



**Universidad de Concepción
Facultad de Farmacia**

**BUSQUEDA DE PROFAGOS ASOCIADOS A
CARBAPENEMASAS EN *Pseudomonas aeruginosa***

POR LUIS ALEXIS AMSTEINS ROMERO

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor Guía/Patrocinante: Dr. Andrés Opazo Capurro
Departamento de Microbiología Facultad de Ciencias Biológicas
Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos (LIAA)

Abril, 2023
Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

©2023, Luis Alexis Amsteins Romero

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	5
2. ABSTRACT	6
3. INTRODUCCIÓN	7
3.1 Resistencia a los antibióticos	7
3.2 Mecanismos de resistencia.	10
3.3 Elementos genéticos móviles (EGM).....	13
3.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : patógeno oportunista en Infecciones Asociadas a la Atención de la salud (IAAS).....	20
3.5 Problema y Pregunta de Investigación	25
3.6 Hipótesis.....	26
3.7 Objetivo General	26
3.8 Objetivos específicos	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1 Determinar los tipos de carbapenemasas presentes en cepas de <i>P. aeruginosa</i> resistentes a carbapenémicos y productoras de carbapenemasas.....	27
4.2 Identificar la presencia de profagos en genomas de cepas de <i>P. aeruginosa</i> resistentes a carbapenémicos y productoras de carbapenemasas.....	31
4.2.1 Extracción de ADN.....	31
4.2.2 Secuenciación por síntesis de extremos pareados.....	31
4.2.3 Análisis de datos y ensamblaje del genoma.	31
4.2.4 Identificación de especie y secuencio-tipo (ST).	32
4.2.5 Búsqueda de genes de resistencia a antibióticos <i>in silico</i>	34
4.2.6 Construcción de árbol filogenético	34
4.2.7 Búsqueda de profagos a través de análisis <i>in silico</i>	35

4.3 Asociar los profagos con genes de carbapenemasas en cepas de <i>P. aeruginosa</i> resistentes a carbapenémicos y productoras de carbapenemasas.....	37
4.3.1 Obtención de secuencias aminoacídicas de regiones genéticas de profagos intactos.	37
4.3.2 Visualización de la anotación genómica en las regiones de profagos de interés.....	38
5. RESULTADOS	40
5.1 Determinar los tipos de carbapenemasas presentes en cepas de <i>P. aeruginosa</i> resistentes a carbapenémicos y productoras de carbapenemasas.....	40
5.2 Identificar la presencia de profagos en genomas de cepas de <i>P. aeruginosa</i> resistentes a carbapenémicos y productoras de carbapenemasas.....	43
5.3 Asociar los profagos con genes de carbapenemasas en cepas de <i>P. aeruginosa</i> resistentes a carbapenémicos y productoras de carbapenemasas.....	68
6. DISCUSIÓN	72
7. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.....	83
8. GLOSARIO.....	85
9. BIBLIOGRAFÍA.....	86

INDICE DE TABLAS

4-1 Partidores y parámetros utilizados para la búsqueda de genes de carbapenemasas mediante PCR convencional.....	29
5-2 Comparación de identificación de carbapenemasas mediante técnica PCR de punto final y análisis in silico.....	51

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

2-1	Ciclo de vida de los bacteriófagos.....	15
5-2	Origen de las cepas e identificación de genes de carbapenemasas en las 40 cepas de <i>P. aeruginosa</i>	42
5-3	Comparación del tamaño de genomas y respectivo número de “contigs”.....	44
5-4	Correlación entre el N50 y el número de contigs.....	46
5-5	Predicción de especie mediante herramientas bioinformáticas.....	48
5-6	Predicción de genes de carbapenemasas mediante herramientas bioinformáticas.....	50
5-7	Identificación de STs.....	53
5-8	Cladograma hecho mediante análisis filogenético utilizando el método de máxima verosimilitud.....	55
5-9	Búsqueda de profagos en cepas portadoras de carbapenemasas mediante BLASTN en “PHASTER”.....	57
5-10	Búsqueda de profagos en cepas portadoras de carbapenemasas mediante BLASTN en “Prophage Hunter”.....	60
5-11	Análisis de profagos encontrados para el ST-654.....	63
5-12	Análisis de especies de profagos determinados como activos e intactos en los STs 810, 111, 395, 308, 179, 815 y 3348.....	66
5-13	Anotación genética y visualización en “Proksee” del profago Pf1 y parte de su entorno genético.....	69
5-14	Anotación genética y visualización en “Proksee” del profago “Pseudo YMC11/02/R656”.....	71

RESUMEN

Por décadas la resistencia a los antibióticos ha sido un desafío complejo en el mundo científico que se dedica a dilucidar los distintos mecanismos y formas por las cuales las bacterias llegan a resistir las terapias antibióticas disponibles, sobre todo las de última línea que incluye a los carbapenémicos. Los esfuerzos para describir nuevos mecanismos de resistencia o monitorear cambios en los ya descritos ha sido una ardua labor, especialmente el incremento de aparición de carbapenemasas. La movilidad y transferencia de los genes de resistencia a antibióticos crece en enigmas, a pesar de conocerse algunas formas de transferencia horizontal de genes. Como objetivo planteamos la búsqueda de profagos asociados a carbapenemasas. Se analizó el genoma de 40 cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos aisladas de hospitales chilenos, de estas 34 portaban carbapenemasas. El análisis filogenético identificó 19 cepas pertenecientes a un ST-654 considerado de alto riesgo y las restantes se clasificaron en otros que también incluyen clones peligrosos. Del total de cepas productoras de carbapenemasas, dos cepas por análisis *in silico* tienen un potencial de asociación entre profagos y el gen *bla_{VIM}*. Pudo concluirse que el análisis *in silico* es una forma de aproximación interesante para detectar la relación entre profagos y determinantes de resistencia a antibióticos, ya que idealmente se requiere el cierre del cromosoma y/o plásmidos para confirmar los resultados, lo cual requiere de otra técnica de secuenciación.

ABSTRACT

For decades, antibiotic resistance has been a complex challenge in the scientific world dedicated to elucidating the different mechanisms and ways by which bacteria come to resist available antibiotic therapies, especially those of the latest line, including carbapenems. Efforts to describe new mechanisms of resistance or monitor changes in those already described have been an arduous task, especially the increased emergence of carbapenemases. The mobility and transfer of antibiotic resistance genes is increasingly enigmatic, even though some forms of horizontal gene transfer are known. Our objective was to search for carbapenemase-associated prophage prophages. We analyzed the genome of 40 carbapenem-resistant *P. aeruginosa* strains isolated from Chilean hospitals, 34 of which carried carbapenemases. The phylogenetic analysis identified 19 strains belonging to an ST-654 considered high risk and the remaining strains were classified in others that also include dangerous clones. Of the total number of carbapenemase-producing strains, two strains have a potential association between prophages and the *bla_{VIM}* gene based on *in silico* analysis. It is concluded that the use of *in silico* analysis is an interesting approach to detect the potential relationships between prophages and antibiotic resistance determinants. However, to confirm the results, chromosome and/or plasmid closure is ideally required, which may necessitate additional sequencing techniques.

INTRODUCCIÓN

Resistencia a los antibióticos

El problema de la resistencia a los antibióticos se acrecentó con el uso indebido y exacerbado de antibióticos ya sea en salud humana, animal o en la producción industrial como acuicultura o ganadería, sobre todo después de la llamada época dorada de los antibióticos, entre los años 1945-1960 donde hubo una revolución en la medicina. Además, la mitad de los antibióticos usados en la actualidad fueron aislados y sintetizados durante esa época, posteriormente pudo evidenciarse que la resistencia para un nuevo antibiótico se producía 2 o 3 años después de su masiva salida. Los antibióticos se definen como cualquier molécula orgánica que inhibe o mata bacterias debido a interacciones específicas con blancos bacterianos sin considerar la fuente del compuesto o su clase (Davies et al., 2010). La resistencia a los antibióticos se la ha asociado de forma más recurrente a una definición clínica desde un punto de vista del tratamiento de un proceso infeccioso (Martínez, J. L. 2014). Sin embargo, es un proceso “ancestral” hecho de manera natural por las bacterias, ya que constituye un mecanismo de evolución genética relacionada a la supervivencia en el hábitat, debido a que permiten ser competentes frente a otros organismos y así sobrevivir, pero también para protegerse frente a sus propios compuestos, por lo tanto este tipo de resistencia puede definirse como el continuo crecimiento con

la presencia del antibiótico en concentraciones que normalmente matarían a una célula bacteriana sensible (Walsh et al., 2016).

Desde el punto de vista clínico, la resistencia es originada por mutación (que luego es heredada si presenta alguna ventaja) o transferencia horizontal de genes (THG). (Martínez, J. L. 2014).

La presión selectiva en las bacterias es fundamental para el desarrollo de la resistencia ya que puede ir seleccionando a los individuos aptos para subsistir en un ambiente determinado, en este caso al exponerse a un entorno cargado de antibióticos (Uddin Mahtab, T et al., 2021). En la naturaleza existe una presión selectiva pequeña, sin embargo, la entrada a la era antibiótica hizo que esta presión incrementara dejando muchas cepas resistentes no solo un antibiótico si no que a múltiples clases debido a la alta exposición a una carga o polución de antibióticos en el entorno (Aminov, R. 2009).

Según diversas proyecciones, se estima que en 2050 unos 10 millones de muertes estarán asociadas a infecciones causadas por bacterias resistentes (O'Neil, J. 2014). Sin embargo, el uso de antibióticos y otros métodos antimicrobianos en recintos de salud y, sobre todo, en pacientes internados se incrementó por la pandemia ocasionada por SARS-CoV-2 en 2019 hasta la

fecha, lo cual puede haber perjudicado los esfuerzos por mitigar la resistencia a los antibióticos (Pierce et al., 2021).

Mecanismos de resistencia.

Por lo general las bacterias presentan resistencias de manera natural y extrínseca o adquirida (Davies et al., 2010). La primera se debe a una resistencia intrínseca o una inducida, en el primer caso puede ocurrir un reemplazo o cambio del blanco para ser naturalmente no susceptible a un antibiótico y el segundo es dado por un estímulo que induce la expresión del mecanismo que permite la resistencia, esto comúnmente lleva a una forma de resistencia innata o inducida y generalmente no es producto de la exposición al antibiótico (Davies et al., 2010). Por otro lado, la resistencia a antibióticos adquirida se debe a la resistencia generada en una especie mediante la captación de genes o por mutaciones genéticas, en donde la cepa estaba previamente catalogada como susceptible (Uddin Mahtab, T et al., 2021).

Existen 4 mecanismos de resistencia descritos hasta la fecha:

- 1) Inactivación o destrucción del antibiótico por enzimas: Esta forma de resistencia previene que el antibiótico alcance su blanco (Uddin Mahtab, T et al., 2021). La hidrólisis es conocida debido la participación de enzimas claves como las betalactamasas que se encargan de degradar betalactámicos mediante la apertura del anillo lactama. (Uddin Mahtab, T et al., 2021).
- 2) Expulsión de los antibióticos: Muchas veces son un mecanismo intrínseco de resistencia donde los antibióticos son transportados al exterior de la célula por

proteínas lo que impide alcanzar la concentración intracelular adecuada para inhibir o destruir la bacteria en casos de antibióticos que requieren ingresar a la célula para llevar a cabo su actividad (Uddin Mahtab, T et al., 2021).

3) Limitación de la captación del antibiótico: Principalmente se debe a modificaciones en el transporte (Uddin Mahtab, T et al., 2021). Por ejemplo, las bacterias Gram negativas tienen este mecanismo de manera intrínseca ya que su membrana externa es una barrera natural, la cual es capaz de otorgar mayor impermeabilidad (Uddin Mahtab, T et al., 2021).

4) Alteración del sitio blanco: Este mecanismo implica la alteración de la unión y posterior acción del antibiótico en su sitio blanco (Uddin Mahtab, T et al., 2021). Es bastante común en Gram positivas, donde un caso de interés es la resistencia a betalactámicos mediado por cambios estructurales, en cantidad o de tipo de PBP (del inglés, *Penicilin-binding proteins*) (Uddin Mahtab, T et al., 2021).

En el caso de obtener un mecanismo de resistencia que no estaba presente de manera natural, la forma de adquisición corresponde a THG (Thomas et al., 2005). La THG entre bacterias es posible gracias a 3 procesos: i) transformación hecha por ADN libre, ii) conjugación y la iii) transducción mediada por bacteriófagos (Munita & Arias, 2016). La transformación consiste en la captación de ADN exógeno libre por parte de una bacteria competente, ya que no todas pueden hacerlo de forma natural. La conjugación es un método eficiente de transferencia genética mediante el contacto célula-célula a través de plásmidos

principalmente (Munita & Arias, 2016). Finalmente, la transducción es la transferencia de material genético bacteriano utilizando fagos como vectores.

El principal mecanismo de resistencia a antibióticos β -lactámicos en bacterias Gram positivas es la modificación de las PBP y en Gram negativas corresponden a la producción de enzimas denominadas betalactamasas (Munita et al., 2016). A partir de ese momento ha sido posible encontrar la presencia de genes de betalactamasas (*bla*) en el cromosoma bacteriano o en elementos genéticos móviles (Munita & Arias, 2016).

