

COMPARACIÓN GENÓMICA DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AISLADA DEL AMBIENTE NATURAL Y HOSPITALARIO.

Kelly Johana Aroca Molina

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia.

Correo electrónico: kelly.aroca@correounivalle.edu.co

Neyla Benítez Campo

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia.

Correo electrónico: neyla.benitez@correounivalle.edu.co

Sonia Jakeline Gutiérrez Cepeda

Universidad del Valle, Apartado Aéreo 25360, Cali, Colombia.

Correo electrónico: sonia.gutierrez@correounivalle.edu.co

Nombre del programa: Biología (3140)

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es uno de los principales patógenos asociados a las infecciones en atención en salud (IAAS) a nivel mundial debido tanto a su capacidad para persistir en condiciones medioambientales adversas como a los mecanismos de patogenicidad que posee. Esta alta patogenicidad también se encuentra asociada a su gran plasticidad genética conferida por genes regulatorios, genes codificadores para resistencia intrínseca y adquirida, que propicia una mayor persistencia y diseminación. No es claro si los aislados ambientales poseen un alto potencial de patogenicidad, así como tampoco si codifican para fenotipos multidrogorresistentes a antibióticos, como en aislados clínicos. Por tanto, con el objetivo de comparar las características genéticas asociadas a virulencia y a resistencia en aislados clínicos y ambientales de *Pseudomonas aeruginosa*, se llevó a cabo el análisis bioinformático del genoma de 7 aislados hospitalarios y 7 aislados ambientales. Se obtuvieron 333 genes asociados a virulencia, de los cuales se encontró que aproximadamente el 62% de los genes se comparten entre todos los aislados. Este resultado permite afirmar que *P. aeruginosa* independientemente de su origen posee un alto potencial intrínseco para causar un amplio margen de infecciones a pesar de la baja probabilidad de encontrarse con un huésped vulnerable. En términos de resistencia antimicrobiana, se encontraron 135 genes de los cuales el 72,59% de ellos se comparten entre todos los aislados y difieren en el 27,41%. Estas diferencias son ocasionadas posiblemente por la presión selectiva que se ejerce en los ambientes hospitalarios por el constante uso de antibióticos.

Palabras clave: Patogenicidad, resistencia antimicrobiana, secuenciación del genoma, virulencia.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is one of the main pathogens associated with healthcare-associated infections (HAIs) worldwide due to both its ability to persist in adverse environmental conditions and its pathogenicity mechanisms. This high pathogenicity is also associated with its great genetic plasticity conferred by regulatory genes coding genes for intrinsic and acquired resistance, which favors greater persistence and dissemination. It is unclear whether environmental isolates possess a high potential for pathogenicity, as well as whether they encode for antimicrobial multidrug-resistant phenotypes, as found in clinical isolates. Therefore, to compare the genetic characteristics associated with virulence and resistance of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, a bioinformatic analysis of the genomes of 7 hospital isolates and 7 environmental isolates was carried out. A total of 333 virulence associated genes were obtained, of which approximately 62% of the genes were found to be shared among all isolates. This result allows us to affirm that *P. aeruginosa*, regardless of its origin, has a high intrinsic potential to cause a wide range of infections despite the low probability of finding a vulnerable host. Regarding antimicrobial resistance, 135 genes were found, of which

72.59% of the genes are shared among all isolates and 27.41% of the genes differ. These differences are possibly due to the selective pressure exerted in hospital environments by the constant use of antibiotics.

Key words: Pathogenicity, antimicrobial resistance, genome sequencing, virulence.

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae* (Ruiz, 2007), es considerada como bacteria aerobia facultativa debido a su capacidad de crecer en medios anaerobios, tomando el nitrato o la arginina como aceptores finales de electrones. Esta bacteria tiene forma de bacilo y mide aproximadamente 0,5-1 μm de diámetro y 1,5-1 μm de largo (Ruiz, 2007; Paz, *et al.*, 2019). *P. aeruginosa* es adaptable y metabólicamente versátil, por lo cual, se ha encontrado en una amplia variedad de hábitats como el suelo, agua, plantas, animales, entornos hospitalarios y aguas residuales (Crone *et al.*, 2019). Además, esta diversidad ecológica se debe en parte a su gran capacidad para la mineralización de la materia orgánica, siendo saprófito, lo que le permite aprovechar muchos tipos de sustratos, varios considerados tóxicos, como hidrocarburos alifáticos y aromáticos, aparte de ser resistentes a metales pesados, antimicrobianos y detergentes (Rachhpal, 2016; Kenneth & George, 2011; Luján, 2019).

Adicionalmente, se conoce que, para responder y adaptarse a los diversos ambientes *P. aeruginosa* cuenta con un repertorio de genes que se conservan sustancialmente y que corresponde a la mayor proporción de genes y redes regulatorias observadas en genomas bacterianos conocidos (Nain & Karim, 2020). Esta bacteria cuenta con un pangenoma organizado como un mosaico que consta de regiones conservadas (genoma central) intercaladas con material genético variable (genoma accesorio) que dependiendo de la cepa se encuentra en mayor o en menor proporción dentro del cromosoma. El genoma central

codifica un conjunto de factores metabólicos y patógenos compartidos de una cepa a otra, independientemente de que su origen sea clínico o ambiental y constituye aproximadamente el 90% del genoma total (Vanegas & Jiménez, 2013). Por el contrario, el genoma accesorio es variable y se caracteriza por poseer un alto contenido de G+C y la presencia de elementos genéticos móviles; la mayoría de ellos degenerados debido a la acumulación de deleciones, lo que dificulta el conocimiento de los mecanismos de transferencia, al presentar baja similitud con elementos ya reportados (Nain & Karim, 2020; Vanegas & Jiménez, 2013).

A pesar de que esta bacteria suele estar presente en la microbiota intestinal y en la piel del ser humano, puede causar infecciones actuando como oportunista. Es considerada como uno de los principales patógenos nosocomiales a nivel mundial, debido tanto a su capacidad para persistir en condiciones medioambientales adversas, como a los mecanismos de patogenicidad que posee (Paz, *et al.*, 2019). Esta alta patogenicidad también se encuentra muy asociada a su gran plasticidad genética conferida por genes regulatorios; genes codificadores para resistencia intrínseca y adquirida, que propicia una mayor persistencia y diseminación, impidiendo que los antimicrobianos actuales sean efectivos para controlar las infecciones causadas por esta bacteria (Vanegas & Jiménez, 2013).

Las investigaciones clínicas y varios modelos infecciosos indican que la virulencia de *P. aeruginosa* varía de una cepa a otra. Los genes de la mayoría de los determinantes de virulencia de *P. aeruginosa* caracterizados se encuentran en el genoma central, por lo que, están presentes en todas las cepas. Por lo tanto, se considera que la heterogeneidad en la virulencia de esta especie puede estar influenciada por el genoma accesorio (Battle *et al.*, 2008), que a grandes rasgos está compuesto por: (I) elementos integradores y conjugativos (ICE), (II) islas de reemplazo, (III) profagos y elementos similares a fagos, (IV) transposones, secuencias de inserción (IS) e integrones, (V) plásmidos (VI) e islas genómicas que se

encuentran solo en algunas cepas. Cabe resaltar que los componentes del genoma accesorio a menudo están formados por una combinación de diferentes módulos funcionales (Kung, Ozer & Hauser, 2010; Vanegas & Jiménez, 2014)

La presencia ubicua y la persistencia de *P. aeruginosa* en entornos clínicos se le puede atribuir a su amplia gama de resistencia intrínseca y adquirida a los antibióticos. Según varios estudios epidemiológicos, aislados clínicos de *P. aeruginosa* son resistentes a una variedad cada vez más amplia de antibióticos, incluidas las cefalosporinas de "cuarta generación", por lo que es catalogada como una bacteria multidrogorresistente (MDR) o extenso drogo resistente (XDR), dependiendo a la clase o categoría de antibióticos a los que se evidencie resistencia (Kos *et al.*, 2014; Magiorakos *et al.*, 2012). Estos aislados a nivel genómico presentan mutaciones puntuales en determinados genes o bien han adquirido genes de resistencia por transferencia horizontal, lo que le proporciona un arsenal de información disponible y expresable al momento que se requiera (Nain & Karim, 2020; McAulay *et al.*, 2021).

Durante la última década, se han empleado varias técnicas moleculares para la identificación y la tipificación bacteriana de *P. aeruginosa*, como la toma de huellas dactilares de plásmidos, la ribotipificación, los métodos basados en PCR y la electroforesis en gel de campo pulsado (sigla en inglés, PFGE) (Tenover *et al.*, 1995). Curran *et al.* (2004) desarrollaron un esquema de tipificación de secuencias multilocus (sigla en inglés, MLST) que discrimina las cepas aisladas por diferencias en las secuencias de siete genes: *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* y *trpE*. Esta técnica permite comprender mejor la epidemiología de las infecciones en pacientes con fibrosis quística y estudiar clones multirresistentes (Gomila *et al.*, 2013). Sin embargo, cabe resaltar que la creciente disponibilidad de datos de secuenciación del genoma completo (sigla en inglés, WGS) permite una perspectiva mucho

más profunda sobre la diseminación clonal intrahospitalaria e interhospitalaria de *P. aeruginosa* (del Barrio *et al.*, 2020).

