

**Caracterización genómica de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa*
multidrogorresistentes establecidos en un Hospital de tercer nivel en Bogotá
D.C., Colombia.**

Laura Picón^{1,2}, Cristian Rodríguez¹, Mauricio Bernal¹, Andrés Rincón², Marina Muñoz¹ y
Emiliano Barreto¹

1. Instituto de Biotecnología - UN (IBUN), Universidad Nacional de Colombia
2. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Resumen

Las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) han cobrado relevancia en salud pública a nivel global por la creciente frecuencia de infección en múltiples regiones. Este panorama es aún más crítico en bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*. Esta especie coloniza ambientes hospitalarios y dispositivos médicos (como catéteres y ventiladores mecánicos), generando infecciones crónicas en pacientes, incluyendo con fibrosis quística, infecciones en heridas, entre otras problemáticas de importancia en salud.

En el presente estudio, se analizó la arquitectura genómica de 10 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital de tercer nivel en Bogotá D. C. - Colombia a partir de la secuenciación de genoma completo y la tipificación de secuencias multilocus (MLST) centrándose en su asignación intrataxa diversidad genómica e identificación de

perfiles moleculares con descripción de dinámica de transmisión a nivel microgeográfico y global.

En este estudio, se evidenció la dispersión por diferentes servicios hospitalarios y periodos de tiempo, también se identificaron seis tipos de secuencia (ST), de los cuales cuatro se asignaron a complejos clonales, mientras que dos ST correspondieron a singletons, al no ser incluidos en ningún grupo clonal. De las secuencias identificadas, ST111 y ST235 han sido previamente reportados en Colombia con alta presencia intrahospitalaria y mientras que ST663, ST357, ST2211, ST1290, ST2148 tienen en otros países, sin embargo, cuatro secuencias no lograron ser clasificadas.

Esta investigación pone en manifiesto la necesidad de establecer sistemas de vigilancia basadas en nuevas tecnologías para rastrear la propagación de clones y estudiar la diseminación de *Pseudomonas aeruginosa*.

Palabras claves: *Pseudomonas aeruginosa*, secuenciación, epidemiología, MLST, complejos clonales.

Abstract

Healthcare-associated infections (HAIs) have gained relevance in public health at a global level due to the increasing frequency of infection in multiple regions. This panorama is even more critical in Gram-negative bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*. This species colonizes hospital environments and medical devices (such as catheters and mechanical ventilators), generating chronic infections in patients, including chemical fibrosis and wound infections, among other important health problems.

In the present study, the genomic architecture of 10 *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a tertiary hospital in Bogotá D.C. - Colombia was analyzed from whole genome

sequencing and multilocus sequence typing (MLST) focusing on their intrataxa diversity, genomic assignment and identification of molecular profiles that provide the description of their transmission dynamics at microgeographic and global levels.

In this study, the dispersion across different hospital services and time periods was evidenced, six sequence types (ST) were also identified, of which four were assigned to clonal complexes, while two ST corresponded to singletons, as they were not included in any clonal group. Of the identified sequences, ST111 and ST235 have been previously reported in Colombia with a high intra-hospital presence and while ST663, ST357, ST2211, ST1290, ST2148 have been reported in other countries, however, four sequences could not be classified.

This research highlights the need to establish surveillance systems based on new technologies to track the spread of clones and study the dissemination of *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, sequencing, epidemiology, MLST, clonal complexes.

1. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) consolida los reportes de resistencia y brotes de microorganismos relevantes a nivel clínico a nivel global. Esta organización ha propuesto un acrónimo para las bacterias de importancia actual en salud global denominado grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp*), a

partir del cual elaboró un comunicado para el año 2021 denominado “Patógenos multirresistentes que son primarios para la OMS”. En dicho comunicado se definieron los siguientes tres grupos: Prioridad-1 (crítica), Prioridad-2 (elevada) y Prioridad-3 (media), entre los cuales *Pseudomonas aeruginosa* fue clasificada en el de mayor prioridad, siendo definida como en “estado crítico”, debido a su resistencia a los carbapenémicos, frecuencia de detección y facilidad de transmisión (1,2)

Para el año 2024, la OMS publicó una nueva lista de bacterias prioritarias, ubicando a *P. aeruginosa* en el segundo grupo denominado “High group”, este grupo se caracteriza por presentar resistencia a un grupo de antibióticos (carbapenémicos). Sin embargo, esta clasificación se limita a algunas regiones geográficas, determinadas por la OMS dejando afuera algunos países que no realizan estudios moleculares que permitan el reporte epidemiológico en tiempo real, como es el caso de Colombia (3)

Debido a la emergencia en salud relacionada en la actualidad, principalmente por bacterias patógenas, la OMS en alianza con la Organización Panamericana de la Salud (OPS), generó una plataforma llamada ReLAVRA (Red Latinoamericana y del Caribe de Vigilancia de la resistencia antimicrobiana), en donde se consigna cada año el número de aislamientos, la resistencia fenotípica a ciertos antibióticos y los laboratorios de referencia por cada país. Este sistema permite generar un panorama de las resistencias más reportadas, pero muchos de estos reportes carecen de análisis moleculares y/o de secuenciación de nueva generación, que permitan estudiar el evento con un enfoque más preciso.