Dentro de las enzimas tipo betalactamasas, encontramos a las carbapenemasas, ya que poseen la habilidad de hidrolizar carbapenémicos, los cuales son antibióticos que se ocupan como última línea terapéutica para el tratamiento de infecciones causadas por cepas multidrogoresistentes (MDR). La clasificación Ambler que categorizó las betalactamasas según su secuencia aminoacídica, clasificó a las carbapenemasas en 3 grupos de los 4 existentes, A, D y B, por lo que podemos encontrar enzimas con un sitio activo de serina (A y D), también llamadas serinbetalactamasas (SBLs) (Bush, K. 2018). Por otro lado, se encuentran aquellas carbapenemasas que poseen iones Zn^{2+} en su sitio activo, por lo que se denominan metalo-betalactamasas (MBLs) (Bush, K. 2018).

Elementos genéticos móviles (EGM)

Los EGM son agentes importantes en la evolución progresiva que pueden realizar las bacterias, sobre todo cuando coexisten diferentes especies bacterianas y algunas de ellas poseen ventajas evolutivas que pueden transmitir a otras (Partridge et al., 2018). Uno de los principales roles que ejercen los EGM es la diseminación de la multirresistencia a los antibióticos, ya que permiten la captura, acumulación y diseminación de éstos, porque promueven la movilidad de ADN de manera intracelular e intercelular (Partridge et al., 2018). Se han descrito variados EGM que se diferencian por la composición, tamaño y forma de movilización que poseen, en donde es posible encontrar IS (del inglés, *Insertion sequence*), transposones (Tn), integrones (In), bacteriófagos, ICE (del inglés, *Integrative conjugative elements*) y plásmidos (Partridge et al., 2018).

La información reportada de la transferencia de genes de resistencia a antibióticos a través de bacteriófagos es difusa, a pesar de que se consideran las entidades biológicas más abundantes del planeta, siendo dominantes en las comunidades microbianas, en donde juegan un rol central moderando la población bacteriana y la THG, ya que pueden movilizar ADN bacteriano entre células tal como lo hacen los plásmidos (Chiang et al., 2019; Partridge et al., 2018). Los ciclos de vida descritos para los bacteriófagos luego de infectar a las

células bacterianas son 2 principalmente (Figura 1), el ciclo lítico y el ciclo lisogénico. Luego de infectar una bacteria, los fagos pueden asociarse a genes bacterianos y transferirlos mediante el proceso de transducción que puede llevarse a cabo de tres formas. Una de ellas es la transducción generalizada ocurre cuando los bacteriófagos logran captar exclusivamente ADN bacteriano al formar una nueva progenie, formando una partícula transductora defectuosa, ya que puede infectar, pero no producir nuevos viriones. Esta formación es aleatoria, principalmente por el reconocimiento erróneo de secuencias similares a *pac*, siendo esta una región dentro del concatémoro reconocida por la maquinaria de encapsulación del ADN viral (Chiang et al., 2019; Lang et al., 2012). Por otro lado, existe la transducción especializada en donde la generación y salida de fagos se encarga de adicionar en su material genético un conjunto de genes específicos bacterianos, formando una molécula híbrida entre ADN viral y bacteriano para luego transferirlo a otra célula bacteriana receptora (Chiang et al., 2019). Este último mecanismo de transducción es un evento infrecuente, ya que, requiere de profagos aberrantes los cuales tienen una escisión poco frecuente, por lo tanto, esta forma contribuye poco a todas las transferencias genéticas mediadas por fagos (Chiang et al., 2019). Adicionalmente, se ha descrito un nuevo mecanismo llamado “transducción lateral” descubierto en profagos de *Staphylococcus aureus*, éstos poseen un ciclo lítico atípico porque se escinden tardíamente a pesar de una inducción lisogénica temprana, esto genera la expresión de una terminasa del fago que inicia el empaquetamiento

del ADN mediante el reconocimiento de los sitios *pac* del profago, mientras éste sigue unido al cromosoma (Chiang et al., 2019).

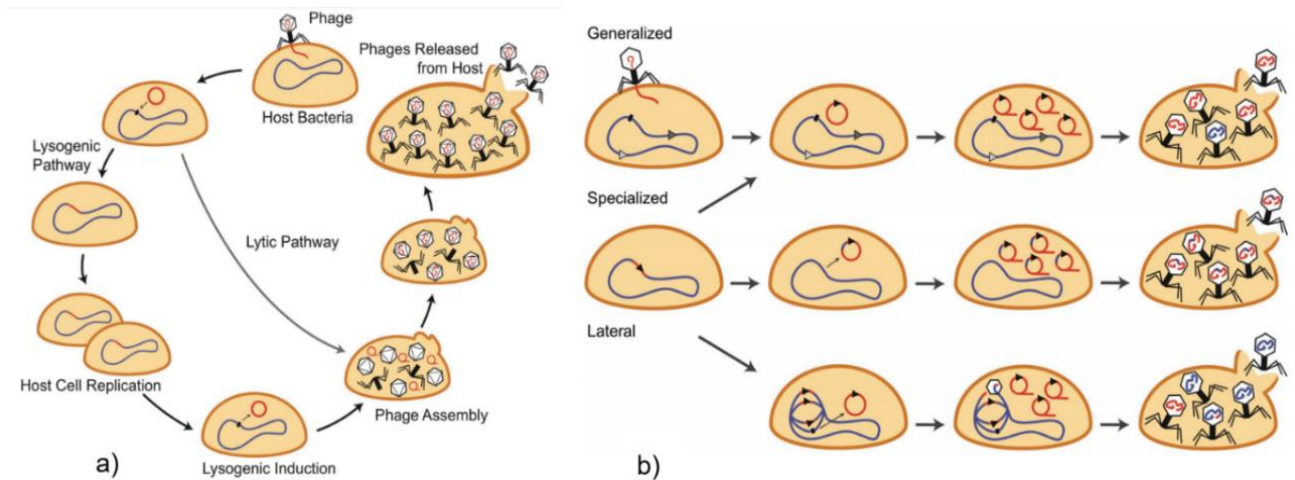


Figura 1. Ciclos de vida de los bacteriófagos. (a) Representación de las dos vías que de forma recurrente realizan estos virus, una de ellas es el ciclo lítico donde luego de ingresar el material genético al interior de la célula, éste se circulariza lo que posteriormente activará la vía de replicación y también la transcripción del genoma vírico para comenzar a ensamblar varios viriones. La segunda vía corresponde al ciclo lisogénico, aquí el virión integra su material genómico en el genoma bacteriano manteniéndose en un estado latente por lo que puede replicarse en conjunto al material genético de la bacteria donde se aloja. (b) Distintos tipos de transducción y distribución del material genético cuando el virus se escinde del cromosoma bacteriano, además es posible observar la transducción lateral o especializada que puede llevar a cabo un profago (Chiang et al., 2019).

Los potenciales efectos perjudiciales de la transducción especializada compensan con la replicación theta, un tipo de replicación bidireccional *in situ* que crea múltiples genomas integrados y paralelamente ocurre la maduración del fago (Chiang et al., 2019; Chen et al., 2018). El mecanismo anterior permite la transferencia de regiones genéticas grandes con una frecuencia de transducción incrementada (Chen et al., 2018).

Algunos fagos denominados temperados o atenuados, pueden llevar a cabo los dos ciclos infectivos mencionados. En caso de mantenerse en estado lisogénico, se denominan profagos y se consideran parásitos intracelulares, debido a que su existencia está relacionada al éxito y supervivencia del hospedero o lisógeno bacteriano en donde se encuentran (Patil et al., 2021; Chiang et al., 2019). Una vez dentro de las bacterias, los profagos se integran a su genoma a través de recombinasas, en donde las integrasas virales reconocen sitios de unión específicos en el genoma bacteriano (*attB*), los cuales comparten similitudes con los sitios de unión en el genoma viral (*attP*) (Feiner et al., 2015) y se replican de manera pasiva cuando ocurre la división celular bacteriano, o conforman una especie o tipo de plásmido (Feiner et al., 2015). A pesar de que estas secuencias determinan la especificidad del fago por el genoma bacteriano, también es posible utilizar sitios secundarios, lo cual se ha descrito en fagos λ de *Escherichia coli* y en fagos Mu que se integran de forma aleatoria en el genoma del

hospedero (Feiner et al., 2015). Para mantenerse en el estado de profago, estos requieren de la represión de los genes específicos para el ciclo lítico y la expresión de genes pro-lisogénicos, en donde el más relevante es el gen represor del ciclo lítico denominado *cI* que actúa como un interruptor genético para controlar el balance entre la lisis y lisogenia (Davies et al., 2016). De forma paralela, los profagos pueden escindirse del cromosoma bacteriano previo a una inducción, la cual se da en respuesta a condiciones de estrés del hospedero, por ejemplo, el daño en el ADN bacteriano (Davies et al., 2016). La activación de genes pro-lítics luego de la inducción da paso para comenzar los procesos de replicación del genoma viral una vez está separado del genoma bacteriano y al lograr el circularizado del genoma viral, se produce el ensamblaje de la partícula viral, empaquetamiento del ADN en la cápside y finalmente la lisis celular (Feiner et al., 2015). La lisogenia establecida favorece el desarrollo de interacciones simbióticas entre virus y bacterias, esto se produce porque los profagos se benefician al promover la supervivencia y proliferación de sus hospederos dado que ciertos fagos codifican para proteínas que mejoran el estado general de la bacteria, un fenómeno conocido como conversión lisogénica (Feiner et al., 2015).

La lisogenia activa ocurre en profagos que se encuentran integrados dentro de los genes funcionales bacterianos y, por lo tanto, necesitan cooperar con sus hospederos para regular la adecuada y oportuna expresión de los genes alterados por la integración al genoma bacteriano (Feiner et al., 2015). Es así

que se ha determinado que el fago actúa como un interruptor-regulador (*Phage-RS*), ya que cuando se escinde del genoma activa nuevamente la codificación de un gen (Lang et al., 2012). Así mismo, se ha descrito un modo de intercambio de genes mediado por fagos, en donde este mecanismo reúne características de un transporte celular mediado por vesículas e infección viral, denominado transducción en serie, la cual consiste en partículas de pseudofagos tipo “vesículas de membrana”, denominadas agentes de transferencia de genes (GTAs), los cuales carecen de información genética para codificar proteínas de los viriones, pero portan grandes fragmentos aleatorios de ADN del hospedero desde donde realizó su ciclo y si mantiene su capacidad infectiva puede transducir otras células bacterianas (Lang et al., 2012). Por otro lado, es posible encontrar profagos crípticos, los que son descritos como fagos atrapados en el cromosoma del hospedero por rearrreglos genómicos de la bacteria, lo que genera que los fagos sean inactivos en términos de producir la lisis celular, producción de partículas virales y de unidades formadoras de placas (UFP) (Lang et al., 2012; Wang et al., 2010). Un estudio analizó mediante técnicas *in silico* la distribución de genes de virulencia y resistencia a antibióticos en regiones asociadas a profagos utilizando 1623 secuencias de genomas de patógenos asociados a Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) almacenadas en la base de datos “GenBank” (Kondo et al., 2021). Para efectos de este trabajo se pudo determinar que un 21% de los aislados bacterianos poseían genes de resistencia a los antimicrobianos asociados a elementos tipo

profagos los cuales se insertaban y acumulaban preferentemente en la secuencia del virus, por lo que estos genes de resistencia eran heredados por el genoma bacteriano (Kondo et al., 2021). Además, se evidenció que un 46,2% de los profagos que albergaban genes de resistencia tendían a volverse defectivos o crípticos, ya que la dinámica evolutiva entre la bacteria y el fago, hace que este último este bajo una selección por parte del hospedero, ya que puede matarlo (Kondo et al., 2021; Bobay et al., 2014). Por lo tanto, la frecuencia de inducción del profago disminuía por la presencia del antibiótico, debido a que la bacteria requiere de los genes de resistencia asociados al profago para resistir la terapia antibiótica y, al mismo tiempo, el profago está sujeto a degradación genética por parte de la bacteria debido a mutaciones como deleciones (Bobay et al., 2014). Además, pudo determinarse que la portación estaba asociada mayormente a los profagos asociados a integrones, ya que estos últimos son EGM que albergan un gen *intI* que codifica para una integrasa y de forma adyacente a *attI*, un sitio de integración que puede reconocer otras secuencias genéticas cortas de 7-8 pb (*attC*) de un cassette genético el cual puede albergar uno o más genes de resistencia a antibióticos (Kondo et al., 2021; Partridge et al., 2018).

***Pseudomonas aeruginosa*: patógeno oportunista en Infecciones Asociadas a la Atención de la salud (IAAS)**

P. aeruginosa corresponde a un bacilo Gram negativo ubicuo y persistente en el medio ambiente, es además aerobio facultativo, ya que puede utilizar nitrato o nitrito como aceptor de electrones terminal en condiciones anaeróbicas, es no formador de esporas, posee motilidad unipolar, y puede crecer entre 20-43°C. No fermenta glucosa, es capaz de utilizar como fuentes de carbono y nitrógeno al acetato y amoníaco, respectivamente, y obtiene energía de la oxidación de azúcares (Filloux & Ramos, 2022). Sumado a estas capacidades, *P. aeruginosa* posee un genoma de mayor tamaño en comparación con otras bacterias Gram negativas secuenciadas (Klockgether et al., 2011; Sawa et al., 2020). Adicionalmente, esta especie posee una elevada capacidad de capturar Genes exógenos, por lo que se considera como una especie de gran “plasticidad genómica”, en donde es capaz de adaptar material genético extracromosomal para luego ser parte de su genoma accesorio, el cual generalmente es propio de cada cepa o incluso clones (Klockgether et al., 2011; Sawa et al., 2020). Este microorganismo es considerado un patógeno oportunista capaz de causar infecciones en pacientes inmunocomprometidos, siendo estos últimos residentes generalmente en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), en donde pueden producir infecciones muchas veces fatales (Lister et al., 2009; Pang et al., 2019).