Según los estudios basados en estas técnicas se conoce que los 10 principales clones de alto riesgo de *P. aeruginosa* en todo el mundo incluyen ST111, ST175, ST233, ST235, ST244, ST277, ST298, ST308, ST357 y ST654. Estos clones fueron identificados teniendo en cuenta factores como su prevalencia, propagación global y asociación con perfiles MDR/XDR, y especialmente con respecto a las β -lactamasas adquiridas horizontalmente como ESBL y carbapenemasas (del Barrio *et al.*, 2020).

A nivel ambiental, gracias a la diversidad metabólica característica del género *Pseudomonas*, algunas de estas especies, incluida *P. aeruginosa* son de gran utilidad en la biorremediación de suelos contaminados, por ejemplo con petróleo, el cual es una mezcla de hidrocarburos alifáticos, aromáticos, resinas y asfaltenos, algunos de los cuales se han identificado como carcinogénicos y neurotóxicos causantes de grandes trastornos en los componentes bióticos y abióticos de los ecosistemas (Mays & Manzi, 2017). Las bacterias toman como fuente de energía estos compuestos y los degradan en subproductos inocuos como el dióxido de carbono y el agua. Sin embargo, para potenciar el uso de estos microorganismos en biorremediación no basta con una alta capacidad biodegradativa, sino que adicionalmente se debe garantizar la baja patogenicidad (Luján, 2019; González & Benítez, 2019).

En los últimos tiempos, se han reportado estudios enfocados en determinar la presencia de *P. aeruginosa* en aguas residuales y afluentes hídricos urbanos, aún después de las salidas de plantas de tratamiento de aguas residuales (Amábile, 2016; Slekovec, *et al.*, 2012). Se ha identificado que cepas de *P. aeruginosa* MDR se encuentran en mayor concentración, en aguas residuales de centros hospitalarios al compararlas con otro tipo de aguas. Sin embargo, no es claro si las cepas de ambientes naturales de *P. aeruginosa* poseen un alto potencial de

patogenicidad, así como tampoco si podrían codificar para fenotipos multidrogorresistentes a antimicrobianos, como en las cepas clínicas (Oliver, *et al.*, 2015); si esto logra identificarse se podría inferir que estas cepas extrahospitalarias podrían ser reservorios potenciales de genes de interés para la salud de los seres humanos y animales. Por lo tanto, antes de emplear aislados ambientales de esta especie en procesos biotecnológicos es recomendable analizar el entorno en el que van a ser empleados con el fin de prevenir que encuentren condiciones óptimas para generar infecciones.

Dado que no se conoce con exactitud si los aislados ambientales poseen un alto potencial de patogenicidad, así como tampoco si codifican para fenotipos multidrogorresistentes a antibióticos, como en aislados clínicos, este trabajo pretende dar respuesta al siguiente interrogante ¿Los aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* comparten genes asociados a virulencia y a resistencia antimicrobiana con aislados ambientales? Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es comparar las características genéticas asociadas a resistencia y virulencia de aislados clínicos y ambientales de *Pseudomonas aeruginosa*.

MÉTODOS

Selección de muestras. Esta investigación hace parte de un estudio preliminar, denominado “Comparación genómica de *Pseudomonas aeruginosa* aislada del ambiente natural y hospitalario”, financiado con recursos de una convocatoria interna de la Universidad del Valle, en el que se sometieron 49 aislados ambientales y hospitalarios a un análisis de PFGE para determinar similitud genómica. En aquellos aislados donde se presentó similitud clonal se escogió un representante de cada clon. De los aislados clínicos se contaba con los tipos de secuencias (ST), parámetro que se tuvo en cuenta para su selección. De acuerdo con esto se seleccionaron para el análisis genómico 7 aislados ambientales (Tabla 1) y 7 aislados clínicos

(Tabla 2).

Extracción de ADN y secuenciación. La extracción y la secuenciación de los aislados ambientales y hospitalarios de *Pseudomonas aeruginosa* se realizó en el Centro Internacional de Genómica Microbiana de la Universidad del Bosque con base en la tecnología Illumina. La preparación de librerías genómicas Nextera XT se realizó a partir del ADN extraído mediante el kit DNeasy Blood & Tissue de Qiagen (QIAGEN, 2013; Illumina, 2019). Se realizó la secuenciación Miseq (MiSeq™ System, 2021) y se obtuvieron secuencias pareadas para cada aislado con una longitud de lectura de 2-149 pb.

Filtro de calidad de las secuencias crudas. Se realizó el análisis de calidad de las lecturas sin procesar en la plataforma Galaxy Europe mediante el programa FastQC® versión 0.11.9 (Andrews, 2010), y posteriormente fueron recortadas y filtradas con Trimmomatic® versión 0.38 (Bolger *et al.*, 2014).

Identificación de genes asociados a virulencia y resistencia a antimicrobianos. Se utilizó el programa Unicycler® versión 0.4.8 (Wick *et al.*, 2016) para realizar el ensamble de las secuencias de manera individual. La anotación se realizó mediante el servidor Prokka® versión 1.14.6 (Seemann, 2014). Mediante el software PATRIC® versión 3.6.12 (Davis *et al.*, 2020) se realizó la identificación de los genes asociados a virulencia y los genes de resistencia a antibióticos. Para la identificación de los genes de virulencia se utilizaron los datos obtenidos de la base de datos VFDB (Virulence Factor Database) (Liu *et al.*, 2022). En el caso de resistencia a antibióticos, para su identificación se empleó la base de datos de PATRIC (Antonopoulos *et al.*, 2019) y la base de datos CARD (Alcock *et al.*, 2020).

Comparación de los genomas. Se realizó la identificación de los genes asociados a virulencia y a resistencia antimicrobiana en cada uno de los aislados ambientales y hospitalarios de *Pseudomonas aeruginosa* y posteriormente se recopiló la información que se generó para cada aislado; se elaboró un mapa circular de BRIG para comprar los genes asociados a virulencia (Alikhan, 2011) y un mapa de calor para comparar los genes asociados a resistencia. Posteriormente se llevó a cabo un análisis estadístico con el programa RStudio® aplicando el modelo lineal generalizado (sigla en inglés, GLM) con distribución de errores binomiales para determinar si las diferencias encontradas eran estadísticamente significativas (Equipo RStudio, 2020).

RESULTADOS

Características generales de los genomas y anotación funcional.

Se encontró que la longitud del genoma de los aislados de *P. aeruginosa* tanto clínicas como ambientales varía entre 6,2 a 7,0 Mpb, el número de secuencias codificantes de proteínas (CDs) varía entre 5841 a 6488 y el contenido de G+C osciló entre 66,0 a 66,6% (Tabla 3).

Comparación de genes asociados a virulencia

En total, se recopilaron 333 genes asociados a virulencia, de los cuales se encontró que aproximadamente el 62,0 % de los genes (207 genes) se comparten entre todos los aislados de *P. aeruginosa*. A pesar de que solo se presentaron diferencias estadísticamente significativas en el gen *exoU*, (valor-p = 0,0475) se observaron diferencias tanto en aislados ambientales como en aislados hospitalarios, las cuales se resumen a continuación y pueden consultarse con mayor detalle en la figura 1:

- Genes asociados al mecanismo de adherencia y motilidad: Flagelo, Motilidad de espasmos pili tipo IV, LPS
 - *fleI/flag*, *fleP*, *flgL*, *fliC*, *fliD* y *fliS* ausentes en los aislados ambientales sni99,

srp10.1, srp75 y en los aislados hospitalarios 23SS, 37HRC y 46HRC.