En Colombia, el Ministerio de Salud ha establecido lineamientos para el manejo de la resistencia antimicrobiana, a partir de los datos consolidados por el Instituto Nacional de

Salud. Estos datos se centralizan a través del sistema de vigilancia epidemiológica, obteniendo datos anuales de laboratorios de salud pública, hospitales y laboratorios de referencia, con caracterización molecular de las notificaciones reportadas. Esto ha permitido identificar la emergencia actual, la dispersión y dinámica de los diferentes mecanismos de virulencia y resistencia, evidenciando la importancia de notificar y realizar estudios epidemiológicos con mayor frecuencia, incluyendo diferentes zonas de cada país (4).

Las infecciones causadas por *P. aeruginosa* se correlacionan con infecciones urinarias, infecciones en pacientes inmunosuprimidos, neumonías de gravedad y pacientes con fibrosis quística (5). También se han identificado factores que generan disposición a sufrir una infección grave como la edad, antecedentes clínicos, enfermedades crónicas como diabetes, permanencia extendida en los centros hospitalarios, entre otros (6); por ello su monitoreo epidemiológico es de gran importancia.

La tipificación de secuencias de múltiples loci (MLST) es una herramienta molecular que utiliza siete marcadores moleculares correspondientes a secciones de genes de “mantenimiento”, usada para generar una tipificación intratixa (7). Al realizar esta clasificación se determinan clones que almacenan diferente información con un aporte significativo y dispersión a nivel global permitiendo un rastreo epidemiológico, esto se realiza por medio de herramientas como pubMLST (<https://pubmlst.org/organisms/pseudomonas-aeruginosa>) (8), la cual utiliza siete genes de “mantenimiento” que hacen parte del esquema (aroE, acsA, guaA, mutL, nuoD, ppsA y trpE).

Pseudomonas aeruginosa posee un genoma de entre 5 a 7 Mega bases, el cual está compuesto por un genoma central (genes conservados con codificación de las funciones esenciales) y uno accesorio (conjunto de genes que brindan ventajas adaptativas al microorganismo y pueden ganar/perder eventualmente) (9). Esta última característica puede conferir una elevada plasticidad genómica, potencialmente asociada a capacidad de adaptación a diferentes ambientes, así como el intercambio de genes asociados con virulencia y resistencia a antibióticos (10). La frecuencia de infección de *P. aeruginosa* ha aumentado debido a su resistencia a antibióticos, por lo que se han realizado diferentes estudios a nivel genómico que permiten dar un panorama acerca de su dispersión (8). Dentro de dichas investigaciones se destacan estudios epidemiológicos en los que se realizó la clasificación a nivel de ST, identificando el ST463 con el gen bla KPC-2 (12).

En otras partes del mundo como China, se realizó un seguimiento epidemiológico con pacientes de estancia larga en UCI en donde se les tomaron muestras en diferentes momentos de su estancia hospitalaria utilizando Illumina. Se encontraron 10 complejos clonales, de los cuales dos clones tenían un número mayor de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y variaciones en secuencias homopoliméricas que los otros clones, lo que indica un fenotipo hipermutador. También recambio clonal de manera rápida e identificación de 24 genes mutados recurrentemente que exhibieron diversidad intraclonal en dos o más clones (19). En estudios recientes, realizados en América del Sur, se encontró frecuencia del clon ST211, que transportan carbapenemasas de tipo VIM-2 y KPC-2 (13).

En cuanto a Colombia, se han identificado poblaciones de *P. aeruginosa* por medio del método de tipificación de secuencias multilocus (MLST), el cual resulta confiable y preciso (14). Algunos de los clones que se han identificado en departamentos como Antioquia, Valle del Cauca y Cundinamarca son ST111, detectado con carbapenemasas de clase A (CTX-M-like y TEM-like) y de clase B (VIM-2); clon ST244 con carbapenemasas de clase A (SHV-like y TEM-like) y de clase B (VIM-like); ST298, identificado con carbapenemasas de clase B (VIM-2)(14) y ST235, clon de alta frecuencia a nivel mundial e identificado en infecciones agudas especialmente pacientes internados en Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), quienes adquieren neumonía asociada a la ventilación mecánica o infección por quemaduras, también en infecciones oculares y del tracto urinario(15,16). Este clon en Colombia se ha identificado con presencia de carbapenemasas Clase A (CTX-M-like y KPC-2), clase B (VIM-like) y clase D (OXA-2) (17).