Específicamente, *P. aeruginosa* se describe comúnmente como causante de neumonías asociadas a ventilador mecánico (NAVM), neumonías adquiridas en hospital (HAP) e infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) (American Thoracic Society, 2005). En el año 2017 la Organización Mundial de la Salud clasificó a *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, como un patógeno de prioridad crítica, para el cual se necesita el desarrollo de nuevos antibióticos ya que representa una seria amenaza a nivel global porque es causante de una alta tasa de mortalidad, prolongadas estadías hospitalarias y elevados costos en el sistema de salud (Quiñones, D. 2017). En Chile es un agente etiológico prevalente de NAVM y segundo lugar en casos de neumonía pediátricos en UCI, también ha sido aislado de infecciones urinarias en paciente con catéter urinario permanente (CUP), heridas operatorias e infecciones del torrente sanguíneo en pacientes inmunodeprimidos donde ocupa el segundo lugar de microorganismos más aislados (Paz Zarza et al., 2019; Tomás da Costa et al., 2021).

La resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa* puede abarcar varios grupos de drogas al mismo tiempo, en donde comúnmente se clasifica como MDR (Angeletti et al., 2018). Por ejemplo, en un estudio realizado en el Hospital Universitario, Campus Biomédico de Roma se analizaron 193 cepas clínicas de *P. aeruginosa*, en donde 69 de ellas resultaron resistentes en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, siendo 21 de estas clasificadas como Multidrogoresistentes (MDR) (Angeletti et al., 2018). Cabe destacar que *P.*

aeruginosa se le considera naturalmente insusceptible a diversos antibióticos, ya que posee distintos mecanismos intrínsecos de resistencia, tales como la reducción en la permeabilidad de su membrana externa, alteración de las porinas, principalmente de OprD, expresión de bombas de expulsión y enzimas de inactivación (Pang et al., 2019). Adicionalmente, también posee mecanismos de resistencia adquiridos que han sido obtenidos por THG (Pang et al., 2019; Mulcahy et al., 2014). La resistencia a antibióticos β -lactámicos en *P. aeruginosa*, específicamente a carbapenémicos como imipenem, meropenem y ertapenem son de particular relevancia, ya que corresponden a los antibióticos de última línea para el tratamiento de infecciones graves causadas por este patógeno (De Oliveira et al., 2020). En *P. aeruginosa* la resistencia a carbapenémicos se encuentra mediada por 3 mecanismos: i) reducción en la expresión de porinas en membrana externa, principalmente la porina OprD, ii) producción de carbapenemasas y iii) sobreexpresión de bombas de expulsión (Li et al., 2012; Breidenstein et al., 2011; Angeletti et al., 2018).

Los últimos informes sobre carbapenemasas indican que algunas cepas de *P. aeruginosa* acarrean o albergan más de una carbapenemasa (Pacheco et al., 2019). Mayormente en *P. aeruginosa* se han encontrado la producción de las siguientes carbapenemasas: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) y *Guiana Extended Spectrum* (GES) entre la clase A (Yoon et al., 2021; Oliver et al., 2015). Dentro de las MBL que pertenecen a la clase B en clasificación Ambler

han sido halladas las enzimas *Imipenem metallo- β -lactamase* (IMP), *Verona Integron-encoded metallo- β -lactamase* (VIM), *Sao Paulo metallo- β -lactamase* (SPM) y *New Delhi metallo- β -lactamase* (NDM) prevalentemente (Yoon et al., 2021; Oliver et al., 2015). Mientras que de la clase D identificadas en *P. aeruginosa*, se han descrito a OXA-40, OXA-48 y OXA-198 (Yoon et al., 2021; Oliver et al., 2015). La predominancia de carbapenemasas en *P. aeruginosa* corresponde a MBLs y los genes que fueron adquiridos de esta clase de enzimas fueron encontrados en el integrón de clase 1 (Oliver et al., 2015, Poole et al., 2011; Spagnolo et al., 2021). En Chile un reciente estudio de aislados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de diversos hospitales determinó la predominancia de *bla_{KPC}* y *bla_{VIM}*, pero sin informar cepas que co-portan ambos genes. (Tomás da Costa et al., 2021).

Por otro lado, la búsqueda de fagos pro parte de Brown-Jaque y colaboradores (2018) analizaron 71 muestras de esputo de pacientes con fibrosis quística, en donde los investigadores encontraron diversos genes de β -lactamasas en el ADN viral, detectando múltiples copias de los genes *bla_{VIM}*. Cabe destacar que de estas muestras la mayoría de aislados bacterianos correspondieron a *P. aeruginosa* representando un 46,5% del total (Brown-Jaque et al., 2018).

En cuanto a *P. aeruginosa*, es difícil encontrar información esclarecedora de estos fago-plásmidos y su implicancia en esta especie. Un reporte sobre hallazgo

de profagos entre 5383 genomas públicos de *P. aeruginosa* almacenados en NCBI (del inglés, *National Center for Biotechnology*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>), fue posible detectar 6582 profagos integrados y no integrados con alta fidelidad, en donde 42 profagos estaban asociados a 71 genes de resistencia a antibióticos (Johnson et al., 2022). Un trabajo hecho por Galetti et al. (2019), describió un fago tipo plásmido. Previamente habían identificado un plásmido pequeño (pBH6) que acarreaba *bla_{KPC-2}*, resolvasa de Tn3, y la transposasa ISKpn6 tnp. Este plásmido recombinó con el profago BH9 formando una estructura híbrida. Interesantemente, BH9 se encontraba en el cromosoma en forma de profago en la cepa estudiada (Galetti et al., 2019).

PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACION

La diseminación de carbapenemasas entre patógenos de relevancia clínica supone un gran problema para las terapias antibióticas con carbapenémicos. En *P. aeruginosa*, la resistencia a carbapenémicos se debe principalmente a cambios en la permeabilidad de membrana. Sin embargo, la proporción de aislados de esta especie portadores de carbapenemasas ha ido en aumento. El rol de los plásmidos en la diseminación es conocido, pero el rol de los bacteriófagos que tienen la capacidad de integrar su material genético al genoma bacteriano se ha considerado menos relevante. El genoma accesorio de *P. aeruginosa* se encuentra abierto a rearrreglos genéticos, en donde los EGM tienen un importante rol evolutivo como los fagos y podrían asociarse a genes de carbapenemasas a través de la interacción con otros EGM, facilitando su diseminación a otras bacterias.

¿Es posible identificar profagos asociados a genes de carbapenemasas en el genoma de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos y productoras de carbapenemasas a través de análisis *in silico*?

HIPÓTESIS

En las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos y productoras de carbapenemasas, los profagos, encontrados por tecnología *in silico* portan genes que codifican para carbapenemasas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar por tecnología *in silico* si los profagos de 40 cepas de *P. aeruginosa* se encuentran asociados a genes de carbapenemasas, utilizando la secuenciación del genoma completo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar presencia de genes de carbapenemasas presentes en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos y productoras de carbapenemasas.
2. Identificar la presencia de profagos en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos y productoras de carbapenemasas.
3. Asociar los profagos con genes de carbapenemasas en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos y productoras de carbapenemasas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinar los tipos de carbapenemasas presentes en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos y productoras de carbapenemasas.

Se trabajó con 40 cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos y productoras de carbapenemasas aisladas de hospitales chilenos y almacenadas en el biorepositorio del Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos (LIAA) de la Universidad de Concepción. Se realizó la extracción de ADN acorde a los protocolos del fabricante del kit “*InstaGene® Matrix*” (BIO-RAD, California), por lo cual primero se sembró en agar TSA (del inglés, “*Trypticase Soja Agar*”) y se incubó a 37°C por una noche. Después se tomaron entre 4-5 colonias aisladas y puras desde la placa de Petri y fueron suspendidas en 200 µL de PBS en un tubo Eppendorf de 1,5 mL, se realizó una centrifugación a 12.000 rpm. durante 1 min, y posteriormente, se removió el sobrenadante. Luego, fueron adicionados 200 µL de “*InstaGene® Matrix*” (BIO-RAD, California) a los tubos, resuspendiendo el pellet de células. Se les realizó vórtex por 10 s y se incubaron en un baño de agua a 56°C durante 30 min. Se hizo otro vórtex durante 10 s y se incubaron en termobloque a 100°C durante 8 min. Después fue hecho un último vórtex por 10 s y se centrifugó a 12.000 rpm por 3 min. Finalmente, se

recuperó 150 µL del sobrenadante que fueron traspasados a otro tubo Eppendorf estéril de 1,5 mL.

Con el ADN recuperado se realizó una PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) utilizando el protocolo de Poirel et al. (2011) modificado para PCR de punto final o convencional. En un tubo Eppendorf de 200 µL, se añadió 1 µL del ADN recuperado, 5 µL de “GoTaq® G2 Green Master Mix” (Promega, Maddison) y 0,1 µL de cada cebador o partidor “Forward” y “Reverse”. Por último, la mezcla se completó con 3,8 µL de agua libre de nucleasas, obteniéndose 10 µL de volumen final para la reacción. Los partidores que fueron utilizados están indicados en la Tabla I.

Tabla I: Partidores y parámetros utilizados para la búsqueda de genes de carbapenemasas mediante PCR simple.

Gen	Partidores (5'-3')	Tamaño amplicón (pb)	Programa PCR
<i>bla</i> _{KPC}	F: -ATGTCACTGTATCGCCGTCT	893	1) 95°C por 15 min. 2) 38 ciclos de 94°C por 1 min, 62°C por 1 min y 72°C por 1 min. 3) 72°C por 10 min.
	R: TTTTCAGAGCCTTACTGCCC		
<i>bla</i> _{VIM}	F: CCGATGGTGTGTTGGTCGCAT	391	1) 95°C por 5 min. 2) 30 ciclos de 95°C por 1 min, 58°C por 1 min y 72°C por 1 min. 3) 72°C por 7 min.
	R: GAATGCCGAGCACCAGGAT		
<i>bla</i> _{NDM}	F: GCAGCTTGTCGGCCATGCGGGC	782	1) 94°C por 10 min. 2) 36 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 30 s y 72°C por 45 s. 3) 72°C por 2 min.
	R: GGTGCGGAAGCTGAGCACCGCAT		
<i>bla</i> _{OXA-48}	F: GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438	Parámetros adaptados de Poirel et al., 2011.
	R: CATCAAGTTCAACCCAACCG		
<i>bla</i> _{IMP}	F: GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	232	
	R: GGTTTAAYAAAACAACCACC		
<i>bla</i> _{SPM}	F: AAAATCTGGTACGCAAACG	271	
	R: ACATTATCCGCTGGAACAGG		
<i>bla</i> _{GIM}	F: TCGACACACCTTGGTCTGAA	477	
	R: AACTTCCAACCTTTGCCATGC		

Los controles de PCR utilizados correspondieron a los siguientes; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ® (Manassas, Virginia) como control negativo y de controles positivos fueron cepas almacenadas en el biorepositorio del LIAA, estas fueron (*Serratia marcescens*, UC-143) productora de IMP, (*P. aeruginosa*, UCO-454) productora de KPC, (*Klebsiella pneumoniae*, K-2044) productora de NDM, (*K. pneumoniae*,) productora de VIM, UC-274 (*P. aeruginosa*, K-2070) productora de SPM, (*K. pneumoniae*, UC-322) productora de OXA-48 y (*P. aeruginosa*, UC-275) productora de GIM.

En los casos en que no hubo detección de los genes anteriores, se buscaron las restantes carbapenemasas mediante las condiciones de PCR utilizadas por Poirel et al., 2012. Una vez terminados los ensayos, los productos fueron revelados en un gel de agarosa al 1,5% al cual se le agregará 3 µL de la tinción “MaestroSafe® Nucleic Acid Prestained MR-031203” 6X (MaestroGen, Hsinchu). Posteriormente, se cargarán 5 µL de los productos PCR en los pocillos del gel. Además, se utilizará una cámara electroforética “ENDURO™ 7.7” (LabNet, Edison), en donde se realizará una corrida a 90V durante 50 min, utilizando buffer TAE 0,5X para estabilizar las cargas eléctricas. El revelado de las bandas de ADN será hecho en UVITEC (Cambridge) mediante radiación UV.

Identificar la presencia de profagos en genomas de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos y productoras de carbapenemasas.

Extracción de ADN.

La extracción de ADN fue hecha de manera similar a la PCR, recuperando 60 µL a una concentración >5 mg/µL, ya que se necesitó de al menos 100 ng de ADN para la preparación de librerías. El ADN se envió a un proveedor externo (SeqCenter, Pittsburgh). Debió enviarse en cadena de frío adecuada para evitar la degradación del ADN.

Secuenciación por síntesis de extremos pareados.

La preparación de librerías fue hecha utilizando el kit “Illumina DNA Prep kit” y los índices “IDT 10 pb UDI”. Se realizó secuenciación de ADN utilizando la tecnología “Illumina” en extremos pareados con un largo de 150 pb por lectura (2x151 pb) utilizando la plataforma “NextSeq 2000”.

Análisis de datos y ensamblaje del genoma.