- *chpA*, ausente solo en el aislado hospitalario 37HRC.
- *wzz* y *wzy* presentes únicamente en el aislado ambiental pt3.
- Genes asociados al mecanismo de biosíntesis de pili tipo IV
 - *fimU*, ausente en el aislado ambiental si33 y en los aislados hospitalarios 10SS y 31HRC.
 - *fimT*, ausente en el aislado ambiental si33 y en los aislados hospitalarios 10SS, 20SS y 31HRC.
 - *pilE*, ausente en el aislado ambiental si33 y en el aislado hospitalario 10SS.
 - *pilW* y *pilX*, ausentes en el aislado ambiental si33 y en los aislados hospitalarios 10SS y 31HRC.
 - *pilV*, ausente en el aislado ambiental si33 y en los aislados hospitalarios 10SS y 37HRC.
 - *pily2*, ausente en el aislado ambiental si33 y en los aislados hospitalarios 10SS, 20SS y 31HRC.
 - *pilQ*, ausente en los aislados hospitalarios 10SS y 37HRC.
 - *pilC*, presente en los aislados ambientales si33, pt3 y en los aislados hospitalarios 10SS, 37HRC y 46HRC.
 - *pilA*, presente en el aislado ambiental pt3 y en el asilado hospitalario 23SS.
 - *pilB*, presente en el aislado ambiental pt3 y en los aislados hospitalarios 23SS, 37HRC y 46HRC.
 - *pily1*, presente únicamente en el aislado hospitalario 20SS.
- Genes asociados al mecanismo de regulación y biosíntesis del alginato
 - *algP/alg*, ausente solo en el aislado ambiental pt2b

- Genes asociados al mecanismo de secreción de sideróforos (pioquelina)
- *pchG*, *pchH*, ausentes en el aislado hospitalario 23SS.
- *pchI*, ausente solo en el aislado hospitalario 20SS.
- Genes asociados al mecanismo de secreción de sideróforos (pioverdina)
 - *pvdA*, ausente en aislados ambientales pt3, sni99, srp10.1, srp75.
 - *pvdD* y *pvdE*, ausentes en los aislados ambientales pt2b, pt12a, si33 y en los aislados hospitalarios 11ss, 20ss, 37HRC y 46HRC.
 - *pvdP*, ausente en los aislados hospitalarios 20SS, 23SS y 46HRC.
 - *pvdQ*, ausente en los aislados hospitalarios 10SS, 21SS, 23SS y 31HRC.
 - *pvdI*, presente solo en el aislado ambiental pt3 y en los aislados hospitalarios 10SS, 20SS, 23SS y 37HRC.
 - *pvdJ*, presente en los aislados hospitalarios pt3, srp10.1, srp75 y en los aislados ambientales 10SS, 23SS y 31HRC.
- Genes asociados al mecanismo de biosíntesis de ramnolípidos
 - *rhlC*, ausente solo en el aislado hospitalario 20SS.
- Genes asociados al mecanismo de secreción de toxinas
 - *toxA*, ausente solo en el aislado hospitalario 20SS.
- Genes asociados al mecanismo de secreción de proteasas
 - *lasA*, ausente solo en el aislado hospitalario 20SS.
- Genes asociados al mecanismo de detección de *Quorum sensing* (Qs)
 - *lasI* y *rhlI* presentes en los aislados tanto ambientales como clínicos, sin embargo, *lasI* se encontró ausente únicamente en el aislado hospitalario 37HRC.
- Genes asociados al sistema de secreción tipo II

- *xcpQ*, ausente únicamente en el aislado hospitalario 23SS.
- Genes asociados al sistema de secreción tipo III
 - En el aislado hospitalario 20SS se encontró ausencia de todos los genes asociados a este mecanismo de virulencia, por lo cual, se encontró presente únicamente en este aislado los genes *exlA* y *exlB*.
 - *exoU*, presente solo en el aislado ambiental pt12a y en los aislados hospitalarios 10SS, 23SS, 31HRC, 37HRC y 46HRC. Este gen fue el único en presentar diferencias estadísticamente significativas con un valor- $p=0,0475$, lo que indica que se presentó en mayor medida en los aislados clínicos.
- Genes asociados al sistema de secreción tipo IV
 - *hsiJ1* y *lip1*, ausentes en el aislado hospitalario 20SS.
 - *fha1*, presente en todos los aislados ambientales y en los aislados hospitalarios 23SS y 37HRC.

Comparación de genes asociados a resistencia antimicrobiana

En total, se recopilaron 135 genes asociados a resistencia antimicrobiana (Anexo 2) de los cuales el 72,59% (98 genes) fueron similares entre los aislados tanto clínicos como ambientales, mientras que en el 27,41% (37 genes) restante se encontraron diferencias en los genes que se detallan a continuación.

- Genes asociados al mecanismo de bomba de expulsión
 - *emrAB-OMF*, *emrAB-TolC* y *mexQ*, ausentes solo en el aislado hospitalario 20SS.
 - *mexM*, ausente solo en el aislado hospitalario 37HRC.
 - *mexA*, ausente en el aislado hospitalario 46HRC.
 - *mexVW-OprM*, presente únicamente en aislados hospitalarios.

- *oprA*, presente solo en el aislado hospitalario 20SS.
- *golS*, *mdsB*, *oprM/oprM*, presente únicamente en el aislado hospitalario 11SS.
- *tetC*, presente solo en los aislados ambientales srp10.1 y srp75.
- Genes asociados al mecanismo de cambios en la permeabilidad de la membrana externa
 - *occD1/oprD*, ausente en el aislado hospitalario 23SS.
 - *occK2/opdF*, ausente en el aislado hospitalario 20SS.
 - *occK7/opdD*, ausentes en los aislados hospitalarios 10SS, 11SS, 20SS, 23SS y 31HRC.
- Genes adquiridos por plásmidos asociados a la resistencia a los carbapenémicos
 - *kpc-2*, *tem-12*, presentes solo en el aislado hospitalario 46HRC.
- Genes asociados al mecanismo de inactivación de antibióticos
 - *catB7* y *fosA*, ausentes únicamente en el aislado hospitalario 20SS.
 - *aph(3'')-I*, presente solo en los aislados hospitalarios 20SS y 37HRC.
 - *aph(6)-Ic/APH(6)-Id*, *aph(3'')-Ib* y *aph(6)-Id*, presentes en los aislados hospitalarios 20SS, 37HRC, 46HRC.
 - *oxa-2*, *pdC-2*, presentes en los aislados hospitalarios 37HRC y 46HRC.
 - *pdC-1*, presente solo en el aislado ambiental pt3.
 - *pdC-3*, presente en los aislados ambientales pt2b, pt12a, srp10.1, srp75 y solo en el aislado hospitalario 11SS. Este gen fue el único en presentar diferencias estadísticamente significativas con un valor-p= 0,0475, lo que indica que se presentó en mayor medida en aislados ambientales.
 - *pdC-7*, presente en los aislados hospitalarios 20SS y 23SS.
 - *pdC-8*, presente solo en el aislado ambiental si33.

- *pdc-9*, presente en los aislados hospitalarios 10SS y 31HRC.
- Genes asociados al mecanismo de modificación del antibiótico (polimixina)
 - *arnA*, ausente solo en el aislado hospitalario 20SS.
- Genes asociados a otros mecanismos
 - *pvrR*, regulador de fenotipo presente en los aislados hospitalarios 10SS, 20SS y 31HRC.
 - *aadA6*, presente solo en el aislado hospitalario 46HRC que confiere resistencia a aminoglucósidos.
 - *sul1*, presentes solo en el aislado hospitalario 46HRC que confiere resistencia a las sulfonamidas.
 - *oxyR*, modulador de los sistemas de defensa antioxidantes ausente solo en el aislado hospitalario 37HRC.

DISCUSIÓN

En este estudio se reporta que el tamaño del genoma de los aislados de *P. aeruginosa* tanto clínicos como ambientales osciló entre 6,2 a 7,0 Mpb, el número de secuencias codificantes de proteínas (CDs) varió entre 5841 a 6488 y el contenido de G+C fue de 66,0 a 66,6%. Estos valores se encuentran entre los rangos ya registrados en otras cepas de esta especie como las reportadas en Silby *et al.*, (2011) y en Subedi, *et al.*, (2018). Sin embargo, al comparar estos valores con los reportados para la cepa de referencia PAO1 se puede evidenciar que el tamaño del genoma de los aislados hospitalarios fue relativamente mayor, mientras que los aislados ambientales presentaron valores mucho más similares a dicha cepa.

En esta investigación se encontró que los aislados ambientales y hospitalarios comparten un gran número de genes reportados para los factores de virulencia (207 genes), lo que sugiere

que *P. aeruginosa* posee intrínsecamente un gran repertorio de genes que codifican una gran variedad de determinantes de virulencia, pero que también adquiere factores adicionales (Ji *et al.*, 2002). Estos hallazgos pueden ser comparados con estudios como el de Wolfgang *et al.*, (2003), en el que se realizó el análisis de la composición del genoma de una colección de 18 cepas de *P. aeruginosa* de distintos orígenes mediante el uso de una micromatriz de ADN del genoma completo. Wolfgang *et al.*, (2003) reportan que en cepas clínicas se encontró un alto nivel de conservación de genes de virulencia ($\approx 97\%$) y que se extiende en aislados ambientales. En el caso de esta investigación se observa un comportamiento similar, lo que sugiere que es probable que los aislados ambientales estudiados poseen gran capacidad para causar infecciones humanas a pesar de la baja probabilidad de encontrarse con un huésped vulnerable.