En la actualidad, nuevas tecnologías y herramientas de detección han surgido permitiendo el mejoramiento de bases de datos y una mejor detección de los microorganismos, por ello en el año 2023 se realizó un estudio con aislamientos de *P.aeruginosa* en 44 países cuyo objetivo era definir las características y la frecuencia global, para ello se realizó secuenciación de Illumina. Adicional a ello se realizó una clasificación en clones partiendo de la clasificación por MLST identificando 14, de los cuales el clon uno y dos resultan ser los más importantes pues contienen ST235 y ST211 (importancia mundial). (18)

En este contexto, el objetivo de este estudio fue estudiar la diversidad y dinámica de transmisión de *Pseudomonas aeruginosa* de un Hospital de tercer nivel en Bogotá D.C.,

Colombia a niveles microgeográfico y global, a través del ensamblaje de genomas, análisis de MLST, reconstrucción filogenética y complejos clonales (CC). Esta investigación muestra la necesidad de implementar nuevas metodologías para realizar seguimientos epidemiológicos más robustos, implementando secuenciación de nueva generación con un enfoque no solo a nivel local, sino también global.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Recepción de muestras

Muestras tomadas de un banco de aislamientos almacenados en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia de los años 2019, 2020 y 2021. Estas muestras llegan al Instituto de Biotecnología (IBUN) en medio de transporte AMEIS con carbón activado identificado con fecha de la toma de muestra, tipo de muestra, género y especie del microorganismo y código de la muestra.

2.2 Caracterización fenotípica y antibiograma

Los aislamientos cuentan con identificación taxonómica utilizando el equipo Phoenix 110 de la casa comercial Becton Dickinson, este sistema utiliza diluciones a escala McFarland 0,5 detectando crecimiento por reacción óxido-reducción y determinación de turbidez. Utiliza los paneles NID (identificación fenotípica) y NMIC-101 (antibiograma), en donde se identificó la presencia o ausencia fenotípica de carbapenemasas. Los aislamientos que mostraban resistencia a carbapenémicos cuentan con pruebas

adicionales tales como Test EDTA y Ácido Borónico, indicando de manera específica la carbapenemasa presente.

2.3 Procesamiento en el laboratorio

Codificados los aislamientos se inicia la activación, para ello inicialmente se cultivan en agar MacConkey OXOID (crecimiento de 24 horas), en donde se evidencia crecimiento característico de la colonia y la no fermentación de lactosa. Se pasan a un agar selectivo y diferencial para *P. aeruginosa*, agar cetrimide Scharlau (crecimiento 24 horas) generando un pigmento verde (piocianina y pioverdina). Las colonias recuperadas fueron sembradas en agar Mueller Hilton para recuperar biomasa, posterior se criopreservaron por duplicado en caldo BHI y glicerol 20%.

2.4 Extracción DNA

Confirmados y verificados los aislamientos, se sembraron en caldo BHI para realizar la extracción ADN, la cual se llevó a cabo utilizando el kit comercial PureLink® Genomic DNA para bacterias Gram negativas (Invitrogen, 2020). Para verificar la cantidad e integridad del ADN, se realizó una cuantificación tanto con Qubit utilizando fluorescencia (ThermoFisher, 2020) con el kit comercial Qubit dsDNA BR (Invitrogen, 2020), como base para hacer los cálculos de concentración en ng, como a través de espectrofotometría usando un equipo nanodrop, para el cálculo de los índices A260/A280 y A260/A230, criterios utilizados para secuenciar.

2.5 Creación de librerías genómicas

Para su elaboración se utilizó la plataforma Illumina con el kit comercial Illumina Dna Prep, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se verificó calidad analizando la distribución y el tamaño de los fragmentos usando el Analizador de fragmentos Qseq100 Bioptic (Bioptic, 2016)

2.6 Secuenciación

Se realizó secuenciación de genomas completos de los ADN obtenidos de los aislamientos que cumplieron con los criterios de calidad. Para ello, se utilizó la plataforma Illumina MiSeq utilizando celda de flujo MiSeq V3 con una salida máxima de 600 ciclos (con una cantidad de datos crudos esperados de 15Gb) disponible en el core de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia.

2.7 Análisis bioinformático

Para realizar el ensamblaje de los genomas se empleó el Pipeline elaborado por el grupo de bioinformática de la Universidad Nacional de Colombia (https://github.com/dctopro/Pipe_Plasmid), que considera: una verificación de calidad utilizando el programa FastQC v0.11.5, limpieza de las secuencias con Trimmomatic v0.36 eliminando secuencias de baja calidad y adaptadores, y ensamblaje usando se realizó el ensamblaje de novo del genoma completo utilizando SPAdes v3.10.1, empleando el genoma de referencia *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) Reference Sequence: NC_002516.2.

3.7.3.

A partir de los ensamblajes de genomas se realizó la clasificación por medio de MLST utilizando Pipeline 2.22.0 (<https://github.com/tseemann/mlst>), el cual realiza una

asignación por comparación con la base de datos de PubMLST. Posterior se empleó la herramienta e-BURST (<https://www.phyloviz.net/goeburst/>) para revisar los complejos clonales de acuerdo con las secuencias ST reportadas. Se realizó un llamado de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) a nivel de genoma completo, utilizando Snippy v4.3.6. A partir del alineamiento múltiple de SNPs se realizó una reconstrucción filogenética de Maxima Verosimilitud usando el programa RAxML v8.2.4, que fue posteriormente visualizado empleando la herramienta web Interactive Tree of Life - iTOL (<https://itol.embl.de/>), se estableció un soporte de nodos utilizando bootstrap con un porcentaje de 90%.