El análisis de calidad fue hecho por el proveedor externo, el cual realizó “*Demultiplexing*”, control de calidad y remoción de adaptadores utilizando “*bcl-convert* (v3.9.3). Además, se incluyó las estadísticas de secuenciación en el archivo “*DNA Sequencing Stats.xlsx*”. Posteriormente, se continuó con el

ensamblaje de los fragmentos, en este caso las lecturas de las secuencias resultantes fueron unidas nuevamente. Los datos fueron ensamblados en el servidor de “*Galaxy Australia*” (Afgan et al., 2016) utilizando la herramienta “*Unicycler*” basada en algoritmo “*SPAdes*” (Wick et al., 2017) alojada en este servidor web. Los parámetros de “*Unicycler*” fueron establecidos en “*Paired end data*”, “*Bridging mode*” se dejó en “*Normal*” (“*moderate contig size and misassembly rate*”), se excluyó “*contigs*” con largos menores a 100 pb, fueron utilizados segmentos cortos de anclajes y el número de secuencias lineares se estableció en 0. Finalmente, se obtuvo múltiples “*contigs*” de distintos largos pb en archivos formato FASTA (fasta).

Posteriormente, se realizó una evaluación de la calidad de ensamblaje mediante la herramienta “*QUAST*” que se encuentra en el servidor web “*Galaxy Australia*” (Gurevich et al., 2013). Para aquello se cargaron las secuencias en formato .fasta, se seleccionó la colección de datos correspondiente a los 40 genomas secuenciados y se ejecutó con los parámetros predeterminados.

Identificación de especie y secuencio-tipo (ST).

Los 40 genomas ensamblados fueron analizados mediante “*Basic local alignment search tool*” (BLAST). En un principio, se identificó la especie de las cepas con “*SpeciesFinder 2.0*” (Larsen et al., 2014; Hasman et al., 2014; Clausen et al., 2018), alojada en el servidor web “*Center for Genomic Epidemiology*”

(Kongens Lyngby, Dinamarca). Mediante BLAST se comparó el genoma de las cepas con las secuencias de ADN del gen codificante de la subunidad 16S rRNA de una especie determinada (en este caso *P. aeruginosa*) almacenada en la base de datos utilizando “RNAmmer”. Para los casos en donde no se obtuvo un resultado satisfactorio, se utilizará la herramienta “KmerFinder 3.2” del servidor web “*Center for Genomic Epidemiology*”, ésta realizó una predicción de la especie bacteriana por mapeo mediante KMA (del inglés, “*k-mer alignment*”) que está basado en el algoritmo de Needleman-Wunsch y el esquematizador de puntajes “ConClave” (Clausen et al., 2018). Con esta herramienta fueron analizados y comparados los genomas moldes o “*template*” depositados en bases de datos y genomas de las cepas utilizando los “k-meros”, los que corresponden a un largo determinado de monómeros nucleotídicos de longitud k. Estas debieron ser cargadas en la plataforma en formato FASTA.

Por otra parte, en el servidor “Galaxy Australia” se utilizó la herramienta MLST (del inglés, “*Multilocus sequence typing*”) (Tseemann et al., 2016; Jolley et al., 2010). En esta se identificó los ST de las cepas en estudio, por lo cual debió cargarse los genomas en formato FASTA y se ejecutó la herramienta con sus parámetros predeterminados. Para aquellos casos en donde no se identificó el ST, se utilizó la herramienta “MLST2.0” alojada en el servidor “*Center for Genomic Epidemiology*” para determinar el ST cercano o aproximado de las cepas en estudio (Larsen et al., 2012; Bartual et al., 2005; Griffiths et al., 2010;

Lemee et al., 2004; Wirth et al., 2006; Jaureguy et al., 2008; Camacho et al., 2009). Los parámetros fueron establecidos de la siguiente forma; *Pseudomonas aeruginosa* (“Select MLST configuration”), 5X (“Select minimum depth for an allele”) y “Assembled or Draft Genome/Contigs (fasta)”.

Búsqueda de genes de resistencia a antibióticos *in silico*.

En forma paralela, se utilizarán los genomas de las cepas cargadas en “Galaxy Australia”, a las cuales se les realizó una búsqueda e identificación de genes de resistencia mediante “ABRicate” (Seemann et al., 2016). En ella se escogió trabajar con las herramientas “ResFinder” y “CARD” (del inglés, *Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) mediante BLAST en sus respectivas bases de datos (Jia et al., 2017; Zankari et al., 2012). Los parámetros con los que se ejecutó la herramienta fueron un mínimo de 80% de identidad y cobertura del ADN.

Construcción de árbol filogenético

Se realizó un análisis filogenético de las cepas secuenciadas. Primero se realizó una anotación genómica de las 40 cepas secuenciadas, por lo que se utilizó la herramienta “Prokka” que se encuentra disponible en “Galaxy Australia”. Se cargaron los archivos, se dejó de forma predeterminada la configuración para el análisis y fue generado un archivo en formato GFF3 con anotaciones funcionales

para cada gen. Posteriormente, se utilizó “Roary” (Page et al., 2015) que está implementada para su uso en “Galaxy Australia”, con esta herramienta se realizó un BLASTP con una identidad de porcentaje mínima de 95% y se estipuló que un 99% de las cepas debe poseer el gen para considerarlo parte del genoma “core”. Una vez finalizado el análisis, se utilizó el archivo “*Core gene alignment*” (.fasta) para construir el cladograma. Para el análisis filogenético se utilizó como genoma de referencia la cepa de *P. aeruginosa* denominada “PAO1” (NC_002516), se utilizó el programa “IQ-TREE” disponible en “Galaxy Australia” (Nguyen et al., 2014), se cargó el archivo del alineamiento del genoma “core” y se ejecutó. Se construyó un árbol filogenético con el método “*Maximum likelihood*” utilizando un “Bootstrap” de 1000. La visualización y edición del árbol filogenético fue hecha en “iTOL” (Letunic & Bork, 2021), en donde se utilizó el archivo en formato “Newick” (.nhx) que se generó con el análisis hecho en “IQ-TREE”.

Búsqueda de profagos a través de análisis *in silico*.

Para esto se utilizó “PHASTER”, un servidor web que permitió la identificación y anotación rápida de secuencias de profagos dentro de genomas bacterianos (Arndt et al., 2016). Esta herramienta utiliza BLAST+ v2.3.0 (Camacho et al., 2009), por lo que realizará un alineamiento de los genomas de las cepas y secuencias almacenadas de fagos en NCBI y otra base de datos de profagos

desarrollada por Srividhya et al. 2006. Por lo tanto, los archivos .fasta de los genomas fueron cargados en el servidor web de “PHASTER” y se dejó activas las opciones “*My input consists of multiple separate contigs (FASTA format only)*” y “*Use pre-computed results if available (faster)*”. Una vez se ejecutó la búsqueda, comparación y análisis de genes de fagos, los resultados fueron agrupados en regiones de profagos mediante un algoritmo integrado en “DBSCAN”. Por otro parte, los genes que fueron detectados y no pertenezcan a fagos, serán anotados por un segundo BLAST que buscará y alineará en bases de datos de proteínas bacterianas de forma no redundante. Los resultados eran catalogados mediante puntuación en función de la proporción de genes de fagos hallados, principalmente, junto a otras características como detección de sitios anclaje (*att*). Esto permitió la clasificación en; intacto (>90), cuestionable (70-90) o incompleto (<70). Para la búsqueda de posibles secuencias asociadas a carbapenemasas se extrajeron solo los profagos intactos. De igual forma, para efectos comparativos se utilizó la plataforma “Prophage Hunter” (Song et al., 2019). En ella, se realizó la búsqueda de profagos en el genoma bacteriano en base a la similitud de secuencias dentro de la biblioteca personalizada de la plataforma mediante BLAST. En la comparación fueron usadas secuencias de fagos almacenadas en la base de datos “RefSeq”, perteneciente a NCBI y una clasificación de aprendizaje automático (“*machine learning*”) basada en las características genéticas de los profagos. El algoritmo mediante tres etapas combinó comparaciones de las secuencias genómicas bacterianas con las

secuencias genéticas de partes de fago conocidas agrupadas en clases (*“fuzzy matching”*), se escanearon sitios *att* (*“boundary locating”*) y realizó aprendizaje automático de las características genéticas de los profagos (*“activity scoring”*). Los profagos con puntaje mayor a 0,8 serán los activos y se extraerán sus resultados.

Asociar los profagos con genes de carbapenemasas en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos y productoras de carbapenemasas.

Obtención de secuencias aminoacídicas de regiones genéticas de profagos intactos.

Una vez que se completó el análisis en “PHASTER” y “Prophage Hunter”, se realizó un análisis de las CDS (del inglés, “Coding Sequence”) en la región genética correspondiente al profago intacto y/o activo. En “PHASTER” se buscó dentro del menú “*Details*” las “proteínas hipotéticas bacterianas”. Mientras que en “Prophage Hunter” se utilizó el archivo .txt que contiene todas las CDS detectadas, Posteriormente, se obtuvo las secuencias aminoacídicas en un archivo .txt que fue convertido a formato .fasta para análisis posteriores.

Las secuencias aminoacídicas de las proteínas hipotéticas bacterianas fueron sometidas a dos búsquedas: una específica que consistió en realizar “blastp” (*protein-protein* BLAST) para cada secuencia aminoacídica extraída en el

servidor web “*Beta-lactamase DataBase - Structure and function*” (BLDB) (Naas et al., 2017). Para ello, se utilizó la secuencia en formato FASTA en el recuadro de la sección “BLAST” de la página y se ejecutó utilizando los valores predeterminados. Una vez finalizado los alineamientos, los resultados fueron analizados acorde al valor E estadístico, un puntaje total y la cobertura del “*query*” seleccionada fue de >80% al compararla con la secuencia aminoacídica de referencia de la base de datos. Por otro lado, se realizó “blastp” mediante el algoritmo correspondiente en la plataforma BLAST de “NCBI”, en el apartado “*Standard Protein BLAST*”, en donde las secuencias aminoacídicas recolectadas fueron emparejadas con las bases de datos de proteínas y se identificó la proteína en cuestión. Para aquello, se configuró una búsqueda en bases de datos estándar, lo cual implicó utilizar todas las traducciones de CDS de “GenBank” no redundantes, “PDB” (del inglés, *Protein Data Bank*), “SwissProt”, “PIR” y “PRF”, mientras que los demás parámetros fueron dejados con parámetros estándar. Finalmente, los “*matches*” obtenidos con secuencias proteicas fueron seleccionados en base al mayor puntaje máximo, la cobertura de alineamiento fuera >80%, el valor E <10⁻⁵ y el porcentaje de identidad >90%, (Altschul et al., 1997; Altschul et al., 2005).

Visualización de la anotación genómica en las regiones de profagos de interés.

Para ayudar en la visualización de los resultados, se utilizó “Proksee” (<https://proksee.ca/>), para construir un mapa genómico o acorde al tamaño de

los “*contigs*” ordenado de menor a mayor de las cepas en estudio. Para ello, se cargó las secuencias genómicas en formato FASTA dentro de la plataforma web y se creó el mapa. Luego se utilizó la herramienta de anotación “Prokka” integrada en “Proksee” (Seemann, 2016). De forma paralela, se anotó de forma manual con la herramienta “*Graphics*” la región correspondiente a los profagos detectados. Esto se hizo utilizando el “*contig*” donde fueron hallados los profagos. Posteriormente, se linealizó las regiones genéticas en los “*contigs*” seleccionados y se anotó el entorno genético.

RESULTADOS

Determinar los tipos de carbapenemasas presentes en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos y productoras de carbapenemasas.

Fueron analizadas 40 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, las que se aislaron entre los años 1998-2021, en los centros de salud de las ciudades de Antofagasta (1), Concepción (7), Santiago (9), Temuco (17), Talca (4), Puerto Montt (1) y Talcahuano (1). El origen de las muestras correspondió a orina con 10% (4), tracto respiratorio 30% (11), sangre 8% (3), piel y partes blandas 21% (8), hisopado rectal 19% (7), secreciones 8% (3) y ambiental 3% (1). Solo un 8 % (3/40) de las muestras no pudo determinarse el origen. Del total de cepas, solo un 3% (1/40) no posee resistencia a carbapenémicos.

Los resultados de PCR demostraron que el 15% (6/40) de las cepas no portaban genes de carbapenemasas. La identificación de genes de carbapenemasas fue hecha mediante PCR simple, en donde las cepas que portaban una sola correspondió al 91% (31/34). Por otra parte, un 9% (3/34) correspondió a cepas que portaban dos carbapenemasas. En cuanto a los genes pesquisados por esta técnica, se logró amplificar un total de 37 genes de carbapenemasas, los cuales

correspondieron a *bla*_{VIM} en 50% (17/34), 41% *bla*_{KPC} (14/34), un 6% de las cepas fue coportadora de *bla*_{VIM} y *bla*_{NDM} (2/34) y solo un 3% era coportadora de *bla*_{VIM} y *bla*_{KPC} (1/34) . No hubo detección de genes *bla*_{OXA-48}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM} ni *bla*_{GIM}. A pesar de que 6 cepas resultaran negativas para este ensayo, se decidió secuenciarlas de todas formas. El origen de las cepas se puede observar en la Figura 2a y los resultados de la identificación de genes mediante PCR se muestran en la Figura 2b y 2c.