A pesar de las diferencias observadas, el mayor número de genes de virulencia encontrados para aislados tanto clínicos como ambientales son los asociados al mecanismo de adherencia y motilidad (85 genes), resultado que concuerda en gran medida con lo encontrado por Nain & Karim, (2020) y que permite justificar el alto potencial de adherencia que posee *P. aeruginosa*. Otro mecanismo en el que se encontró un alto número de genes fue en el sistema de secreción (76 genes). Se conoce que *P. aeruginosa* posee 5 sistemas de secreción (T1SS, T2SS, T3SS, T5SS y T6SS) utilizados para modular las respuestas inmunes de los huéspedes mediante la liberación de varias proteínas, toxinas y enzimas (Azam & Khan, 2019; Qin *et al.*, 2022).

Sin embargo, mediante el análisis realizado en este estudio se encontraron únicamente los sistemas de secreción; T2SS, T3SS y T6SS en todos los aislados, excepto en el aislado ambiental 20SS donde no se encontraron los genes asociados a T3SS (Figura 1), lo que se asemeja a lo que sucede con la cepa de referencia PA7 donde también están ausentes la

mayoría de los genes asociados a este sistema de secreción (Roy *et al.*, 2010). En aislados clínicos donde se encuentra ausente los genes asociados a T3SS se encuentran generalmente presentes los genes *exlA* y *exlB*. Estos genes codifican toxinas capaces de inducir la ruptura de la membrana plasmática en las células huésped (Reboud *et al.*, 2016).

Entre los efectores secretados por el T3SS está el gen *exoU*, en el cual se encontraron diferencias estadísticamente significativas, lo que indica que está presente en mayor medida en los aislados hospitalarios. *exoU* se localiza en la isla de patogenicidad 2 (PAPI -2) y codifica la proteína ExoU que es activada por la ubiquitina del huésped (Ub). Una vez activada, ExoU ejerce una actividad destructiva de la membrana que conduce a la muerte de la célula huésped (Kainuma *et al.*, 2018; Chamberlain *et al.*, 2022).

Por otra parte, se encontraron varias diferencias entre los aislados ambientales y aislados hospitalarios en los genes asociados a la biosíntesis de pili tipo IV. Este mecanismo se encuentra asociado a las células que desempeñan un papel crucial en la mediación de la adherencia bacteriana y la colonización de las superficies mucosas (Darzins & Russell, 1997). Según lo reportado en otras investigaciones la ausencia o la falta de funcionalidad de los genes asociados a este mecanismo ocasionan una reducción significativa en la colonización, la formación de biopelículas y la capacidad de propagación de *P. aeruginosa*, por lo tanto, se esperaría que estas cepas sean menos infecciosas (Belete *et al.*, 2008; Leighton *et al.*, 2015).

También se encontraron algunas diferencias en la presencia de genes asociados al mecanismo de virulencia de secreción de sideróforos. *P. aeruginosa* secreta sideróforos como pioverdina y pioquelina en condiciones de escasez de hierro (Paz *et al.*, 2019). Este mecanismo a nivel clínico es fundamental para extraer hierro de los organismos huéspedes y entregarlo a la bacteria para su metabolismo durante la etapa de infección. Xie *et al.*, (2020) reporta que la

deficiencia o ausencia de producción de sideróforos refleja una reducción de la virulencia. Además, la secreción de sideróforos es fundamental para que *P. aeruginosa* adquiera el hierro necesario para sobrevivir y para su crecimiento normal (Kirienko *et al.*, 2013). A nivel biotecnológico, el hecho que los aislados ambientales presenten en mayor medida la presencia de genes que codifican estos compuestos quelantes, resulta importante, ya que la secreción de sideróforos puede emplearse en la biorremediación de metales pesados y metaloides. Una vez quelados por sideróforos, los metales y metaloides pueden ser secuestrados a través de diferentes mecanismos extracelulares, como la biosorción y la bioacumulación, permitiendo así la eliminación de los contaminantes del medio (Roskova *et al.*, 2022).

Los genes asociados a la detección de *Quorum sensing* (QS) en *P. aeruginosa* son importantes marcadores de virulencia. Este mecanismo se basa en la comunicación intercelular que permite la adaptación de una población bacteriana a los cambios microambientales mediante la difusión de pequeñas moléculas llamadas autoinductores o acil-homoserina lactonas (AHL) a través de la membrana bacteriana (Paz *et al.*, 2019). En *P. aeruginosa* se han reportado los sistemas de detección de *Quorum sensing*; *lasI/lasR* y *rhlI/rhlR* (Kumar *et al.*, 2009; Aghamollaei *et al.*, 2015). En el caso de esta investigación se reporta la presencia de *lasI* y *rhlI* en todos los aislados, excepto *lasI* que no fue encontrado en el aislado clínico 37HRC. Se conoce que estos genes de QS activan otros genes asociados a otros factores de virulencia como *lasB* que codifica a las elastasas y el operón *rhlAB* que determina la producción de ramnolípidos (Paz *et al.*, 2019).

La biosíntesis de ramnolípidos (RL) es otro factor de virulencia que resulta importante mencionar. Como se observa en la figura 1 los genes *rhlA*, *rhlB* y *rhlC* asociados a este mecanismo se encontraron presentes en todos los aislados tanto ambientales como clínicos,

con excepción del gen *rhlC* que se encontró ausente en el aislado hospitalario 20SS. Se conoce que los genes *rhlA* y *rhlB* están organizados en el operón *rhlAB*, mientras que *rhlC* se localiza en una región del genoma distinta formando un operón con un gen que hasta el momento se desconoce su función (Wittgens *et al.*, 2011). Estos genes codifican las 2 ramnosiltransferasas involucradas en la biosíntesis de RL. En términos clínicos se ha demostrado que *P. aeruginosa* requiere la producción de RL para invadir el epitelio respiratorio. A nivel fisiológico se tiene evidencia de que son esenciales para el crecimiento de *P. aeruginosa* en sustratos hidrofóbicos además resulta importante para la colonización de los diversos hábitats ya que son capaces de reducir la tensión superficial, formar emulsiones y causar pseudosolubilización de sustratos insolubles. Estas características permiten emplear la producción de ramnolípidos en procesos de biorremediación de contaminantes como los hidrocarburos, tanto alifáticos como aromáticos, así como también de metales pesados como el plomo y el cadmio (Abdel *et al.*, 2010; Wittgens *et al.*, 2011). Cabe resaltar que, aunque mediante este estudio no se puede predecir si los genes detectados son funcionales, es evidente que independientemente de su origen, los aislados de *P. aeruginosa* conservan un amplio grupo de genes que codifican para distintos determinantes de virulencia, por lo tanto, se puede inferir que los aislados extrahospitalarios resultan ser un reservorio potencial de genes de interés para la salud de seres humanos y animales. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el éxito de infección de este patógeno también depende de las condiciones en las que se encuentra y de que sus huéspedes se encuentren inmunocomprometidos.

Por lo tanto, se sugiere que para el uso de esta especie en procesos de biorremediación de hidrocarburos y de otros contaminantes deben ser estipulados y regulados protocolos de bioseguridad con el fin de minimizar el riesgo en la salud en los entornos donde son

empleados. Pues la variedad de determinantes de virulencia en especies como *P. aeruginosa* son cruciales para la colonización de diversos ecosistemas, más allá de su papel en la infección de huéspedes humanos, lo que indicaría que algunos de estos mecanismos de patogenicidad pueden adaptarse a condiciones fluctuantes dependiendo de sus requerimientos ambientales (Alonso *et al.*, 1999; Laborda *et al.*, 2021).

En términos de resistencia a los antibióticos esta investigación deja en evidencia que los aislados ambientales y clínicos de *P. aeruginosa* comparten más de la mitad de los genes asociados a resistencia a los antibióticos (72,59%), pero también queda en evidencia que difieren en diversos grupos de genes. Entre las diferencias encontradas se puede observar en el anexo 2 la presencia únicamente en un aislado clínico los genes *oprA*, *tetC*, *golS* y *mdsB*. Estos genes se encuentran asociados a un mecanismo de resistencia intrínseco que consiste en la generación de una bomba dependiente de energía que expulsa al antimicrobiano fuera de la bacteria. El gen *oprA*, codifica un canal de membrana externa que, según lo reportado por Morita *et al.*, (2012), es poco común encontrarlo en cepas de esta especie, sin embargo, cuando está presente puede cooperar funcionalmente con el operón *mexXY* dado que no presenta un gen específico para el canal de membrana externa. La bomba de expulsión mediada por *mexXY*, es un determinante significativo de la resistencia a los aminoglucósidos, sólo en *P. aeruginosa*. El gen *tetC* codifica proteínas Tet asociadas a membrana que expulsan tetraciclinas fuera de la célula, disminuyendo la concentración intracelular del medicamento, protegiendo así los ribosomas (Jara, 2010). Los genes *golS* y *mdsB* se encuentran asociados a la bomba de expulsión MdsABC (Pontel *et al.*, 2007; Smith & Blair, 2014). Aunque la base de datos CARD reporta la presencia de estos genes en aislados hospitalarios de *P. aeruginosa*, en la literatura no se encuentran reportes de su presencia en esta especie, pero sí en especies del género *Salmonella*.