3. RESULTADOS

3.1 Ensamblaje de genomas

Partiendo de las librerías por medio de illumina se 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. La aplicación del pipeline bioinformático desde el IBUN, condujo a la obtención de datos de secuenciación con un puntaje de calidad Q-Score (Q30) mayor o igual a 70%,

3.2 Clasificación tipificación de secuencias multilocus

De acuerdo con las muestras recolectadas, se realizó un análisis de dispersión desde la notificación en noviembre de 2019 con un clon de alto riesgo hasta abril de 2021 en donde se evidencia la presencia de diferentes ST encontrados. Así mismo con este

análisis se denota la dispersión en los diferentes servicios, con variación de tiempo desde 15 días hasta un año y la permanencia de estos.

Para realizar la clasificación ST se tomaron en cuenta los perfiles alélicos reportados que ya están establecido para *P. aeruginosa* (20). Dentro de los 10 aislamientos descritos en el estudio lograron clasificarse en seis ST, de los cuales dos aislamientos pertenecen al mismo ST cuatro no lograron clasificarse como en el caso de PA-030802692, PA-040401482, PA-082801342 y PA-090302321. Como método de verificación, estas secuencias fueron revisadas directamente en pubMLST, a fin de corroborar la actualización y eficacia del pipeline, dando como resultado diversidad no reportada, impidiendo la clasificación (Figura. 1).

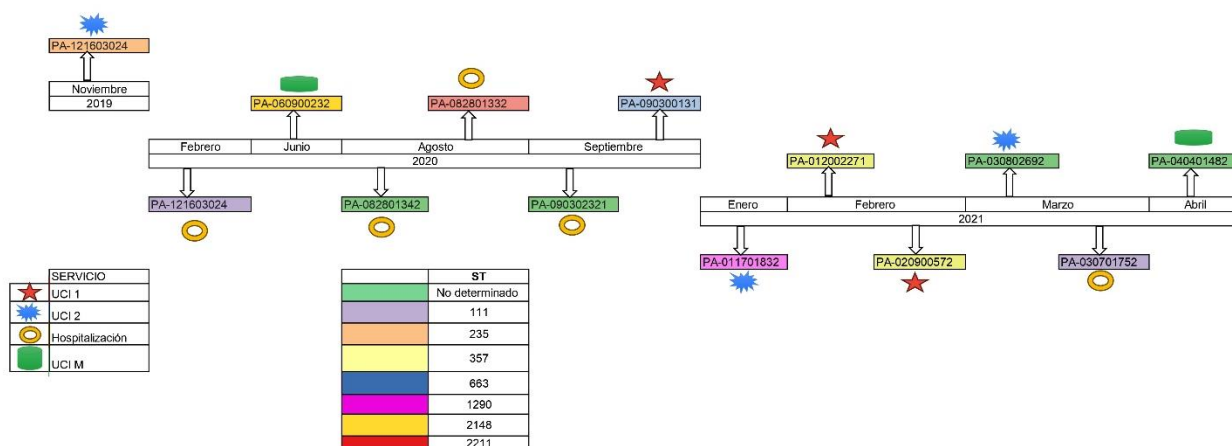


Figura 1. Línea del tiempo representando dispersión de los ST identificados por servicio hospitalario entre los años 2019, 2020 y 2021

3.3 Relación filogenética.

Al obtener SNPs se realizó una reconstrucción filogenética, en donde se generaron 3 Grupos de acuerdo con los nodos generados, estos se dividieron de la siguiente manera grupo 1 (PA-082801342 y PA-082801332), grupo 2 (PA-121603024, PA-020900572 y PA-012002271) y en el grupo 3 los demás aislamientos incluyendo PA01 (referencia).

PA-082801342 y PA-082801332 dos aislamientos tomados de la misma paciente con diferencia de 15 días. Sin embargo, el ST de PA-082801342 no logró ser asignado. Aunque pertenecen al mismo grupo en el árbol queda una gran incógnita acerca de posibles mutaciones de *P. aeruginosa*, que puede presentarse incluso dentro del mismo paciente. Estos hallazgos representan una evidencia adicional de la elevada plasticidad de genoma de esta especie.

PA-040401482, PA-030802692, PA-082801342 y PA-090302321 no lograron ser clasificados. Tres de ellos (PA-011701832, ST1290; PA-060900232, ST2148; y PA-090300131, ST663) fueron identificados de acuerdo con la base de datos con reportes de años 2016, 2009 y 2002 en países como Haití y Francia.

Se evidencia politomía entre PA-030701752 y PA-020100661 (ST111) y PA-012002271 y PA-020900572 (ST357), lo cual evidencia una estrecha relación entre ellos para las secuencias analizadas. Algo de notar es la persistencia de ST111 dentro del hospital y del servicio de hospitalización puesto que a pesar de que son aislamientos tomados en diferentes años (2020 y 2021) cuentan con características genómicas estrechamente relacionadas (Figura. 2).

