertelli, C., & Greub, G. (2013). Rapid bacterial genome sequencing: Methods and applications in clinical microbiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(9), 803–813. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12217>
- Bhatta, D. R., Hamal, D., Shrestha, R., HS, S., Joshi, P., Nayak, N., & Gokhale, S. (2019). Burden of multidrug resistant respiratory pathogens in intensive care units of tertiary care hospital. *Asian Journal of Medical Sciences*, 10(2), 14–19. <https://doi.org/10.3126/ajms.v10i2.21098>
- Bioptric. (2016). *Qsep 100™ Operation Manual English V1.6 July/2016 I*.
- Bogiel, T., Depka, D., Rzepka, M., Kwiecińska-Piróg, J., & Gospodarek-Komkowska, E. (2021). Prevalence of the genes associated with biofilm and toxins synthesis amongst the pseudomonas aeruginosa clinical strains. *Antibiotics*, 10(3), 1–14. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030241>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Genome analysis Trimmomatic : a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bravo Ojeda, J. S. (2020). *Descripción de tipos de carbapenemasas expresadas en Klebsiella sp. y Pseudomonas aeruginosa en hospitales de tercer nivel de la ciudad de Bogotá, estudio descriptivo*.
- Brindhadevi, K., LewisOscar, F., Mylonakis, E., Shanmugam, S., Verma, T. N., & Pugazhendhi, A. (2020). Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in Pseudomonas aeruginosa. *Process Biochemistry*, 96(September 2019), 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.06.001>
- Chadha, J., Harjai, K., & Chhibber, S. (2021). Revisiting the virulence hallmarks of Pseudomonas aeruginosa: a chronicle through the perspective of quorum sensing. *Environmental Microbiology*, 00. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15784>
- Chávez-Jacobo, V. M. (2020). La batalla contra las superbacterias: No más antimicrobianos, no hay ESKAPE. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 23, 1–11. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.202>
- Chen, L., Zou, Y., She, P., & Wu, Y. (2015). Composition, function, and regulation of T6SS in Pseudomonas aeruginosa. *Microbiological Research*, 172, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.01.004>
- Clavijo, D. C. (2018). *Reconstrucción, modelamiento y simulación de la red metabólica y de quorum-sensing, implicadas en la regulación de un fenotipo específico en Pseudomonas aeruginosa*.
- Correa, Yan, R., Furlaneto, I. P., Henrique, A., Maciel, P., Pires, J., Quaresma, G., Costa, E., Matos, O. De, Cleyton, M., Le, G., Falc, N., Nepomuceno, L., & Costa, G. (2020). *High prevalence of atypical virulotype and genetically diverse background among Pseudomonas aeruginosa isolates from a referral*

hospital in the Brazilian Amazon. 1–21.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238741>

Correa, A., Perenguez, M., Blanco, V. M., Rodríguez-baños, M., Perez, F., Maya, J. J., Rojas, L., Cantón, R., Arias, C. A., & Villegas, V. (2015). *Dissemination of High-Risk Clones of Extensively Drug-Resistant Pseudomonas aeruginosa in Colombia*. 12. <https://doi.org/10.1128/AAC.03926-14>

de Sousa, T., Hébraud, M., Enes Dapkevicius, M. L. N., Maltez, L., Pereira, J. E., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Igrejas, G., & Poeta, P. (2021). Genomic and metabolic characteristics of the pathogenicity in pseudomonas aeruginosa. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222312892>

Diard, M., & Hardt, W. D. (2017). Evolution of bacterial virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(5), 679–697. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUX023>

Elbourne, L., Tremblay, S., Ren, Q., Roy, P. H., & Tetu, S. G. (2010). Complete Genome Sequence of the Multiresistant Taxonomic Outlier Pseudomonas aeruginosa PA7. *PLoS ONE*, 5(1), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008842>

Elmouaden, C., Laglaoui, A., Ennane, L., Bakkali, M., & Abid, M. (2019). Virulence genes and antibiotic resistance of Pseudomonas aeruginosa isolated from patients in the Northwestern of Morocco. *Journal of Infection in Developing Countries*, 13(10), 892–898. <https://doi.org/10.3855/jidc.10675>

Fragozo, L., & Villalobos, C. (2016). *Pseudomona aeruginosa: ESTADO DEL ARTE*. 112.