Solo en los aislados hospitalarios se encontró el gen *mexVW-OprM* el cual codifica una bomba de expulsión que recientemente se ha reportado su presencia en *P. aeruginosa* y que le confiere resistencia a una variedad de antibióticos, incluidos cloranfenicol, fluoroquinolonas y macrólidos. Esta bomba pertenece a la familia de transportadores de división de nodulación de resistencia (RND) que con frecuencia se producen en exceso en aislados clínicos (Li *et al.*, 2003; Zgurskaya *et al.*, 2022).

Otra de las principales diferencias encontradas es la presencia de los genes *kpc-2*, *tem-12* (Anexo 2), únicamente en el aislado hospitalario 46HRC, genes que según la literatura son adquiridos de plásmidos y que confieren resistencia a las carbapenemasas (Glen & Lamont, 2021).

El grupo de genes *kpc* hace parte de los principales genes plasmídicos codificadores de carbapenemasas, descritos en aislados clínicos de *P. aeruginosa* (Costa *et al.*, 2021). Las carbapenemasas son enzimas que hidrolizan antibióticos carbapenémicos y representan la familia más versátil de β -lactamasas. Según la clasificación de Ambler, este grupo de enzimas son de clase A, los cuales se caracterizan por la capacidad para hidrolizar carbapenémicos, cefalosporinas, penicilinas y aztreonam (Vera *et al.*, 2017). Según los estudios realizados la rápida propagación de las enzimas KPC se ha relacionado con la presencia de genes *kpc* en el elemento genético móvil Tn4401 y en sus isoformas, pertenecientes a la familia Tn3. El gen *kpc-2* se encuentra con mayor frecuencia en cepas clínicas en Colombia y se asocia con la isoforma Tn4401b (Cuzón *et al.*, 2011; Santella *et al.*, 2012; Kraftova *et al.*, 2021). A su vez este elemento genético móvil que contiene el gen *kpc-2* se encuentra asociado a los plásmidos IncP-6 e IncU. Estos plásmidos facilitan la transmisión de mecanismos de resistencia a diferentes tipos de bacterias ya que pueden replicarse tanto en *P. aeruginosa* como en enterobacterias (Vanegas & Jiménez, 2013).

El grupo de genes *tem* son los encargados de conferir a la bacteria resistencia contra las cefalosporinas de tercera generación, mediante la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Haider *et al.*, 2022). Los genes *TEM* están entre los genes de BLEE más importantes en *P. aeruginosa* y pertenecen a la clase molecular A, grupo 2be de la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros (Militza Guzmán *et al.*, 2013; Haghighifar *et al.*, 2021). Los genes codificadores de enzimas BLEE como lo son el grupo de genes *tem* han sido encontrados en diversas regiones a nivel mundial y el éxito de su diseminación se le atribuye a su ubicación en plásmidos, los cuales pueden transferir resistencia antimicrobiana a cepas de la misma especie o a especies diferentes, situación que complica la terapia de infecciones causadas por este tipo de bacterias productoras de BLEE (Militza *et al.*, 2013).

El gen *oxa-2*, también codifica β -lactamasas de espectro extendido y según la clasificación de Ambler pertenecen a la clase molecular D y al grupo funcional 2d. Las enzimas que este gen codifica se caracterizan por su alto espectro de actividad hidrolítica frente a la cloxacilina y la oxacilina, y son poco inhibidas por el ácido clavulánico (Maurya *et al.*, 2015). Los genes *pdc* son variantes de tipo AmpC y también codifican para β -lactamasas de clase C de espectro extendido (Rodríguez *et al.*, 2009). Según lo reportado por Castanheira *et al.*, (2022) la sobreexpresión de la cefalosporinasa cromosómica (PDC) genera resistencia a la mayoría de las cefalosporinas y, en menor medida, al imipenem. Según los resultados de esta investigación se encontró diferencias estadísticamente significativas en el gen *pdc-3*, lo que indica que este gen está presente en mayor medida en aislados ambientales.

Otro hallazgo importante, es la presencia de genes que son adquiridos por plásmidos, únicamente en aislados hospitalarios y que le confieren a la bacteria enzimas modificadoras de aminoglucósidos. En este grupo podemos encontrar los genes *aph(3'')-I*, *aph(6)-Ic/aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib* y *aph(6)-Id* (Anexo 2). Estos genes codifican enzimas capaces de inactivar los

aminoglucósidos mediante su fosforilación. Se ha informado que la diseminación de estos plásmidos que confieren resistencia a este tipo de antibióticos es a nivel de interespecie y que además se encuentra favorecida por la presión selectiva que se ejerce en los ambientes hospitalarios, debido al constante uso de estos antibióticos (Mella *et al.*, 2004; Fong & Berghuis, 2009), lo que explica porque no fueron hallados en aislados ambientales y sí en algunos aislados clínicos. Otro gen que confiere resistencia a aminoglucósidos es *aadA6* y que en este estudio se encontró en el aislado hospitalario 46HRC. Papadovasilaki *et al.*, (2015), reporta la presencia de este gen en el integrón In118, en un aislado clínico multirresistente de *P. aeruginosa* Ps100.

En este estudio también se reporta la presencia en algunos aislados hospitalarios el gen *pvrR*, el cual codifica una proteína reguladora (PvrR) que según lo reportado por Drenkard & Ausubel, (2002) modula el cambio fenotípico de formas resistentes a formas susceptibles a los antibióticos, así como también regula la formación de biopelículas. Se conoce que el gen *pvrR* se encuentra en la isla de patogenicidad 1 (PAPI-1) (Merighi & Lory, 2006). Según las investigaciones realizadas a *P. aeruginosa* PA14, una cepa clínica altamente patógena, PAPI-1 se encuentra en el plásmido pUM505, el cual le confiere a la bacteria no sólo genes de resistencia a antibióticos, sino también genes de virulencia (Román, 2021).

Por último, se encontró en el aislado hospitalario 46HRC el gen *sul1*, el cual se encuentra asociado a resistencia a las sulfonamidas. Soufi *et al.*, (2011), reporta que este gen se ha detectado en integrones de clase 1, qué son los integrones más frecuentemente detectados en *Enterobacteriaceae*. Ruiz *et al.*, (2011), reporta que es común encontrar este gen en aislados clínicos de *P. aeruginosa* ya que se exhibe una alta correlación entre la presencia de un integrón de clase 1 y perfiles resistentes al sulfametoxazol.

Según lo reportado en Martínez (2009) la resistencia intrínseca que poseen los aislados

ambientales de patógenos oportunistas como *P. aeruginosa* resulta de gran importancia para la colonización de la rizosfera, un hábitat que puede contener compuestos tóxicos producidos por las plantas o la microbiota asociada, así como también la colonización de una gran diversidad de hábitats. Al compartir gran parte de estos genes de resistencia con aislados hospitalarios se cree que el fenotipo de resistencia intrínseca que presentan algunos patógenos oportunistas de origen ambiental ha sido adquirido durante la evolución de estos microorganismos en sus hábitats naturales, mucho antes del descubrimiento humano de los antibióticos. Por otra parte, también es evidente que los aislados ambientales y los aislados hospitalarios de *P. aeruginosa* difieren en un diverso grupo de genes, esto se debe posiblemente a que en los aislados clínicos se favorece la selección y diseminación de la resistencia a los antibióticos por el uso inapropiado e indiscriminado de los mismos, generando así presión selectiva en los ambientes hospitalarios (Maldonado *et al.*, 2014; Hernández & Hernández, 2016).

CONCLUSIONES

Pseudomonas aeruginosa independientemente de su origen posee un amplio arsenal de genes que le confiere múltiples mecanismos de resistencia a antibióticos y mecanismos de virulencia, lo que explica por qué es considerada como una de las bacterias patógenas más importantes a nivel mundial. Según los resultados de esta investigación se puede afirmar que la mayoría de los determinantes de virulencia, que proporcionan a *P. aeruginosa* la capacidad de infectar a diferentes huéspedes y ecosistemas, están codificados en su genoma central. Por lo tanto, se puede inferir que los aislados extrahospitalarios resultan ser un reservorio potencial de genes de interés para la salud de seres humanos y animales. Aunque, se debe tener en cuenta que el éxito de infección de este patógeno también depende de las condiciones

en las que se encuentra y de que sus huéspedes puedan estar inmunocomprometidos. Por otra parte, mediante este estudio se evidenció que, aunque los aislados hospitalarios comparten un gran número de genes asociados a resistencia antimicrobiana con aislados ambientales también difieren en un amplio grupo de genes, esto se debe posiblemente a la presión selectiva que se ejerce en los ambientes hospitalarios por el constante uso de antibióticos. Por lo cual se sugiere para limitar el surgimiento y la diseminación de la resistencia a los antibióticos en esta bacteria realizar investigaciones interdisciplinarias donde se integren aspectos de la práctica clínica animal y humana con el manejo de residuos, en especial los desechos hospitalarios, que al entrar en contacto con el ambiente natural potencian la interacción microbiana y el intercambio de información genética.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Valle por la financiación del proyecto, mediante convocatoria interna, con código CI: 71218. A los profesores y personal de apoyo de la Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología por permitirme generar conocimiento previo para la realización de este estudio.