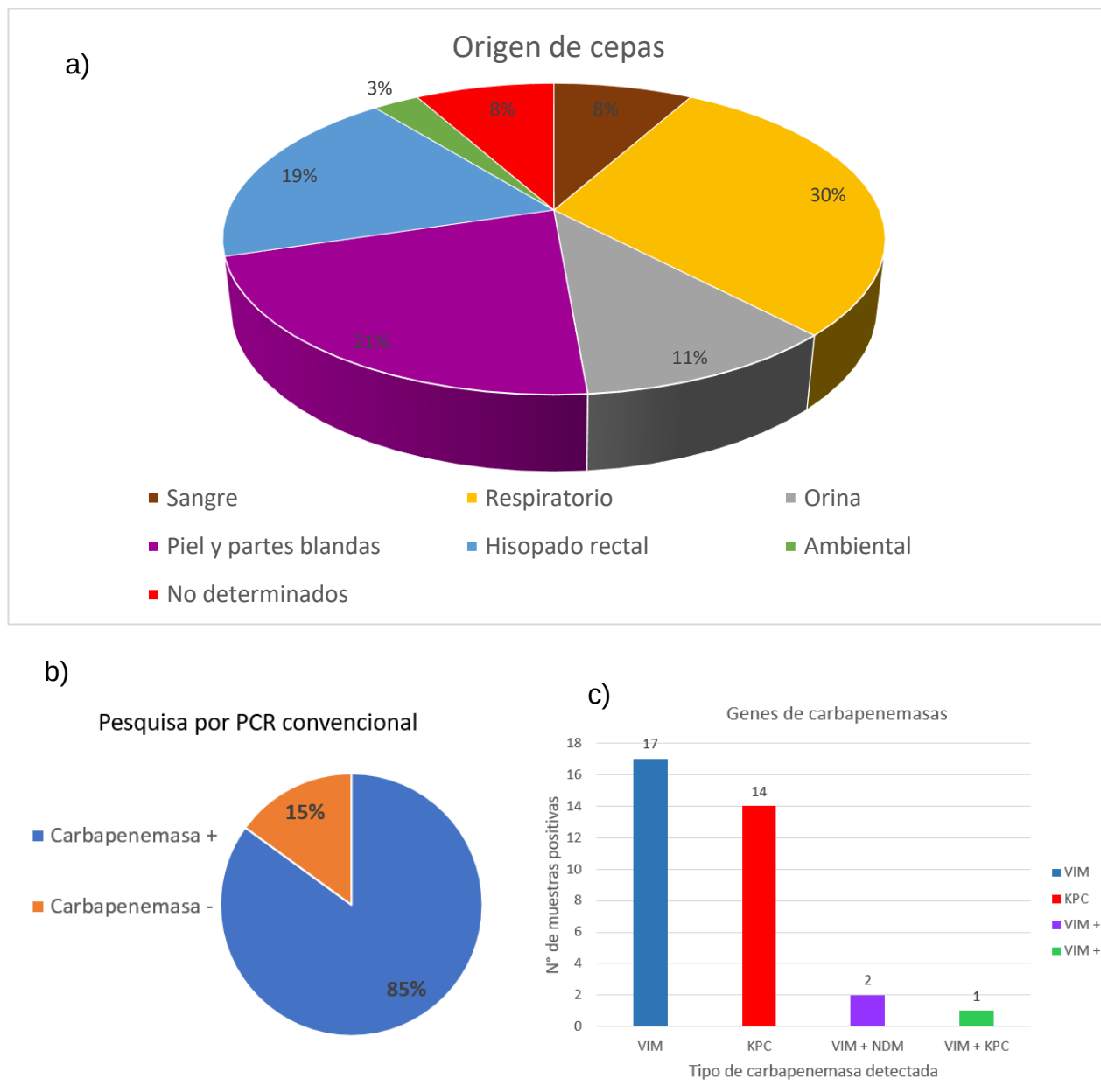


Figura 2: Origen de las cepas e identificación de genes de carbapenemasas en las 40 cepas de *P. aeruginosa*. (a) Representa la zona de recuperación de las muestras desde las cuales se aisló la cepa. (b) y (c) Indican los resultados obtenidos de los ensayos por PCR simple.

Identificar la presencia de profagos en genomas de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos y productoras de carbapenemasas.

En cuanto a los resultados de la secuenciación, se obtuvo una media de tamaño del genoma de 6,75 Mpb, el número de “*contigs*” que se obtuvo en promedio fue de 459, de estos el número de “*contigs*” >1000 pb tuvo un promedio de 329. Además, en promedio los “*contigs*” más largos fueron de 259815 pb. El tamaño de los genomas generados en relación al número de “*contigs*” queda demostrado en la Figura 3.

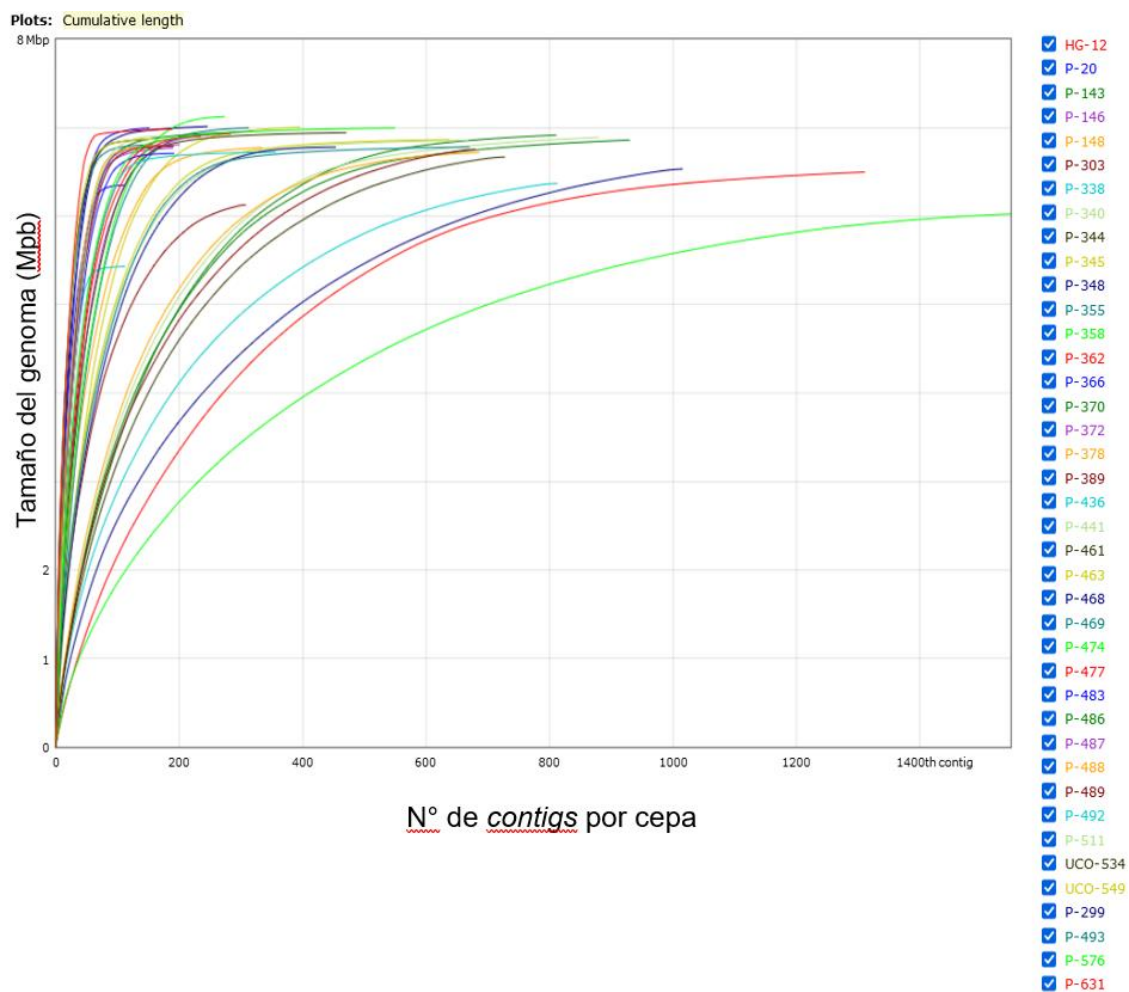


Figura 3: Comparación del tamaño de genomas y el respectivo número de *contigs* de las cepas secuenciadas.

Por otro lado, el valor estadístico para evaluar la calidad de ensamblaje fue el N50 que en promedio para la secuenciación de las cepas fue de 77884. En la Figura 4 es posible observar la correlación que hay entre el N₅₀ y el número de contigs en cada cepa. Más resultados y datos sobre calidad de ensamblaje por cada cepa se encuentran detallados en Anexo 1.

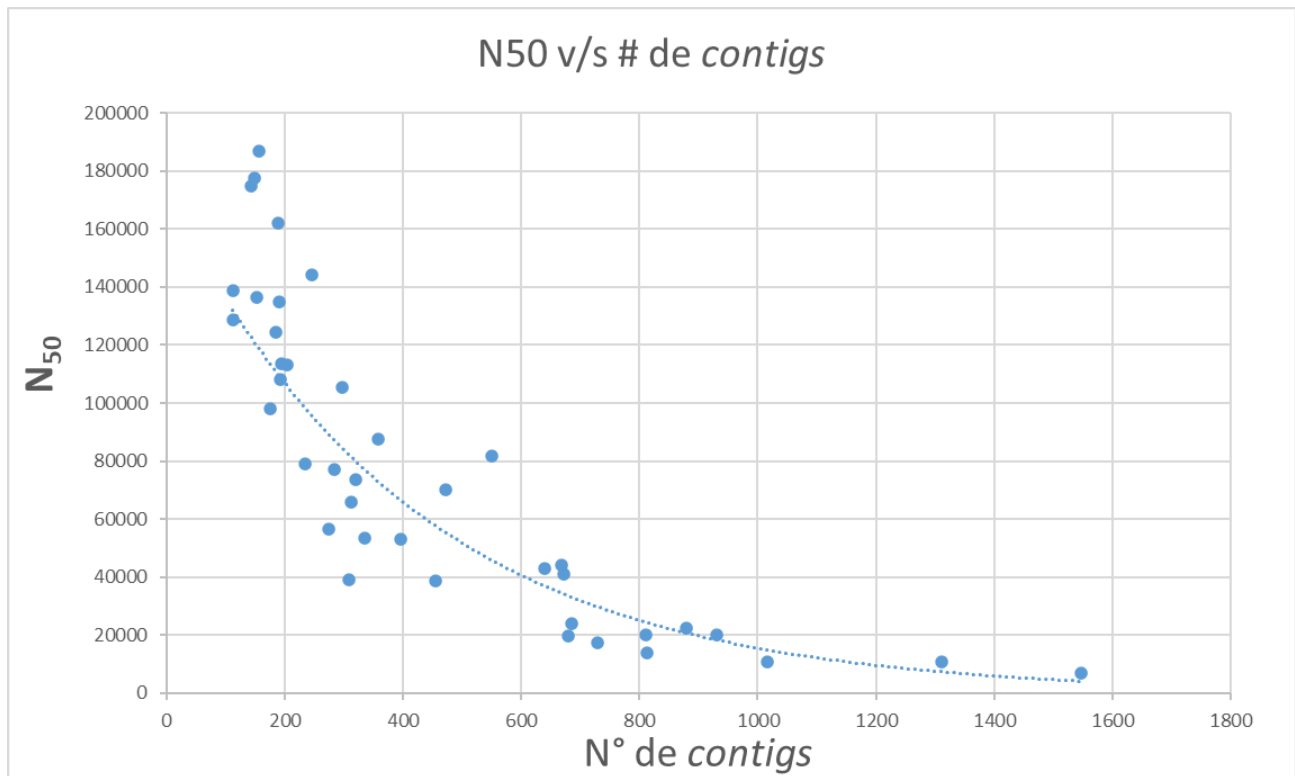


Figura 4: Correlación entre el N₅₀ y el n° de *contigs* que se obtuvieron en cada secuenciación y posterior ensamblaje de genomas.

La identificación de especie hecha por “*SpeciesFinder 2.0*” determinó que el 50% de las cepas se identificó como *P. aeruginosa*, en donde todas tuvieron un “*match*” similar con la cepa CP013144. Mientras que la población restante resultó negativo para *P. aeruginosa*, en las cuales el 75% (15/20) no tuvo “*match*” con CP013144, 10% (2/20) con EF011102, otro 10% (2/20) con CP008865 y un 5% (1/20) con JN982334, los resultados se observan en la Figura 5a. Por otro lado, la identificación en la que se utilizó “*KmerFinder 3.2*” fue posible verificar que el 97,5% (39/40) de las cepas correspondía a *P. aeruginosa*. Solo una resultó ser *Pseudomonas sp*, la cual fue más cercana a *P. putida* y quedó fuera de análisis posteriores, como puede demostrarse en la Figura 5b.