García Armijos, J. A., Mesa-Cano, I. C., Ramírez-Coronel, A. A., & Segovia Clavijo, A. C. (2021). Prevention of health care-associated infections: a systematic review. *Journal of American Health*, 8(10). <http://www.jah-journal.com/index.php/jah>

Genovese, C., La Fauci, V., D'Amato, S., Squeri, A., Anzalone, C., Costa, G. B., Fedele, F., & Squeri, R. (2020). Molecular epidemiology of antimicrobial resistant microorganisms in the 21th century: A review of the literature. *Acta Biomedica*, 91(2), 256–273. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i2.9176>

Gomila, A., Carratalà, J., Eliakim-Raz, N., Shaw, E., Wiegand, I., Vallejo-Torres, L., Gorostiza, A., Vigo, J. M., Morris, S., Stoddart, M., Grier, S., Vank, C., Cuperus, N., Van den Heuvel, L., Vuong, C., Macgowan, A., Leibovici, L., Addy, I., & Pujol, M. (2018). Risk factors and prognosis of complicated urinary tract infections caused by pseudomonas aeruginosa in hospitalized patients: A retrospective multicenter cohort study. *Infection and Drug Resistance*, 11, 2571–2581. <https://doi.org/10.2147/IDR.S185753>

- González-Olvera, E. M., Pérez-Morales, R., González-Zamora, A., Castroescarpulli, G., Palma-Martínez, I., & Alba-Romero, J. D. J. (2019). Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* in public hospitals of northeastern Mexico. *Journal of Infection in Developing Countries*, 13(5), 374–383. <https://doi.org/10.3855/jidc.10953>
- Guo, L. Li, Li, L. Mei, Li, Y., Duan, X. Xiao, Liu, Y. Jing, Gao, R. Y., & Zhao, Y. Da. (2022). Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from mink in China, 2011–2020. *Microbial Pathogenesis*, 162(October 2021), 105323. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105323>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTT086>
- Haghi, F., Zeighami, H., Monazami, A., Toutouchi, F., Nazaralian, S., & Naderi, G. (2018). Diversity of virulence genes in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. *Microbial Pathogenesis*, 115, 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.052>
- Haque, M., Sartelli, M., Mckimm, J., & Abu Bakar, M. (2018). Infection and Drug Resistance Dovepress Health care-associated infections-an overview. *Infection and Drug Resistance*, 11(1), 2321–2333. <http://dx.doi.org/10.2147/IDR.S177247>
- Hassuna, N. A., Mandour, S. A., & Mohamed, E. S. (2020). Virulence constitution of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in upper Egypt. *Infection and Drug Resistance*, 13, 587–595. <https://doi.org/10.2147/IDR.S233694>
- Higgins, S., Heeb, S., Rampioni, G., Fletcher, M. P., Williams, P., & Cámara, M. (2018). Differential regulation of the phenazine biosynthetic operons by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-N. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(JUL), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00252>
- Horna, G., Amaro, C., Palacios, A., Guerra, H., & Ruiz, J. (2019). High frequency of the *exoU+*/*exoS+* genotype associated with multidrug-resistant “high-risk clones” of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Peruvian hospitals. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47303-4>
- Horna, G., & Ruiz, J. (2021). Type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. In *Microbiological Research* (Vol. 246). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126719>
- Illumina. (2020). *Mi seq system*. https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet_miseq.pdf
- Illumina. (2022). *What is the PhiX Control v3 Library and what is its function in Illumina Next Generation Sequencing*.

<https://support.illumina.com/bulletins/2017/02/what-is-the-phix-control-v3-library-and-what-is-its-function-in-.html>

Instituto Nacional de Salud. (2021). Análisis del comportamiento de las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS). *BES Boletín Epidemiológico Semanal Semana Epidemiológica* 44, 4.
<https://hospitaltarapoto.gob.pe/web/IndicadoresAnalisisComportamiento>

Invitrogen. (2020). *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit*.
https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_genomic_mini_man.pdf

Invitrogen. (2022). *Qubit dsDNA Assay Kit*. 1–8.

Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications [version 1; referees: 2 approved]. *Wellcome Open Research*, 3(0), 1–20. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>

Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 1–37.
<https://doi.org/10.3390/ijms22063128>

Kainuma, A., Momiyama, K., Kimura, T., Akiyama, K., & Inoue, K. (2018). An outbreak of fl uoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST357 harboring the *exoU* gene *. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 24(8), 615–622. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.03.008>

Kloth, C., Schirmer, B., Munder, A., Stelzer, T., Rothschuh, J., & Seifert, R. (2018). The role of *Pseudomonas aeruginosa* exoy in an acute mouse lung infection model. *Toxins*, 10(5), 1–15. <https://doi.org/10.3390/toxins10050185>

Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive tree of life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>

Liew, S. M., Rajasekaram, G., Puthuchery, S. D. A., & Chua, K. H. (2019). Antimicrobial susceptibility and virulence genes of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *PeerJ*, 2019(1), 1–19.
<https://doi.org/10.7717/peerj.6217>

Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., Chen, L., & Yang, J. (2019). VFDB 2019: A comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D687–D692. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1080>

Luna de Araujo Jacome, P. regina., Rodrigues Alves, L., Borges Cabral, A., Souza Lopes, A. caratina., & Vierira Maciel, M. A. (2012). Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of

- Pernambuco, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(6), 707–712.
- Méndez-álvarez, S., & Pérez-roth, E. (2004). La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(3), 183–192.
- Nain, Z., & Karim, M. M. (2021). Whole-genome sequence, functional annotation, and comparative genomics of the high biofilm-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* MZ4A isolated from clinical waste. *Gene Reports*, 22(December), 100999. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100999>
- Newman, J. W., Floyd, R. V., & Fothergill, J. L. (2017). The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. *FEMS Microbiology Letters*, 364(15), 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx124>
- Oxford Nanopore Technologies. (2022a). *Ligation sequencing gDNA-native barcoding (SQK-LSK109 with EXP-NBD196)*.
- Oxford Nanopore Technologies. (2022b). *MinION*.
- Park, Y., & Koo, S. H. (2022). Epidemiology, Molecular Characteristics, and Virulence Factors of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients with Urinary Tract Infections. *Infection and Drug Resistance*, 15(December 2021), 141–151. <https://doi.org/10.2147/IDR.S346313>
- Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de Infectología*, 36(2), 180–189. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182019000200180>
- Pelegrin, A. C., Palmieri, M., Mirande, C., Oliver, A., Moons, P., Goossens, H., & Van Belkum, A. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: A clinical and genomics update. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(6), 1–20. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab026>
- Raúl Recio, Mikel Mancheño, Esther Viedma, Jennifer Villa, María Ángeles Orellana, J. L.-T. and F. C. (2020). *Predictors of Mortality in Bloodstream Infections Caused by Pseudomonas aeruginosa and Impact of Antimicrobial*. August 2019, 1–13.
- Redfern, J., Wallace, J., Belkum, A. Van, Jaillard, M., Whittard, E., Ragupathy, R., Verran, J., Kelly, P., & Enright, M. C. (2021). *Biofilm associated genotypes of multiple antibiotic resistant Pseudomonas aeruginosa*. 1–16.
- Revelas, A. (2012). Healthcare - associated infections: A public health problem. *Nigerian Medical Journal*, 53(2), 59. <https://doi.org/10.4103/0300-1652.103543>
- Reynolds, D., & Kollef, M. (2021). The Epidemiology and Pathogenesis and

Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs*, 81(18), 2117–2131. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01635-6>

Riaño Abril, D. J. (2016). *Movilización de genes de resistencia en el clon de Pseudomonas aeruginosa ST235 causante de infecciones en Colombia Análisis de las plataformas genéticas de movilización de genes de resistencia en el clon de Pseudomonas aeruginosa ST235 causante de infecc.*

Rodriguez, L. X. (2021). *Caracterización in silico de los genes de virulencia PhoP - PhoQ en cepas de Pseudomonas aeruginosa fenotipo multidrogo-resistente (MDR.* <https://doi.org/10.19163/medchemrussia2021-2021-236>

Sauvage, S., & Hardouin, J. (2020). Exoproteomics for better understanding *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Toxins*, 12(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/toxins12090571>