LITERATURA CITADA

- Abdel, A. M., Lépine, F. & Déziel, E. (2010) 'Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(5), pp. 1323–1336. doi: 10.1007/S00253-010-2498-2/TABLES/2.
- Aghamollaei, H., Moghaddam, M., Kooshki, H., Heiat, M., Mirnejad, R & Barzi, N. (2015) 'Detection of *Pseudomonas aeruginosa* by a triplex polymerase chain reaction assay based on *lasI/R* and *gyrB* genes', *Journal of Infection and Public Health*, 8(4), pp. 314–322. doi: 10.1016/J.JIPH.2015.03.003.
- Alcock, B. P. *et al.* (2020) 'CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database', *Nucleic acids research*, 48(D1), pp. D517–D525. doi: 10.1093/NAR/GKZ935.
- Alikhan, N. (2011) 'BRIG 0.95 Manual', pp. 1–53.

- Alonso, A., Rojo, F. & Martínez, J. L. (1999) 'Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin.', *Environmental microbiology*, 1(5), pp. 421–430. doi: 10.1046/j.1462-2920.1999.00052.x
- Amábile, C. F. (2015) 'Antibiotics and antibiotic resistance in the environment'. Londres: CRC Press. doi: 10.1201/b19549
- Andrews, S. (2010) 'FastQC: una herramienta de control de calidad para datos de secuencia de alto rendimiento'. Available at: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> [Accessed 17 May 2021].
- Antonopoulos, D. A. *et al.* (2019) 'PATRIC as a unique resource for studying antimicrobial resistance', *Briefings in bioinformatics*, 20(4), pp. 1094–1102. doi: 10.1093/BIB/BBX083.
- Azam, M. W. & Khan, A. U. (2019) 'Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*', *Drug Discovery Today*, 24(1), pp. 350–359. doi: 10.1016/J.DRUDIS.2018.07.003.
- Battle, S. Meyer, F., Rello, J., Kung, V. & Hauser, A. (2008) 'Hybrid pathogenicity island PAGI-5 contributes to the highly virulent phenotype of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in mammals', *Journal of Bacteriology*, 190(21), pp. 7130–7140. doi: 10.1128/JB.00785-08.
- Belete, B., Lu, H. & Wozniak, D. J. (2008) '*Pseudomonas aeruginosa* AlgR regulates type IV pilus biosynthesis by activating transcription of the *fimU-pilVWXY1Y2E* operon', *Journal of Bacteriology*, 190(6), pp. 2023–2030. doi: 10.1128/JB.01623-07/ASSET/E7516F2B-B408-4FA0-AC35-F2A282C1ADB7/ASSETS/GRAPHIC/ZJB0060876410004.JPEG.
- Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. (2014) 'Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data', *Bioinformatics*, 30(15), pp. 2114–2120. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTU170.
- Castanheira, M. Doyle, T., Hubler, C., Collingsworth, T., DeVries, S. & Mendes, R. (2022) 'The plethora of resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: transcriptome analysis reveals a potential role of lipopolysaccharide pathway proteins to novel β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations', *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 31, pp. 72–79. doi: 10.1016/J.JGAR.2022.07.021.
- Chamberlain, K. Johnson, M., Reid, T. & Springer, T. (2022) 'Utilizing in silico and in vitro methods to identify possible binding sites of a novel ligand against *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase toxin ExoU', *Biochemistry and Biophysics Reports*, 29, p. 101188. doi: 10.1016/J.BBREP.2021.101188.
- Costa-Júnior, S. da Silva, A., Niedja da Paz Pereira, J., da Costa Lima, J., Cavalcanti, I. & Maciel, M. (2021) 'Emergence of *rmtD1* gene in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* carrying *bla* KPC and/or *bla* VIM-2 genes in Brazil', *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), pp. 1959–1965. doi: 10.1007/s42770-021-00576-2
- Crone, S., *et al.* (2019) 'The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*'. *APMIS*, 128 (3), pp. 220-231.

- Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T. & Dowson, C (2004) 'Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*'. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), pp.5644-5649. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004>
- Cuzón, G. Naas, T., Villegas, M., Correa, A., Quinn, J. & Nordmann, P. (2011) 'Wide Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Producing β -Lactamase blaKPC-2 Gene in Colombia', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), p. 5350. doi: 10.1128/AAC.00297-11.
- Darzins, A. & Russell, M. A. (1997) 'Molecular genetic analysis of type-4 pilus biogenesis and twitching motility using *Pseudomonas aeruginosa* as a model system – a review', *Gene*, 192(1), pp. 109–115. doi: 10.1016/S0378-1119(97)00037-1.
- Davis, J. J. *et al.* (2020) 'The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities', *Nucleic Acids Research*, 48(D1), p. D606. doi: 10.1093/NAR/GKZ943
- del Barrio, E., López, C. & Oliver, A. (2020) '*Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with horizontally-acquired β -lactamases: 2020 update', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 56(6), p. 106196. doi: 10.1016/J.IJANTIMICAG.2020.106196.
- Drenkard, E. & Ausubel, F. M. (2002) 'Pseudomonas biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation', *Nature* 2002 416:6882, 416(6882), pp. 740–743. doi: 10.1038/416740a.
- Equipo de RStudio. (2020) '*RStudio: entorno de desarrollo integrado para R*', Boston, MA. Disponible en: <http://www.rstudio.com/>.
- Fong, D. H. & Berghuis, A. M. (2009) 'Structural basis of APH (3')-IIIa-mediated resistance to N1-Substituted Aminoglycoside Antibiotics', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(7), pp. 3049–3055. doi: 10.1128/AAC.00062-09
- Foulkes, D. McLean, K., Haneef, A., Fernig, D., Winstanley, C., Berry, N. & Kaye, S. (2019) '*Pseudomonas aeruginosa* Toxin ExoU as a Therapeutic Target in the Treatment of Bacterial Infections', *Microorganisms*, 7(12). doi: 10.3390/MICROORGANISMS7120707.
- Glen, K. A. & Lamont, I. L. (2021) ' β -lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Future Prospects', *Pathogens*, 10(12). doi: 10.3390/PATHOGENS10121638/S1.
- Gomila, M. *et al.* (2013) 'Genetic diversity of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a public hospital in Spain', *BMC Microbiology*, 13(1), p. 138. doi: 10.1186/1471-2180-13-138.
- González, T. & Benítez, N. (2019) 'Evaluación de la capacidad de biodegradación de diésel y de factores de virulencia en dos cepas bacterianas hidrocarburoclásticas'. Cali: Universidad del Valle.
- Haghighifar, E., Dolatabadi, R. K. & Norouzi, F. (2021) 'Prevalence of blaVEB and blaTEM genes, antimicrobial resistance pattern and biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from burn patients in Isfahan, Iran', *Gene Reports*, 23, p. 101157. doi: 10.1016/J.GENREP.2021.101157.