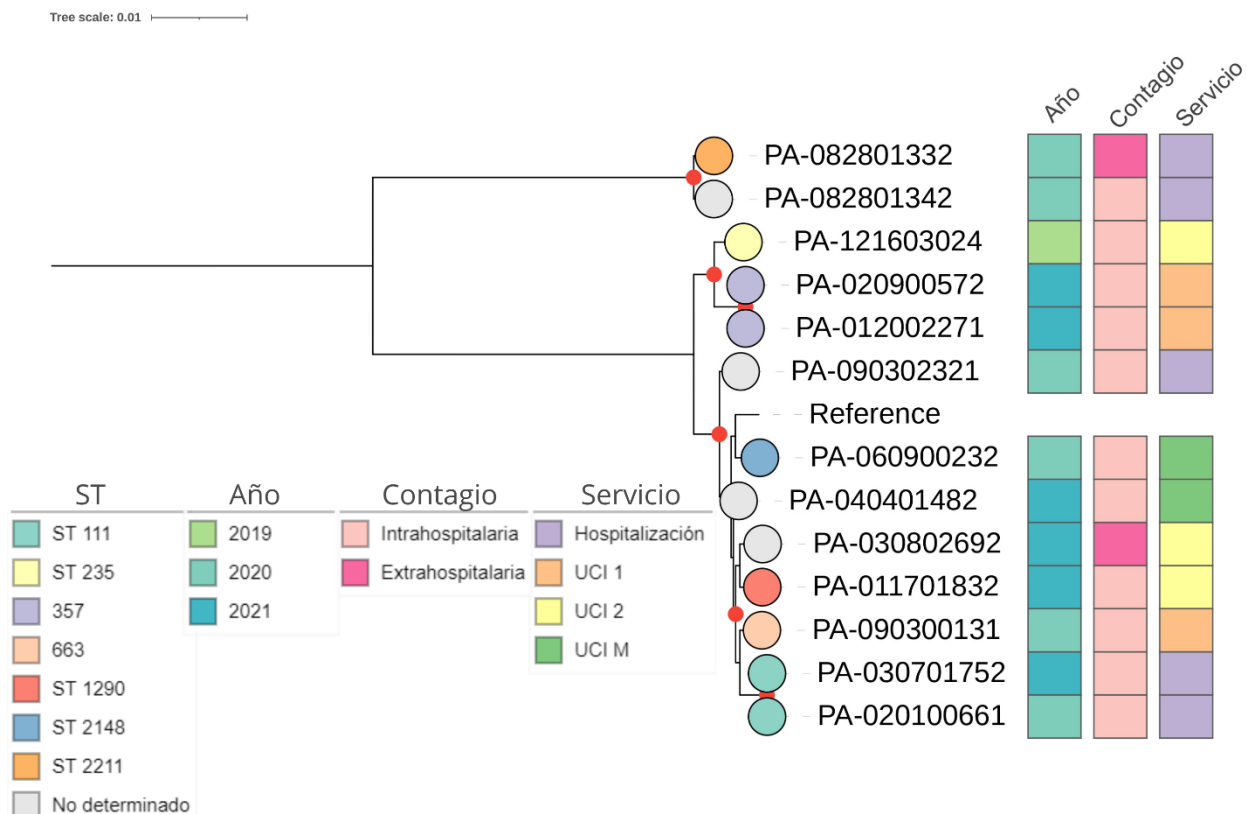


Figura 2. Árbol filogenético construido a partir de SNP del genoma completo de los aislamientos y el genoma de referencia PA01.

3.4 Comparación a nivel global

Se realizó un análisis a nivel global con los ST reportados a nivel global con un total de ST5121, al realizar esto se analizaron los complejos clonales utilizando la herramienta e-BRUST al realizar las diferencias de 2 perfiles alélicos mostrando 807 complejos clonales, se identificó que los aislamientos estudiados pertenecen a cuatro complejos clonales en donde ST235 es fundador de su grupo clonal, ST111 y ST663 pertenecen al mismo grupo clonal, ST2148 conforma otro grupo clonal y ST 357 el último grupo clonal, sin embargo, ST1290 y ST2211 son dos ST que no se pueden asignar a ningún complejo clonal y son conocidas como singletons (Figura. 3).