Seemann, T. (2020). *Snippy*. <https://github.com/tseemann/snippy>

Sharma, A. K., Dhasmana, N., Dubey, N., Kumar, N., Gangwal, A., Gupta, M., & Singh, Y. (2017). Bacterial Virulence Factors: Secreted for Survival. *Indian Journal of Microbiology*, 57(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0625-1>

Spagnolo, A. M., Sartini, M., & Cristina, M. L. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* in the healthcare facility setting. *Reviews in Medical Microbiology*, 32(3), 169–175. <https://doi.org/10.1097/mrm.0000000000000271>

Springer, T. I., Reid, T. E., Gies, S. L., & Feix, J. B. (2019). Interactions of the effector ExoU from *Pseudomonas aeruginosa* with short-chain phosphatidylinositides provide insights into ExoU targeting to host membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 294(50), 19012–19021. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010278>

Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU033>

Subedi, D., Vijay, A. K., Kohli, G. S., Rice, S. A., & Willcox, M. (2018). Comparative genomics of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different geographic sites. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34020-7>

Sultan, M., Arya, R., & Kim, K. K. (2021). Roles of two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22). <https://doi.org/10.3390/ijms222212152>

Tagini, F., & Greub, G. (2017). Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: a pathogen-oriented review. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 36(11), 2007–2020. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3024-6>

- ThermoFisher. (2020a). *NadoDrop*.
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND-ONE-W#/ND-ONE-W>
- ThermoFisher. (2020b). *Qubit 4 Fluorometer*.
<https://www.thermofisher.com/co/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit/qubit-fluorometer.html>
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22), 1–25.
<https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- Tickler, I. A., Carlos, J., La, G. De, Alvarado, L., Obradovich, A. E., & Tenover, F. C. (2022). Journal of Global Antimicrobial Resistance Mechanisms of carbapenemase-mediated resistance among high-risk *Pseudomonas aeruginosa* lineages in Peru. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *31*, 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.08.018>
- Treepong, P., Kos, V. N., Guyeux, C., Blanc, D. S., Bertrand, X., & Valot, B. (2018). Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. *Clinical Microbiology and Infection*, *24*(3), 258–266.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.018>
- Valle, R. H. (2020). resistencia bacteriana y producción de biopelículas en la ciudad de Diversidad genética de *Pseudomonas aeruginosa* y su relación con la resistencia bacteriana y producción de biopelículas en la ciudad de Cartagena de Indias D . C . T . -Colombia. In *Universidad de cartagena*.
- Vives-Flórez, M., & Garnica, D. (2006). Comparison of virulence between clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *International Microbiology*, *9*(4), 247–252. <https://doi.org/10.2436/im.v9i4.9582>
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLOS Computational Biology*, *13*(6), e1005595.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1005595>
- World Health Organization. (2011). Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide: Clean care is safer care. *World Health Organization*, 1–40.
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/80135/9789241501507_eng.pdf?sequence=1
- World Health Organization. (2017). WHO (2017) Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *World Health Organization*, *43*(148), 348–365.
- Yang, J. J., Tsuei, K. S. C., & Shen, E. P. (2022). The role of Type III secretion system in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* microbial keratitis. *Tzu Chi Medical Journal*, *34*(1), 8–14. https://doi.org/10.4103/tcmj.tcmj_47_21

- Yang, X., Lai, Y., Li, C., Yang, J., Jia, M., & Sheng, J. (2021). Molecular epidemiology of pseudomonas aeruginosa isolated from lower respiratory tract of icu patients. *Brazilian Journal of Biology*, 81(2), 351–360. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.226309>
- Yin, R., Kwok, C. K., & Zheng, J. (2018). Whole genome sequencing analysis. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics*, 1–3, 176–183. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20095-2>
- Yoon, E., & Jeong, S. H. (2021). Mobile Carbapenemase Genes in Pseudomonas aeruginosa. *Front. Microbiol.*, 12(February). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.614058>
- Zheng, M., Sun, S., Zhou, J., & Liu, M. (2021). Virulence factors impair epithelial junctions during bacterial infection. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 35(2), 1–6. <https://doi.org/10.1002/jcla.23627>