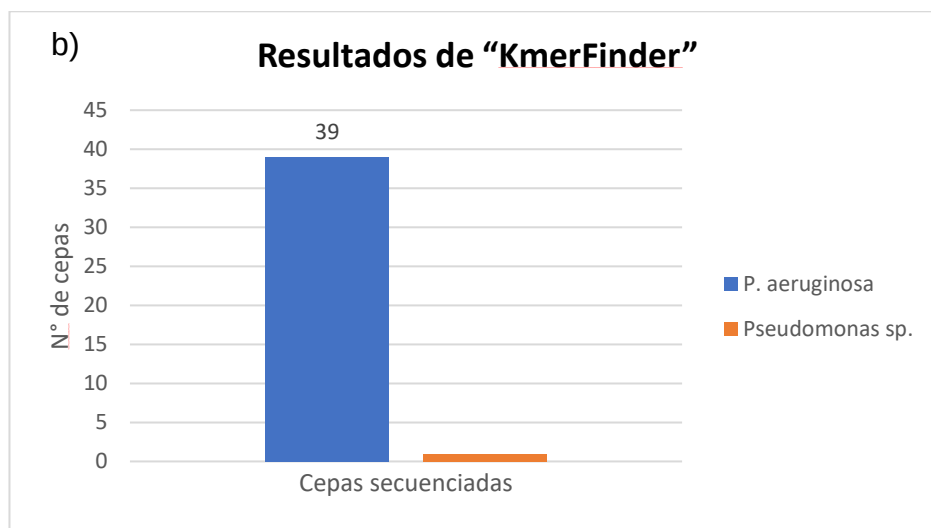
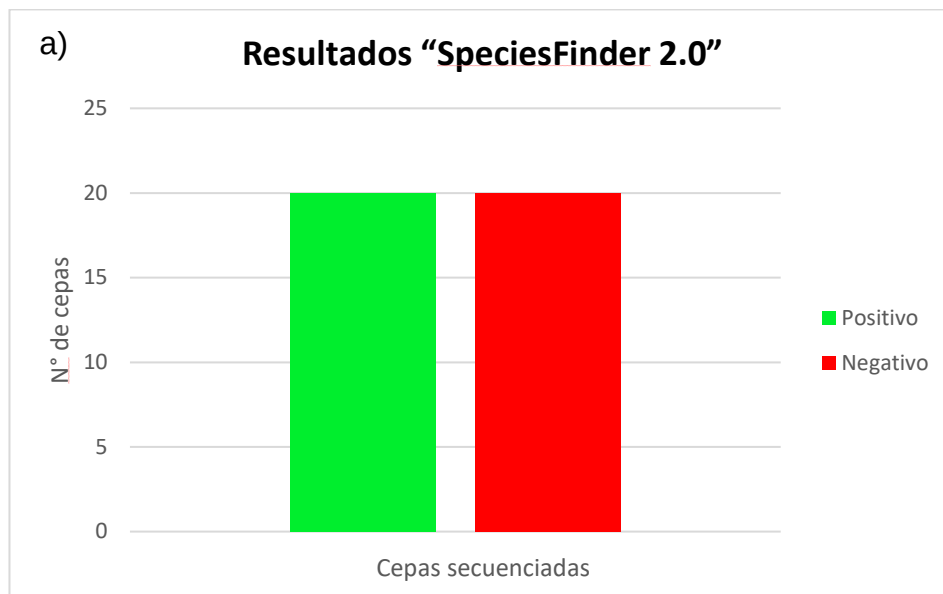


Figura 5: Predicción de especie mediante herramientas bioinformáticas. (a) BLAST hecho en "SpeciesFinder 2.0". (b) BLAST hecho en "KmerFinder".

La identificación de genes de carbapenemasas mediante ABRicate resultó ser similar a la PCR de punto final en cuanto a resultados positivos con un 87% (34/39) de cepas portadoras de al menos una carbapenemasa, en donde una cepa quedó fuera de análisis por ser otra especie. La predicción de genes fue la siguiente, el número de predicciones de *bla_{VIM}* fue de 50% (17/34), 44 % *bla_{KPC}* (15/34) y un 6% de las cepas era co-portadora de *bla_{VIM}* y *bla_{NDM}* (2/34). Los resultados obtenidos quedan demostrados en la Figura 6. Por otro lado, en la Tabla II puede observarse la correlación en la identificación de los genes de carbapenemasas para la cual se obtuvo un 98% (39/40) de coincidencias, ya que no por análisis *in silico* no se halló la co-portación de *bla_{VIM}* y *bla_{KPC}*.

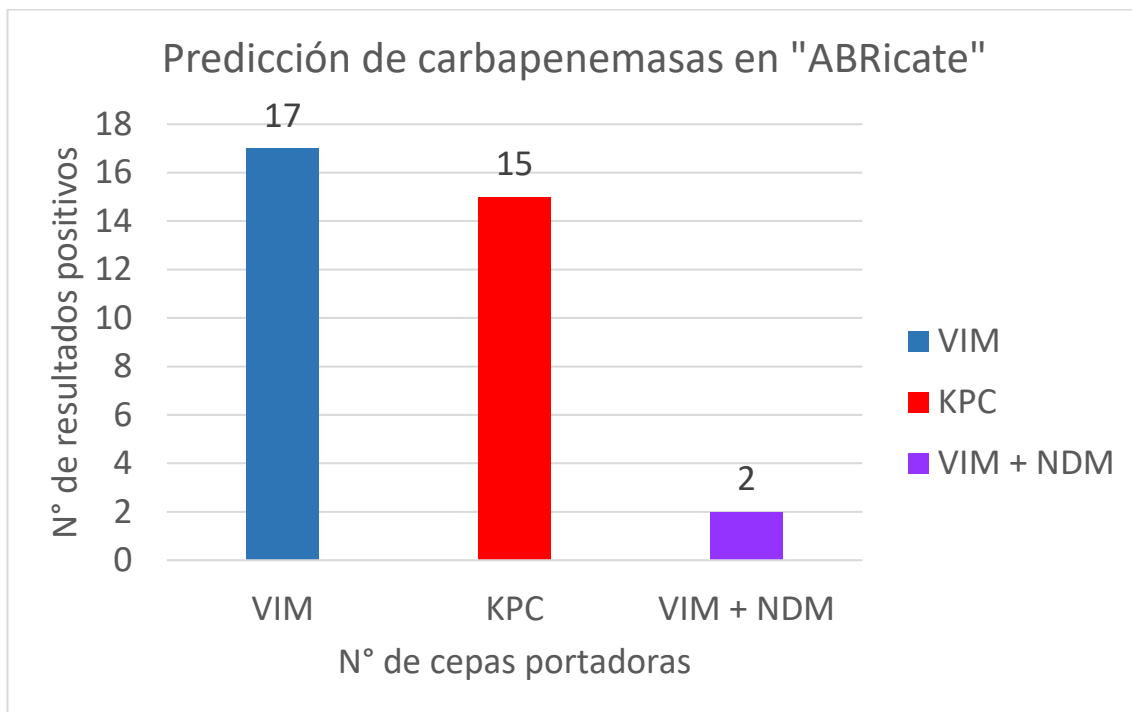


Figura 6: Predicción de genes de carbapenemasas mediante herramientas bioinformáticas. Se excluyó del análisis la cepa que resultó ser *P. putida*.

Tabla II: Comparación de identificación de carbapenemasas mediante técnica PCR de punto final y análisis *in silico*.

Carbapenemasas	PCR	ABRicate
KPC	14	15
VIM	17	17
VIM + NDM	2	2
VIM + KPC	1	0
No portadoras	6	6

El análisis del ST hecho en “MLST” determinó que la mayoría de cepas secuenciadas con un 50% (19/39) correspondió al ST-654, el 15% (6/39) a ST-111 y el 8% al ST-308. Los ST-395, ST-815, ST-179, ST-3348, ST-773 y ST-17 tuvieron un solo representante en cada uno. Solo el 5% (2/39) de las cepas no pudo determinarse el ST (Figura 7a). Además, pudo observarse que el ST-654 está altamente relacionado con la portación de KPC, ya que esta carbapenemasa solo se encontró en ese grupo. Mientras que VIM se distribuyó de forma heterogénea entre los distintos STs (Figura 7b).

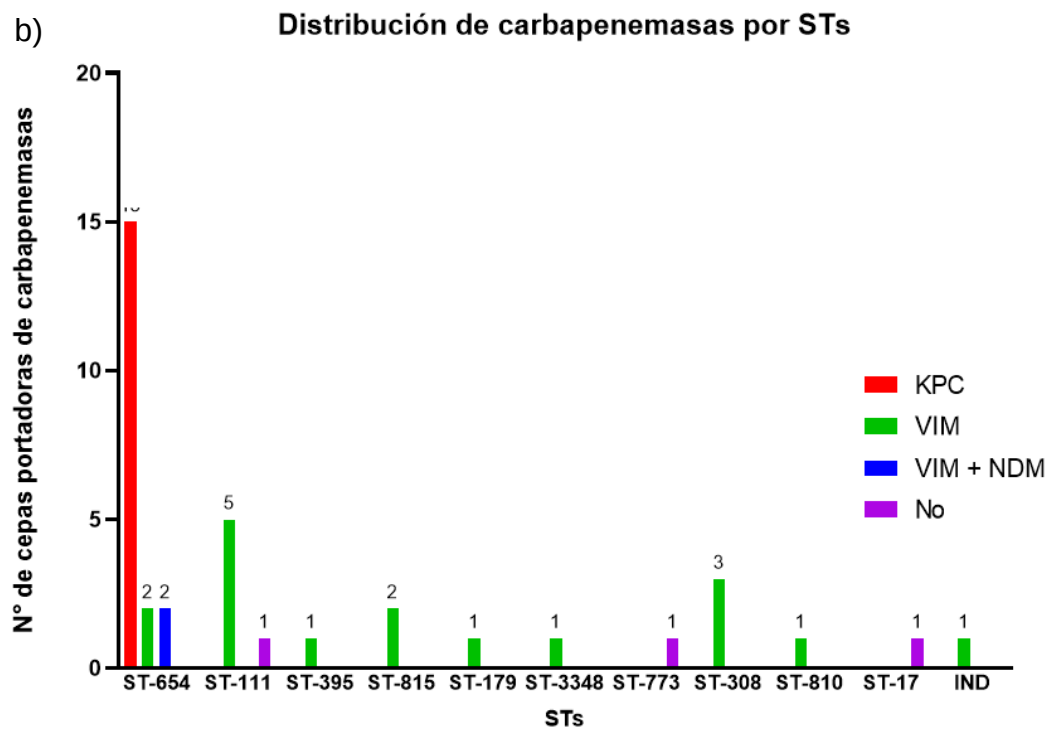
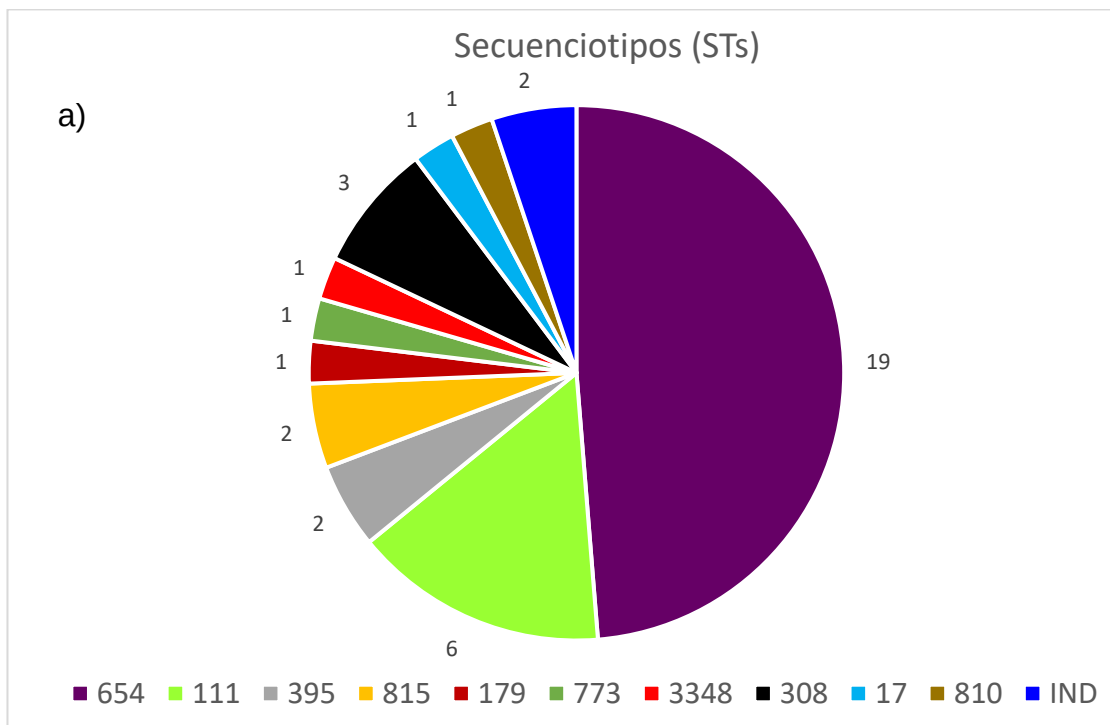


Figura 7: Identificación de STs realizando análisis *in silico* de las 39 cepas de *P. aeruginosa*. (a) Predicción y asignación de los STs hecho en “MLST 2.0” y “MLST”. (b) Relación entre el ST de las cepas y las carbapenemasas que portan.

La generación del cladograma a partir de las 40 cepas de *P. aeruginosa* utilizando el método de máxima verosimilitud (“*Maximum likelihood*”) permitió la agrupación de las cepas en un clado principal (ST-654) con la mayor cantidad de representantes y se encontraron cercanamente relacionadas. Interesantemente en este clado se puede observar la divergencia de 4 cepas en particular, las cuales se diferenciaban del resto, principalmente porque son la únicas portadoras de VIM y tienen una similitud alta entre ellas (P-469 con P493 y UCO-534 con UCO-549). Las cepa que se distanciaban del grupo de ST-654, tuvieron menor grado de relación entre ellas y solo algunas son portadoras de carbapenemasas, lo cual es contrario al grupo de ST-654. Una de las cepas (P-436) obtuvo un largo de rama (0.6) que refleja la mayor divergencia genética de esta cepa en comparación con la de referencia y las otras cepas en estudio. La conformación y distribución del cladograma está representado en la Figura 8.