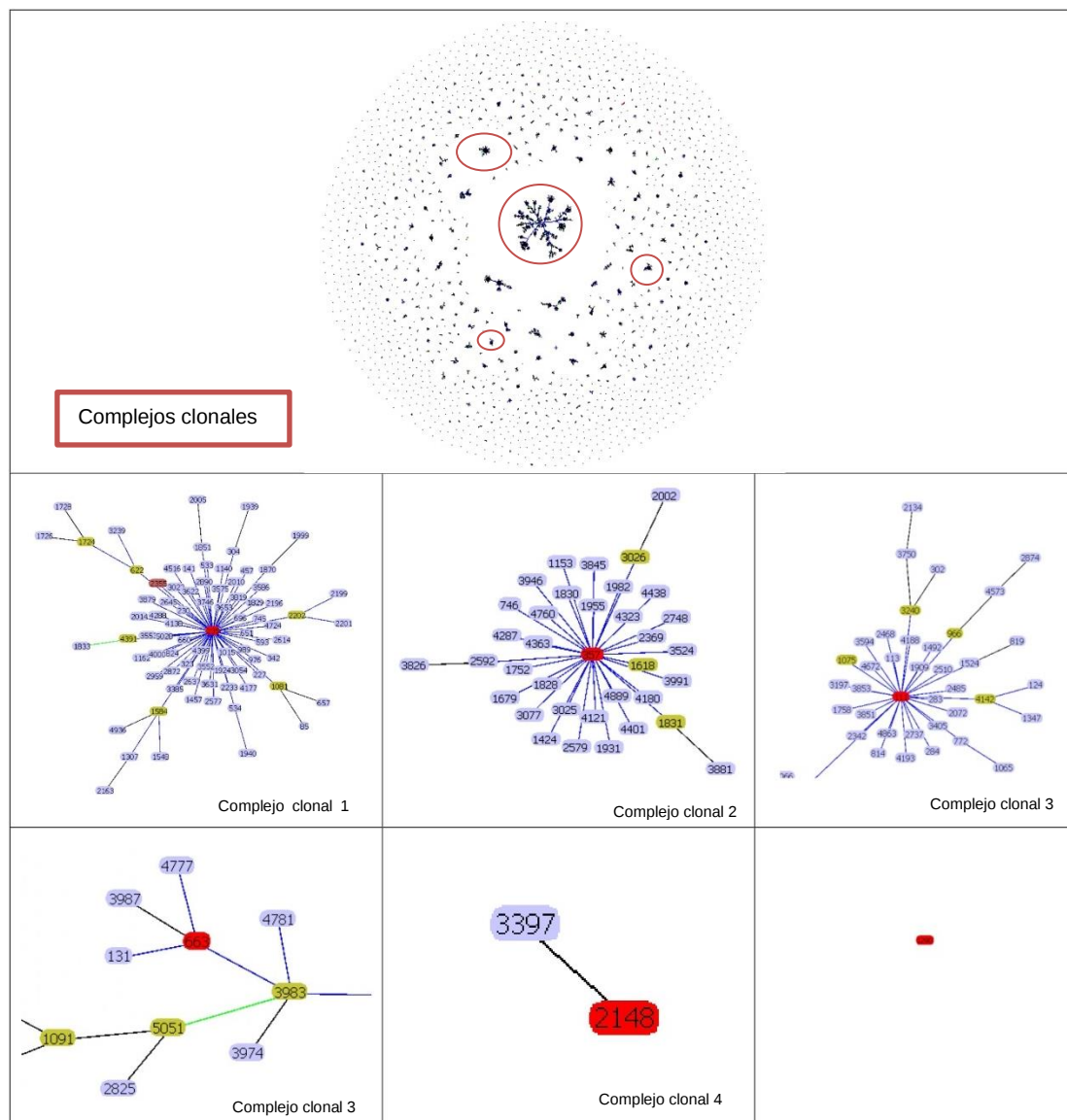


Figura 3. Análisis global y revisión de grupos clonales a partir de los 5121 ST reportados en la plataforma PubMLST

4. DISCUSIÓN

Las infecciones asociadas a la atención en salud causadas por microorganismos han generado una preocupación a nivel mundial, debido a la diseminación y permanencia de diferentes ST. Aunque se cuenta con estrategias robustas para el seguimiento epidemiológico a través de herramientas moleculares acopladas a secuenciación, su

aplicación resulta ser insuficiente, principalmente en países en vías de desarrollo. Por ello, es necesario ampliar el uso de dichas herramientas robustas, incluyendo la secuenciación de genomas que puede conducir a una mejor caracterización de microorganismos patógenos.

En *P. aeruginosa*, se han realizado estudios que involucran la secuenciación de aislamientos clínicos, en donde se utilizan una serie de herramientas bioinformáticas que permiten caracterizar cada aislamiento generando asignación intrataxa. Este tipo de aproximaciones ha resultado útil puesto que permite entender el comportamiento del microorganismo en el mismo hospital, a nivel local y global.

Dentro del presente estudio se evidenció diversidad no reportada de la base de datos frente a la clasificación de secuencias ST puesto que cuatro aislamientos no cumplían con las características o presentan mutaciones en los genes *aroE*, *mulT* y *trpE* con respecto a los ya reportados y cuatro secuencias contaban con ST que han sido reportados solo una vez y en países externos. Esto genera preocupación y resalta la necesidad de realizar mayores informes que permitan una nueva clasificación, identificación de nuevos ST y análisis de la circulación epidemiológica en Colombia.

La clasificación por MLST resulta de gran importancia para verificar un brote intrahospitalario. Sin embargo, en la presente investigación se evidenció la presencia de secuencias ST y la diversidad clonal no reportadas en Colombia, dejando como cuestionamiento la verdadera dispersión hospitalaria.