- Haider, M. H. *et al.* (2022) 'Detection of carbapenemases blaOXA48-blaKPC-blaNDM-blaVIM and extended-spectrum- β -lactamase blaOXA1-blaSHV-blaTEM genes in Gram-negative bacterial isolates from ICU burns patients', *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2022 21:1, 21(1), pp. 1–8. doi: 10.1186/S12941-022-00510-W.
- Hernández, D. V & Hernández, A. (2016) 'Resistencia a los antibióticos, una amenaza latente', *Revista Aire Libre*, 4, pp. 29–40. Available at: <https://revia.areandina.edu.co/index.php/RAL/article/view/1014>.
- Horna, G. & Ruiz, J. (2021) 'Type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*', *Microbiological Research*, 246, p. 126719. doi: 10.1016/J.MICRES.2021.126719.
- Illumina. (2019) 'Nextera XT DNA Library Prep Reference Guide'. [ebook] Illumina, Inc. All rights reserved. Available at: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_nextera/nextera-xt/nextera-xt-library-prep-reference-guide-15031942-05.pdf [Accessed 1 Oct 2021].
- Jara, M. (2010) 'Tetraciclinas: un modelo de resistencia antimicrobiana', *Avances en Ciencias Veterinarias*, 22(1–2), pp. 49–55. doi: 10.5354/0716-260x.2007.915.
- Ji, Y. C. *et al.* (2002) 'Identification of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational difference analysis', *Journal of Bacteriology*, 184(4), pp. 952–961. doi: 10.1128/jb.184.4.952-961.2002.
- Kainuma, A. *et al.* (2018) 'An outbreak of fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST357 harboring the *exoU* gene', *Journal of Infection and Chemotherapy*, 24(8), pp. 615–622. doi: 10.1016/J.JIAC.2018.03.008.
- Kenneth, R. & George, R. (2011) 'Microbiología médica Sherris'. 5a ed. Mexico: Mac Graw Hill, p. 485
- Kirienko, N. V. *et al.* (2013) '*Pseudomonas aeruginosa* Disrupts *Caenorhabditis elegans* Iron Homeostasis, Causing a Hypoxic Response and Death', *Cell Host & Microbe*, 13(4), pp. 406–416. doi: 10.1016/J.CHOM.2013.03.003.
- Kos, V. *et al.* (2015) 'The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(1), pp. 427–436. doi: 10.1128/AAC.03954-14.
- Kraftova, L. *et al.* (2021) 'Evidence of an epidemic spread of KPC-producing Enterobacterales in Czech hospitals', *Scientific Reports* 2021 11:1, 11(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-021-95285-z.
- Kumar, R., Chhibber, S. & Harjai, K. (2009) 'Quorum sensing is necessary for the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during urinary tract infection', *Kidney International*, 76(3), pp. 286–292. doi: 10.1038/KI.2009.183/ATTACHMENT/3635C86B-C5B7-4312-BC33-5926AE6922EE/MMC4.DOC.
- Kung, V. L., Ozer, E. A. & Hauser, A. R. (2010) 'The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*', *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 74(4), p. 621. doi: 10.1128/MMBR.00027-10.

- Laborda, P. *et al.* (2021) 'Pseudomonas aeruginosa: an antibiotic resilient pathogen with environmental origin', *Current Opinion in Microbiology*, 64, pp. 125–132. doi: 10.1016/J.MIB.2021.09.010.
- Leighton, T. L. *et al.* (2015) 'Biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili and regulation of their function', *Environmental Microbiology*, 17(11), pp. 4148–4163. doi: 10.1111/1462-2920.12849.
- Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., Chen, L. & Yang, J. (2009) 'VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface', *Nucleic Acids Research*, Volume 47, pp. D687–D692, <https://doi.org/10.1093/nar/gky1080>
- Li, Y. *et al.* (2003) 'A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW–OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(4), pp. 572–575. doi: 10.1093/JAC/DKG390.
- Luján, D. (2019) 'Uso de *Pseudomonas aeruginosa* en biorremediación', *BioTecnología*, 23(1), pp. 32–42.
- Magiorakos, A. P. *et al.* (2012) 'Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance', *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), pp. 268–281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Maldonado, N. A. *et al.* (2014) 'Tendencias de la resistencia a antibióticos en Medellín y en los municipios del área metropolitana entre 2007 y 2012', *Biomédica*, 34, pp. 433–446.
- Martinez, J. L. (2009) 'The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1667), pp. 2521–2530. doi: 10.1098/RSPB.2009.0320.
- Maurya, A. P. *et al.* (2015) 'Genetic environment of OXA-2 beta-lactamase producing Gram-negative bacilli from a tertiary referral hospital', *The Indian Journal of Medical Research*, 141(3), p. 368. doi: 10.4103/0971-5916.156584.
- Mayz, J. C. & Manzi, L. V. (2017) 'Bacterias hidrocarburoclásticas del género *Pseudomonas* en la rizosfera de Samanea saman (Jacq.) Merr.', *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), pp. 29–37. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.57408.
- McAulay, K. *et al.* (2021) 'Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in healthcare facilities in Port-au-Prince, Haiti', *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 25, pp. 60–65. doi: 10.1016/j.jgar.2021.02.016.
- Mella M., S. *et al.* (2004) 'Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia', *Revista chilena de infectología*, 21(4), pp. 330–338. doi: 10.4067/S0716-10182004000400007.
- Merighi, M. & Lory, S. (2006) 'Second messenger c-di-GMP signaling in *Pseudomonas aeruginosa*', *Pseudomonas*, 6, pp. 97–138. doi: 10.1007/978-90-481-3909-5_4/FIGURES/4_9_193112_1_EN.
- Militza Guzmán, L. *et al.* (2013) 'Genes *blaTEM*, *blaSHV* y *blaCTX-M* en enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria', *Investigacion Clinica (Venezuela)*, 54(3), pp. 235–245.

- Available at: http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0535-51332013000300002&script=sci_arttext (Accessed: 29 June 2022).
- MiSeq™ System (2021) ‘Velocidad y simplicidad para la resecuenciación selectiva y la secuenciación de genomas pequeños.’, pp. 1–5.
- Morita, Y., Tomida, J. & Kawamura, Y. (2012) ‘Mexxy multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*’, *Frontiers in Microbiology*, 3(NOV), p. 408. doi: 10.3389/FMICB.2012.00408/BIBTEX.
- 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), p. 100999. doi: 10.1016/j.genrep.2020.100999.
- Oliver, A. *et al.* (2015) ‘The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones’, *Drug Resistance Updates*. Churchill Livingstone, pp. 41–59. doi: 10.1016/j.drug.2015.08.002.
- Papadovasilaki, M., Oberthür, D., Gessmann, R., Sarrou, L., Betzel, C., Scoulica, E. & Petratos, K. (2015) ‘Biophysical and enzymatic properties of aminoglycoside adenylyltransferase AadA6 from *Pseudomonas aeruginosa*’, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 4(215), pp. 152–157. doi: 10.1016/j.bbrep.2015.09.011
- Paz, V. M. *et al.* (2019) ‘*Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria’, *Revista chilena de infectología*, 36(2), pp. 180–189. doi: 10.4067/s0716-10182019000200180.
- Pontel, L., Pérez, M., Espariz, M., Checa, S. & Soncinil, F. (2007) ‘GolS controls the response to gold by the hierarchical induction of *Salmonella*-specific genes that include a CBA efflux-coding operon’, *Molecular Microbiology*, 66(3), pp. 814–825. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05963.x.
- QIAGEN (2013) ‘DNeasy Blood & Tissue Kits’. Available at: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit/> (Accessed: 21 November 2022).
- Qin, S. *et al.* (2022) ‘*Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics’, *Signal Transduction and Targeted Therapy* 7:1, 7(1), pp. 1–27. doi: 10.1038/s41392-022-01056-1.
- Rachhpal, K. (2016) ‘*Pseudomonas*: Molecular and Applied Biology’, Human Press: London. *Springer International Publishers*. 127–191p
- Reboud, E. *et al.* (2016) ‘Phenotype and toxicity of the recently discovered exlA-positive *Pseudomonas aeruginosa* strains collected worldwide’, *Environmental Microbiology*, 18(10), pp. 3425–3439. doi: 10.1111/1462-2920.13262.
- Rodríguez, J. M., Poirel, L. & Nordmann, P. (2009) ‘Extended-Spectrum Cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*’, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5), p. 1766. doi: 10.1128/AAC.01410-08.

- Román, B. Y. (2021) 'Caracterización molecular y funcional de genes del plásmido pum505 que participan en resistencia a quinolonas y en virulencia'. Morelia: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Roskova, Z., Skarohlid, R. & McGachy, L. (2022) 'Siderophores: an alternative bioremediation strategy?', *Science of The Total Environment*, 819, p. 153144. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2022.153144.
- Roy, P. H. et al. (2010) 'Complete Genome Sequence of the Multiresistant Taxonomic Outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7', *PLoS ONE*, 5(1), p. 8842. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0008842.
- Ruiz, L., López, L., Fusté, E., Vinuesa, T., Martínez, J. & Viñas, M. (2007) '*Pseudomonas aeruginosa*: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos', *Universidad de Barcelona*, Tesis doct, pp. 7–9.
- Ruiz, L. et al. (2011) 'Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*'. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38(5), pp. 398–402. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.06.016.
- Santella, G. et al. (2012) 'First clonal spread of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Buenos Aires, Argentina', *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), pp. 2003–2005. doi: 10.1016/J.MEEGID.2012.03.022.
- Seemann, T. (2014) 'Prokka: rapid prokaryotic genome annotation', *Bioinformatics*, 30(14), pp. 2068–2069. doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTU153.
- Silby, M. W. et al. (2011) 'Pseudomonas genomes: diverse and adaptable', *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4), pp. 652–680. doi: 10.1111/J.1574-6976.2011.00269.X.
- Slekovec, C., Plantin, J., Cholley, P., Thouverez, M., Talon, D., Bertrand, X. & Hocquet, D. (2012) 'Tracking Down Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in a Wastewater Network', *PLoS ONE*. Edited by H. Rohde, 7(12), p. e49300. doi:10.1371/journal.pone.0049300.
- Smith, H. E. & Blair, J. M. A. (2014) 'Redundancy in the periplasmic adaptor proteins AcrA and AcrE provides resilience and an ability to export substrates of multidrug efflux', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(4), pp. 982–987. doi: 10.1093/jac/dkt481.
- Soufi, L., Sáenz, Y., Vinué, L., Abbassi, M., Ruiz, E., Zaraga, M., Hassen, A., Hammami, S. & Torres, C (2011) '*Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons', *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), pp. 497–502. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.008.
- Subedi, D. et al. (2018) 'Comparative genomics of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different geographic sites', *Scientific Reports 2018* 8:1, 8(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-018-34020-7.
- Tenover, F. C. et al. (1995) 'Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing', *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), pp. 2233–2239. doi: 10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995.