810 (P-303) y ST-773 (P-492). En dos cepas no fue posible determinar el ST (P-338 y P-20).

En cuanto a la búsqueda de profagos mediante “PHASTER” en las cepas portadoras de carbapenemasas se obtuvieron en total 267 posibles profagos, de los cuales el 31% (81/264) correspondió a profagos completos o intactos, cumpliendo la obtención de un puntaje > 90 en la plataforma web. Del total de cepas analizadas, solo en el 3% (1/34) no fue posible identificar profagos completos. Por otro lado, los fagos incompletos son la mayoría de casos identificados con cerca de un 48% (127/264), lo cual queda demostrado en la Figura 9a. Las especies de profagos completos detectados por BLAST fueron 16 en total y el predominio fue de Pseudo_Dobby_NC_048109, por la cual se obtuvo un 26% de aciertos (21/81), seguido de Pseudo phi297 y Pseudo YMC11/02/R656, ambos con un 14% (11/81) dentro de las cepas analizadas (Figura 9b).

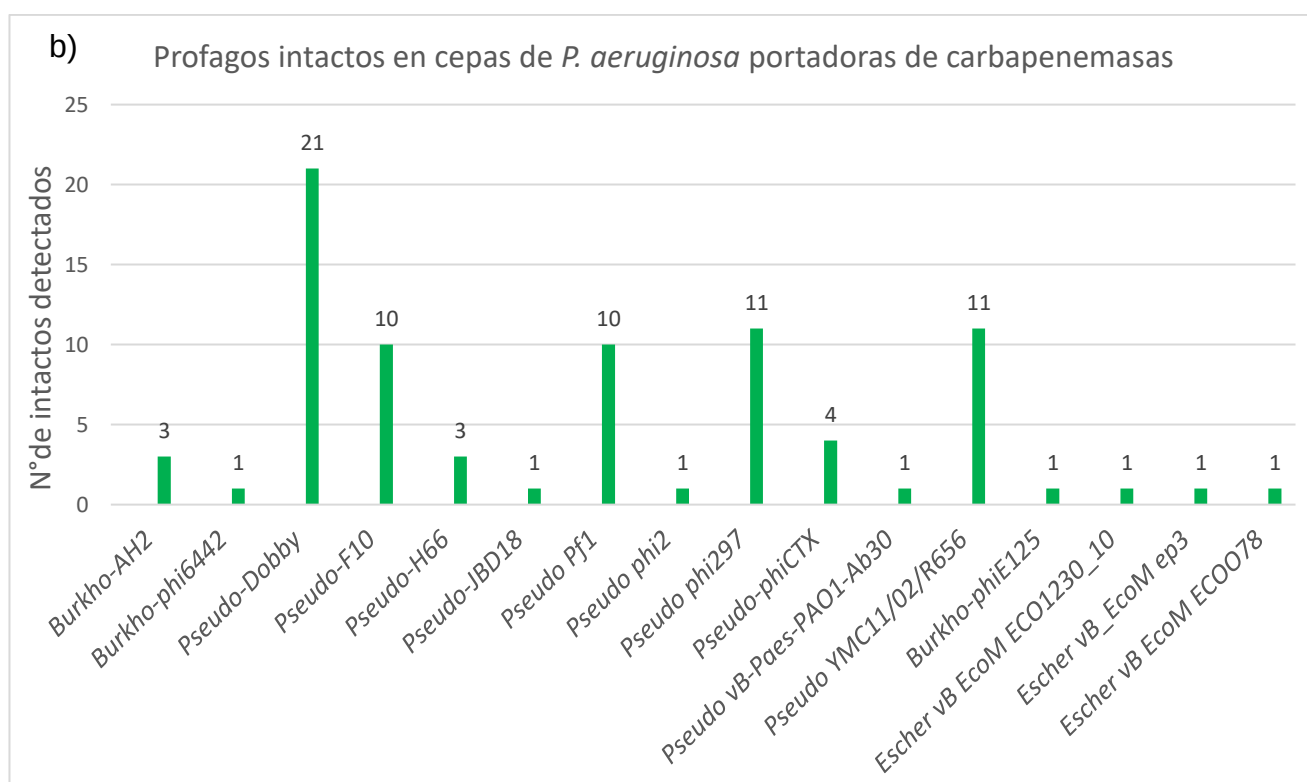
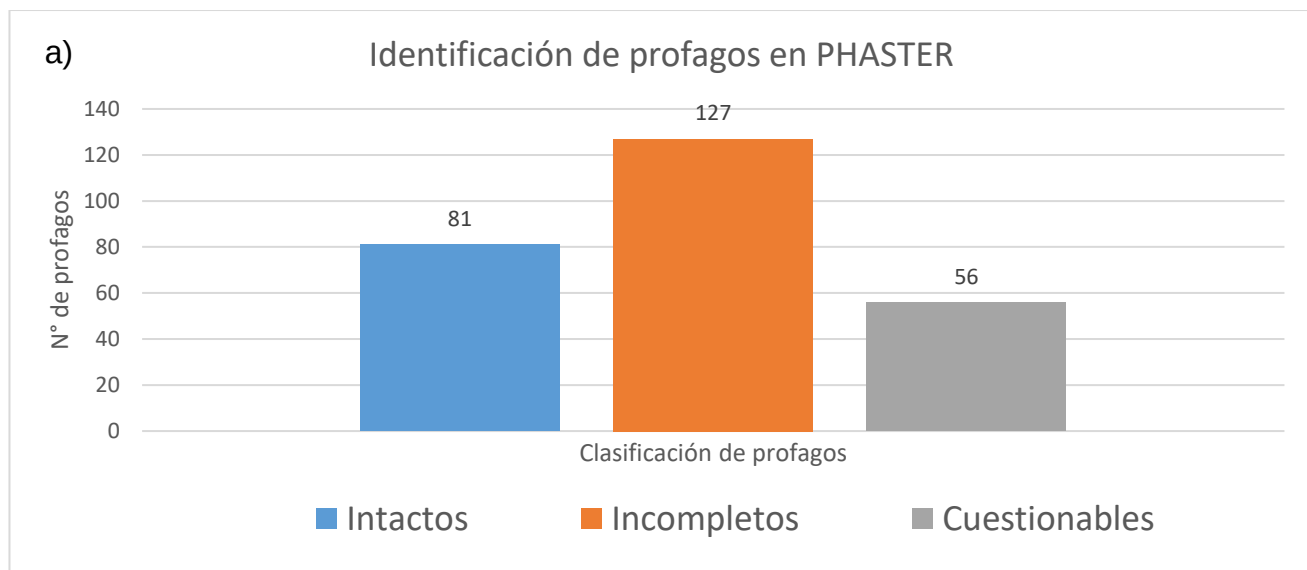


Figura 9: Búsqueda de profagos en cepas portadoras de carbapenemasas mediante BLASTN en “PHASTER”. (a) Identificación de los potenciales profagos. (b) Predicción de especies de profagos identificados y catalogados como intactos de acuerdo al puntaje obtenido para cada cepa.

Por otro lado, los resultados de “Prophage Hunter” predijeron 217 profagos en total. De estos, se obtuvieron como profagos activos un 32% (69/217), los cuales superaron el puntaje de corte de clasificación de la plataforma que fue 0.8 (Figura 10a). No se detectaron profagos activos en el 18% de las muestras (6/34). Mediante esta herramienta se identificaron 23 especies diferentes, en donde la más predominante fue YMC/01/01/P52/PAE_BP con un 13% (9/69), seguida de Pseudomonas_YMC11/02/R656 con 12% (8/69) y Pseudomonas phi2 con un 7% (5/69), lo cual queda en evidencia en la Figura 10b.

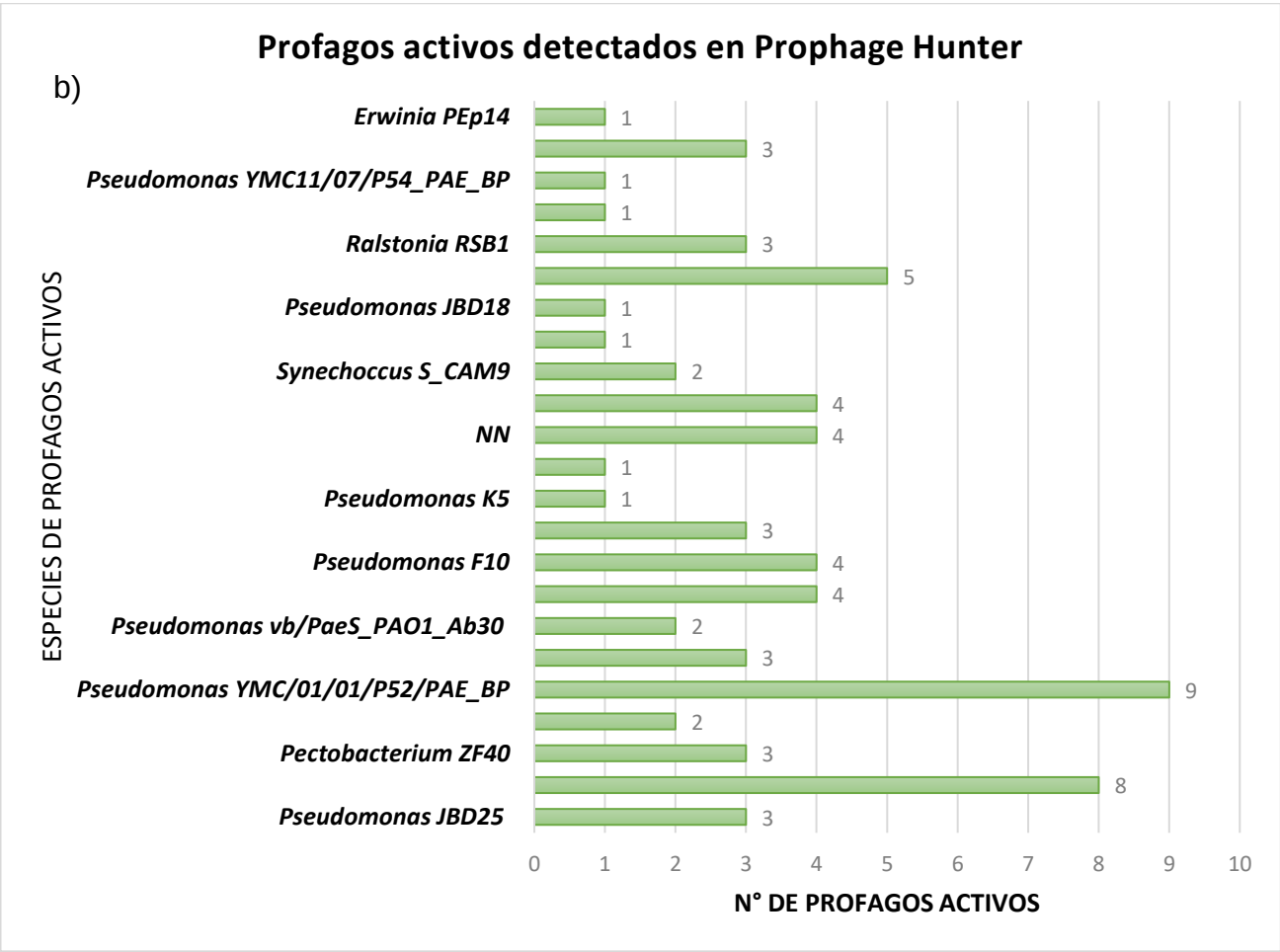
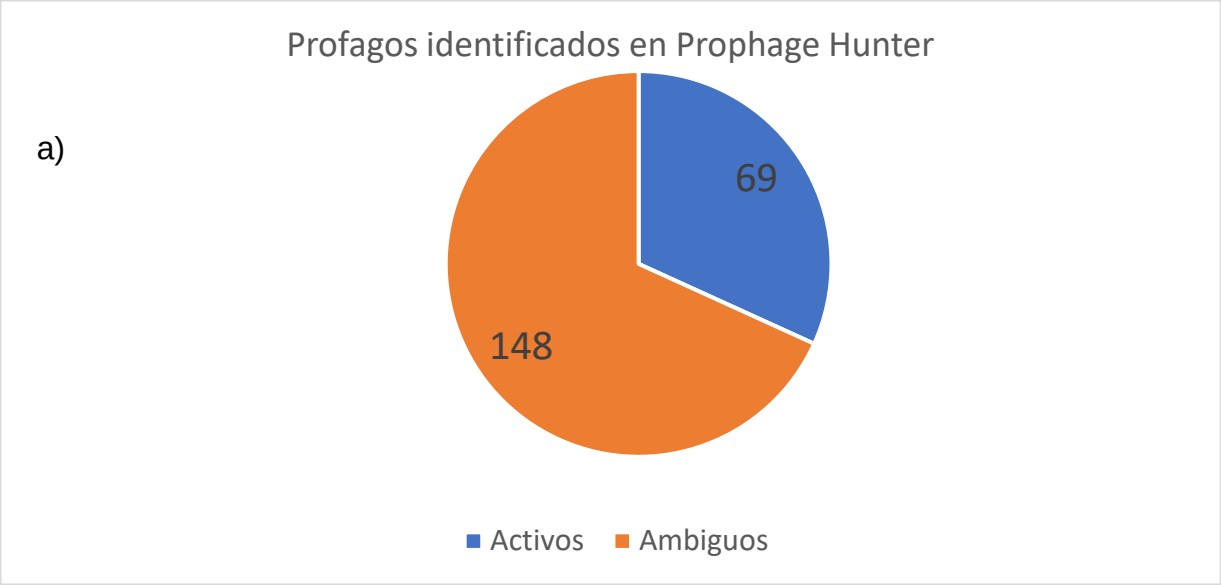


Figura 10: Búsqueda de profagos en cepas portadoras de carbapenemasas mediante BLASTN en “Prophage Hunter”. (a) Identificación de profagos activos o ambiguos. (b) Predicción de la especie de profagos activos encontrados.