Dentro de las muestras se identificó PA-121603024 como ST235 la secuencia de mayor impacto debido a su relación con genes de resistencia, factores de virulencia, capacidad para generar brotes y su importancia a nivel global (21), también ST111 que ya han sido

identificados en Colombia, en otras instituciones hospitalarias (22, 23), lo cual llama la atención acerca de la dispersión que este ST tiene en Colombia. Como se visualizó en este caso en donde el aislamiento PA-121603024 de notó de manera fenotípica resistencia a carbapenémicos. En cuanto a los ST1290, ST357, ST2211, ST663, ST2148 no se encuentran reportes en Colombia, de acuerdo con los registros en PubMLST; es de notar que esta plataforma cuenta con reportes de muy pocos departamentos de Colombia (Antioquia, Valle y Bogotá).

Pese a las pocas muestras incluidas en el estudio, los hallazgos aquí identificados representan una línea de base que soporta la necesidad de realizar posteriores análisis epidemiológicos a fin de actualizar las bases de datos que permita evidenciar la circulación de los diferentes ST tanto a nivel local como global, generando la inclusión de las secuencias no clasificadas. Sin embargo, en futuros trabajos se deben incluir más muestras del mismo centro hospitalario que permita entregar un informe actualizado, de los servicios y de las infecciones extra e intrahospitalarias, así como recolectar muestras de otros centros hospitalarios en Bogotá y en Colombia que permitan realizar genómica comparativa.

Integrar los datos de MLST con la información clínico-patológica de los pacientes y de la estancia a nivel intrahospitalario de diferentes ST, permite realizar inferencias acerca de la dispersión de clones y presencia de potenciales brotes. A pesar de la limpieza, esterilización y uso de elementos de bioseguridad utilizados en los protocolos de bioseguridad en los hospitales, se demuestra la permanencia de diferentes ST y la diversidad de complejos clonales en un mismo ambiente hospitalario.

Los avances y la necesidad en salud requieren de implementar tecnología robusta como secuenciadores de nueva generación a pesar de su alto costo permite una mejor visualización de la situación actual, puesto que muchos centros hospitalarios cuentan con detección fenotípica la cual queda corta frente a las necesidades implicando fallas terapéuticas, de igual manera revisar los elementos de bioseguridad y limpieza generada en cada sitio hospitalario y estandarizar las características para saber que paciente debe ser aislado a fin de evitar dispersión intrahospitalaria.

Agradecimientos

Agradezco profundamente al Instituto de Biotecnología- UN por permitir la realización y culminación de este estudio, a los profesores quienes permitieron una guía para llevar a cabo el proyecto y a todas las personas quienes participaron en el estudio aportando sus conocimientos. Este estudio me permitió la ampliación de conocimientos y visualización a otra rama de investigación forjando mi crecimiento tanto a nivel profesional como personal.

FONDOS

Este trabajo de grado se realiza en el marco de un proyecto financiado por Minciencias. Código 110189666234, contrato 737-2018

Bibliografía

1. Grace A, Sahu R, Owen DR, Dennis VA. *Pseudomonas aeruginosa* reference strains PAO1 and PA14: A genomic, phenotypic, and therapeutic review. *Front Microbiol* [Internet]. 2022 Oct 13 [cited 2023 Jan 28];13. Available from: [/pmc/articles/PMC9607943/](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.9607943/full)
2. Adelantado Lacasa M, Portillo ME, Lobo Palanco J, Chamorro J, Ezpeleta Baquedano C. Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Acquired in a Spanish Intensive Care Unit: Using Diverse Typing Methods to Identify Clonal Types. *Microorganisms* [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2023 Feb 28];10(9). Available from: [/pmc/articles/PMC9502743/](https://www.mdpi.com/2076-0817/10/9/1581)
3. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance [Internet]. Who.int. World Health Organization; 2024 [cited 15 Oct 2024]. Disponible en: https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461?trk=feed-detail_main-feed-card_feed-article-content
4. Pallares Gutiérrez CJ, Esparza G, Quirós RE, Levy G, Lichtenberger P, Benadof D, et al. Consenso latinoamericano sobre la importancia de un sistema de gestión de datos microbiológicos para apoyar el programa de optimización de uso de antimicrobianos (PROA): Recomendaciones basadas en la evidencia. Parte 1. *Rev Chilena Infectol* [Internet]. 2024 [cited 17 Oct 2024];41(1):36–49. Disponible en: <https://mail.revinf.cl/index.php/revinf/article/view/1900>
5. Bajire SK, Ghate SD, Shetty S, Banerjee S, Rao RSP, Shetty V, et al. Unveiling the role of hub proteins in controlling quorum sensing regulated virulence through analogues in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: A functional protein-protein network biology