- Vanegas, J. & Jiménez, J. (2014) 'Principales características de la genética bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* que contribuyen con su patogénesis y resistencia', *Hechos Microbio* 4(2), pp. 98–105.
- Vera-Leiva, A. *et al.* (2017) 'KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias', *Revista chilena de infectología*, 34(5), pp. 476–484. doi: 10.4067/S0716-10182017000500476
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L. & Holt, K. E. (2016) 'Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads', *bioRxiv*, p. 096412. doi: 10.1101/096412.
- Wittgens, A. *et al.* (2011) 'Growth independent rhamnolipid production from glucose using the non-pathogenic *Pseudomonas putida* KT2440', *Microbial Cell Factories*, 10, p. 80. doi: 10.1186/1475-2859-10-80.
- Wolfgang, M., Kulasekara, B., Liang, X., Boyd, D., Wu, K., Yang, Q., Miyada, C. & Lory, S. (2003) 'Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*', *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 8;100(14):8484-9. doi: 10.1073/pnas.0832438100.
- Xie, F. *et al.* (2020) 'Generation of Fluorinated Amychelin Siderophores against *Pseudomonas aeruginosa* Infections by a Combination of Genome Mining and Mutasynthesis', *Cell Chemical Biology*, 27(12), pp. 1532-1543.e6. doi: 10.1016/J.CHEMBIOL.2020.10.009.
- Zgurskaya, H. I., Adamiak, J. W. & Leus, I. V. (2022) 'Making sense of drug-efflux transporters in the physiological environment', *Current Opinion in Microbiology*, 69, p. 102179. doi: 10.1016/J.MIB.2022.102179.

Tabla 1. Aislados ambientales de *P. aeruginosa* seleccionadas para el estudio.

Aislado	Localización	Tipo de muestra
pt2b	Agua planta de tratamiento punto 2 PTAR Ginebra, salida laguna anaerobia	Agua residual
pt3	Agua planta de tratamiento PTAR Ginebra, laguna facultativa	Agua residual
pt12a	Agua planta de tratamiento PTAR Ginebra, entrada laguna anaerobia	Agua residual
si33	Suelo cultivo caña de azúcar sur Cali punto 3	Suelo de alta intervención
sni99	Suelo estación experimental Universidad del Valle punto 9	Suelo de baja intervención
srp10.1	Suelo río Pance punto 10	Suelo de baja intervención
srp75	Suelo río Pance punto 7 aislado 5	Suelo de baja intervención

Tabla 2. Aislados clínicos de *P. aeruginosa* seleccionadas para el estudio.

Aislado	MLST*	Localización del hospital	Tipo de infección
10SS*	253	Medellín	Aguda
11SS	1758	Pereira	Aguda
20SS	1978	Barranquilla	Aguda
23SS	1677	Bogotá	Aguda
31HRC*	235	Ibagué	Aguda
37HRC	111	Bucaramanga	Aguda
46HRC	235	Bogotá	Aguda

*MLST: Tipificación Multilocus de Secuencias *SS: Sensible *HRC: Clones de alto riesgo

Tabla 3. Características generales del genoma de los aislados ambientales y hospitalarios de *P. aeruginosa*.

Origen del aislado	Nombre	Longitud del genoma (Millones de pb)	CDs*	Contenido de G+C (%)
Ambiental	pt3	6,2	5860	66,6
	pt12a	6,5	6099	66,2
	pt2b	6,3	5949	66,5
	srp10.1	6,3	5890	66,5
	sni99	6,2	5892	66,5
	srp75	6,2	5907	66,5
	si33	6,2	5841	66,6
Clínico	37HRC	6,6	6406	66,0
	46HRC	6,7	6488	66,1
	23SS	6,4	6017	66,5
	11SS	7,0	6845	66,0
	20SS	6,3	6087	66,6
	10SS	6,9	6633	66,0
	31HRC	6,8	6535	66,0

*CDs: Secuencias codificantes

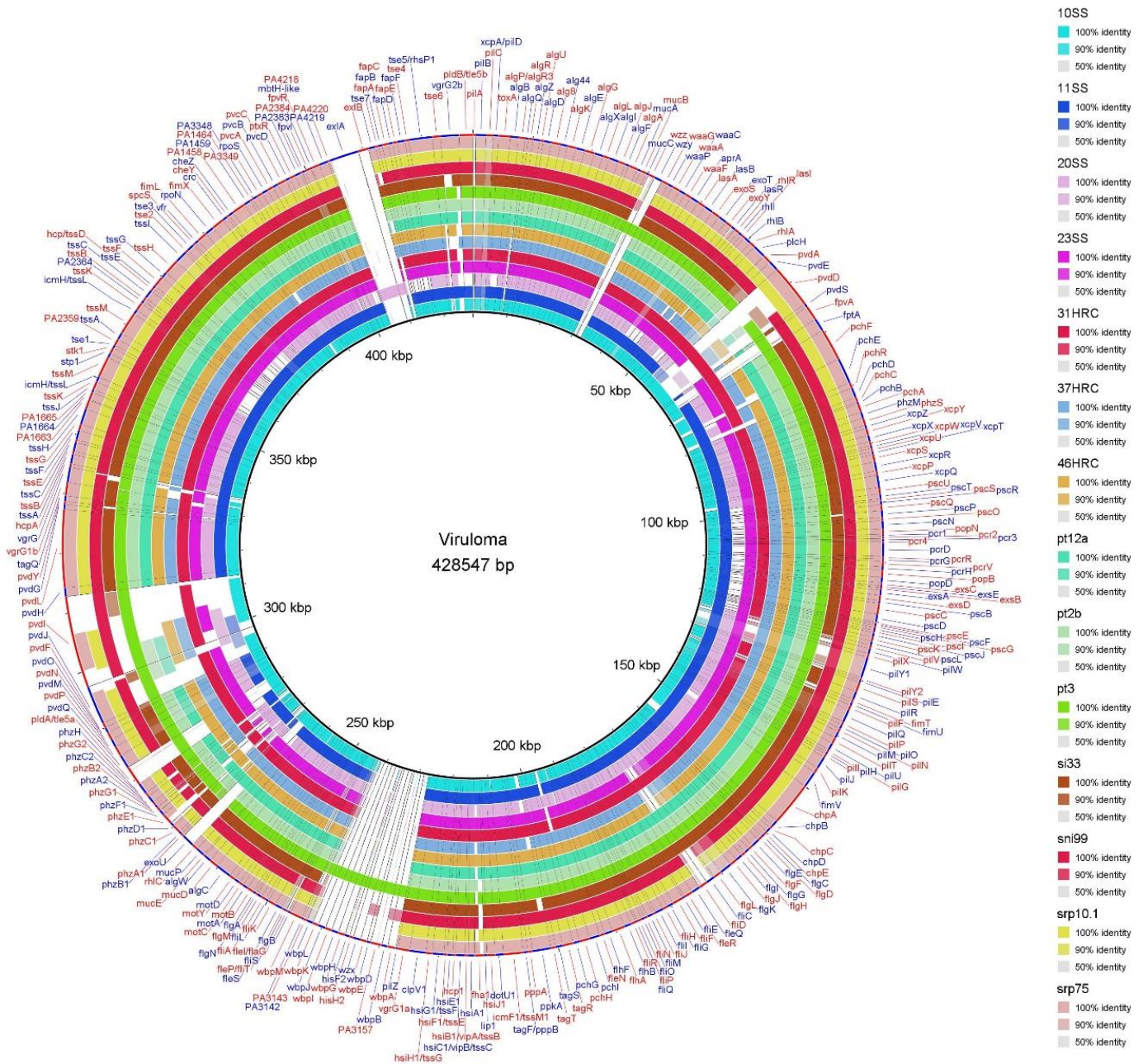


Figura 1. Comparación de los genes asociados a factores de virulencia. Mapa circular que representa el genoma de 14 aislados de *P. aeruginosa* del ambiente natural y clínico. Cada color representa un genoma, los primeros 7 de adentro hacia fuera corresponden a los aislados clínicos y los siguientes 7 los genomas de aislados ambientales.