- approach. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2023 Jun 11 [cited 2023 May 22];660:13–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37058843/>
6. Grace A, Sahu R, Owen DR, Dennis VA. *Pseudomonas aeruginosa* reference strains PAO1 and PA14: A genomic, phenotypic, and therapeutic review. Vol. 13, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2022
7. Sawa T, Momiyama K, Mihara T, Kainuma A, Kinoshita M, Moriyama K. Molecular epidemiology of clinically high-risk *Pseudomonas aeruginosa* strains: Practical overview. *Microbiol Immunol* [Internet]. 2020;64(5):331–44. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/1348-0421.12776>
8. Karampatakis T, Antachopoulos C, Tsakris A, Roilides E. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an endemic area: comparison with global data. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2018 37:7 [Internet]. 2018 Apr 11 [cited 2023 May 22];37(7):1211–20. Available from: <https://link-springer-com.ezproxy.unicolmayor.edu.co/article/10.1007/s10096-018-3244-4>
9. McAulay K, Schuetz AN, Fauntleroy K, Shen L, Merveille Y-M, Deroncelay A, et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in healthcare facilities in Port-au-Prince, Haiti. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2021;25:60–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2021.02.016>
10. Ozer EA, Allen JP, Hauser AR. Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools Spine and AGEnt. *BMC Genomics*

[Internet]. 2014 Aug 29 [cited 2023 Apr 15];15(1). Available from: /pmc/articles/PMC4155085/

11. de Sousa T, Hébraud M, Enes Dapkevicius MLN, Maltez L, Pereira JE, Capita R, et al. Genomic and metabolic characteristics of the pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. Vol. 22, International Journal of Molecular Sciences. MDPI; 2021.

12. Reyes J, Komarow L, Chen L, Ge L, Hanson BM, Cober E, et al. Global epidemiology and clinical outcomes of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and associated carbapenemases (POP): a prospective cohort study. Lancet Microbe [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2023 May 15];4(3):e159–70. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S2666524722003299/fulltext>

13. Mojica MF, De La Cadena E, García-Betancur JC, Porras J, Novoa-Caicedo I, Páez-Zamora L, et al. Molecular Mechanisms of Resistance to Ceftazidime/Avibactam in Clinical Isolates of Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* in Latin American Hospitals. mSphere [Internet]. 2023 Apr 20 [cited 2023 Jul 29];8(2). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/msphere.00651-22>

14. del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Oliver A. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with horizontally-acquired β -lactamases: 2020 update. Int J Antimicrob Agents. 2020 Dec 1;56(6):106196.

15. Fischer S, Dethlefsen S, Klockgether J, Tümmler B. Phenotypic and Genomic Comparison of the Two Most Common ExoU-Positive *Pseudomonas aeruginosa* Clones, PA14 and ST235. mSystems [Internet]. 2020 Dec 22 [cited 2023 May 22];5(6). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSystems.01007-20>

16. Vatansever, Cansel et al. "Co-existence of OXA-48 and NDM-1 in colistin resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST235." *Emerging microbes & infections* vol. 9,1 152-154. 21 Jan. 2020, doi:10.1080/22221751.2020.1713025
17. Fischer S, Dethlefsen S, Klockgether J, Tümmler B. Phenotypic and Genomic Comparison of the Two Most Common ExoU-Positive *Pseudomonas aeruginosa* Clones, PA14 and ST235. *mSystems* [Internet]. 2020 Dec 22 [cited 2023 May 22];5(6). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mSystems.01007-20>
18. Hu Y, Qing Y, Chen J, Liu C, Lu J, Wang Q, et al. Prevalence, Risk Factors, and Molecular Epidemiology of Intestinal Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2021 Dec 22 [cited 2023 May 15];9(3). Available from: [/pmc/articles/PMC8612150/](https://pmc/articles/PMC8612150/)
19. Treepong P, Kos VN, Guyeux C, Blanc DS, Bertrand X, Valot B, et al. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018 Mar 1;24(3):258–66.
20. Irum S, Naz K, Ullah N, Mustafa Z, Ali A, Arslan M, Khalid K, Andleeb S. Antimicrobial Resistance and Genomic Characterization of Six New Sequence Types in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Pakistan. *Antibiotics* (Basel). 2021 Nov 12;10(11):1386. doi: 10.3390/antibiotics10111386. PMID: 34827324; PMCID: PMC8615273.
21. Fischer S, Dethlefsen S, Klockgether J, Tümmler B. 2020. Phenotypic and Genomic Comparison of the Two Most Common ExoU-Positive *Pseudomonas aeruginosa* Clones, PA14 and ST235. *mSystems* 5:10.1128/msystems.01007-20. <https://doi.org/10.1128/msystems.01007-20>

22. Correa A, Del Campo R, Perenguez M, et al. Dissemination of high-risk clones of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(4):2421-2425. doi:10.1128/AAC.03926-14
23. Martinez E, Pérez JE, Buelvas F, Tovar C, Vanegas N, Stokes HW. Establishment and multi drug resistance evolution of ST235 *Pseudomonas aeruginosa* strains in the intensive care unit of a Colombian hospital. *Res Microbiol* [Internet]. 2014;165(10):852–6. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250814002137>