Posteriormente, se analizó la eventual relación que podría tener el ST de las cepas con la identificación de determinados profagos activos o intactos. En las cepas pertenecientes al ST-654 se encontraron en total 57 secuencias de profagos intactos. De forma mayoritaria se encontró Pseudo Dobby (NC-048109) en un 84% (16/19) de las cepas de este grupo analizadas en "PHASTER", teniendo en total 37% (18/57) de identificaciones positivas. Incluso en dos cepas hubo dos predicciones positivas a este profago en el genoma analizado. Los otros dos profagos intactos con mayor número de detecciones fueron Pseudo phi297 y Pseudo F10, con 19% (11/57) y 16% (9/57), respectivamente. Lo anterior queda demostrado en la Figura 11a.

En cambio, "Prophage Hunter" dio resultados de distribución heterogéneos al analizar las cepas del ST-654, en donde se identificaron un total de 27 profagos activos. Un profago activo no identificado (NN) tuvo el mayor número de aciertos con un 15% (4/27) en las cepas analizada (Figura 11b).

Analizando los resultados de "PHASTER", pudo observarse que en las cepas P-469 y P-493 se encontró de forma similar 4 de las 5 especies de profagos intactos que portan, los cuales fueron Pseudo Dobby, Pseudo Pf1, Burkho AH2 y Pseudo H66. Un resultado similar se obtuvo con UCO-534 y UCO-549, en donde éstas concordaron en las 3 especies de profagos intactos que resultaron ser Pseudo Pf1, Pseudo Dobby y Pseudo YMC11/02/R656.

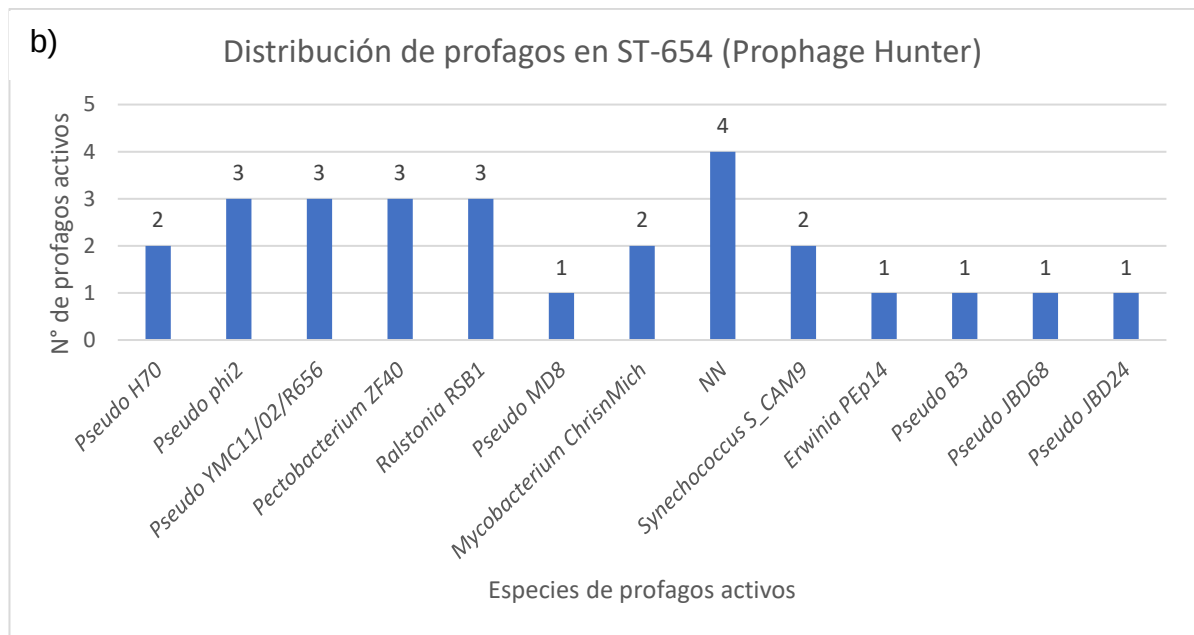
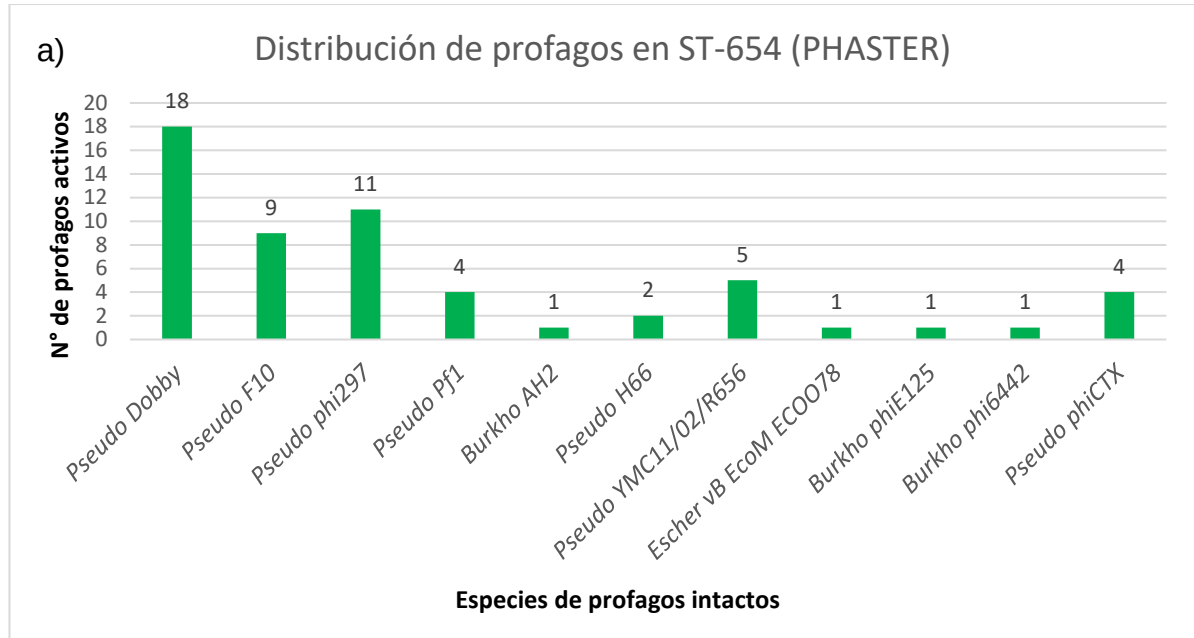


Figura 11: Análisis de profagos encontrados para el ST-654 de forma *in silico*.

(a) Especies de profagos identificadas en “PHASTER”. (b) Especies de profagos identificadas en “Prophage Hunter”.

Al analizar los restantes STs, pudo notarse que hay una distribución heterogénea de los 24 profagos intactos encontrados en “PHASTER”, en donde Pseudo YMC11/02/R656 (6) y Pseudo Pf1 (6) fueron los que se identificaron en mayor cantidad con un 50% (12/24), lo cual puede observarse en la Figura 12a. Por otro lado, un análisis similar se hizo en “Prophage Hunter”, en donde se encontraron 40 profagos activos. De ellos, el 23% correspondió a Pseudo YMC/01/01/P52_PAE_BP (9/40). Los profagos activos identificados por esta herramienta para los restantes STs se encuentran en la Figura 12b.

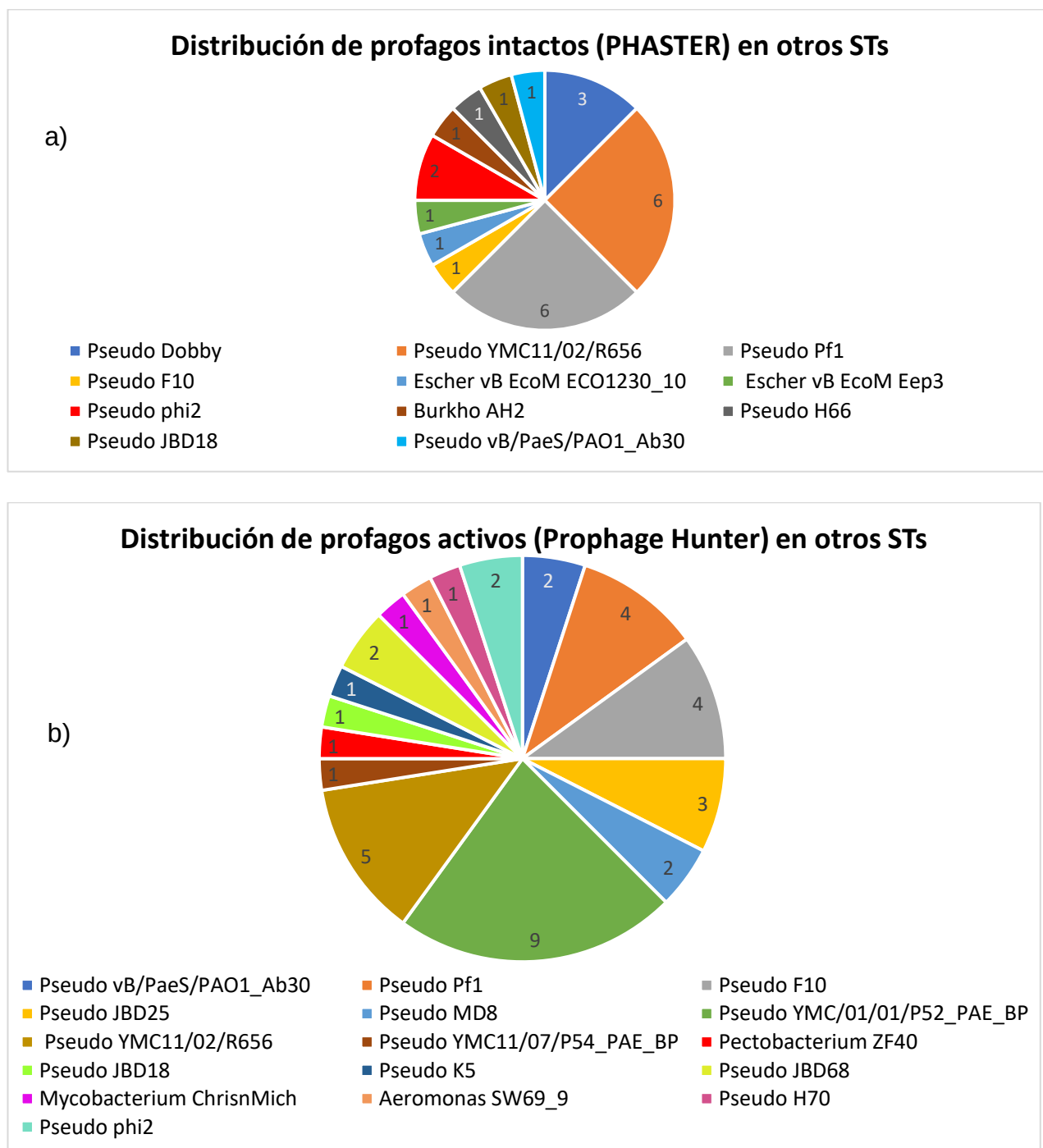


Figura 12: Análisis de especies de profagos determinados como activos e intactos en los STs 810, 111, 395, 308, 179, 815 y 3348 de forma *in silico*. (a)

Profagos intactos identificados mediante "PHASTER". (b) Profagos activos detectados utilizando "Prophage Hunter"

Asociar los profagos con genes de carbapenemasas en cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos y productoras de carbapenemasas.

Para la búsqueda de profagos asociados a carbapenemasas se compararon los resultados de BLASTN de genes de carbapenemasas y profagos activos e intactos, específicamente se buscó que hubiera coincidencias entre en los “*contigs*” que contenían estos genes. De las 34 cepas analizadas, solo dos de ellas tuvieron este acierto. La cepa P-146 en el “*contig*” n°21 que tiene un largo de 107833 pb porta una carbapenemasa tipo VIM-2 y un profago intacto que se identificó como “Pseudo Pf1” (NC_001331). Este profago tuvo un puntaje de 117, tiene un tamaño de 24683 pb y se detectaron 29 secuencias codificantes, de las cuales 15 son proteínas hipotéticas bacterianas. De estas últimas, 3 resultaron ser proteínas hipotéticas y otras 3 no hicieron “*match*”. De forma paralela, el “*contig*” completo fue anotado para el análisis del entorno genético adyacente a la carbapenemasa *bla*_{VIM-2}. Este gen se encontró en la posición 63605-64405 pb del “*contig*” y está ubicado a 918 pb de la posición en la cual se identificó la región del profago correspondiente (65323 pb). Cabe destacar que *bla*_{VIM-2} está adyacente a un gen de una integrasa de integrón clase 1 (62425-63438 pb) y al gen codificante de AAC(6’)-Ib’ (64592-65149 pb). La visualización de la anotación genética y entorno genético de la región en estudio se pueden observar en la Figura 13.

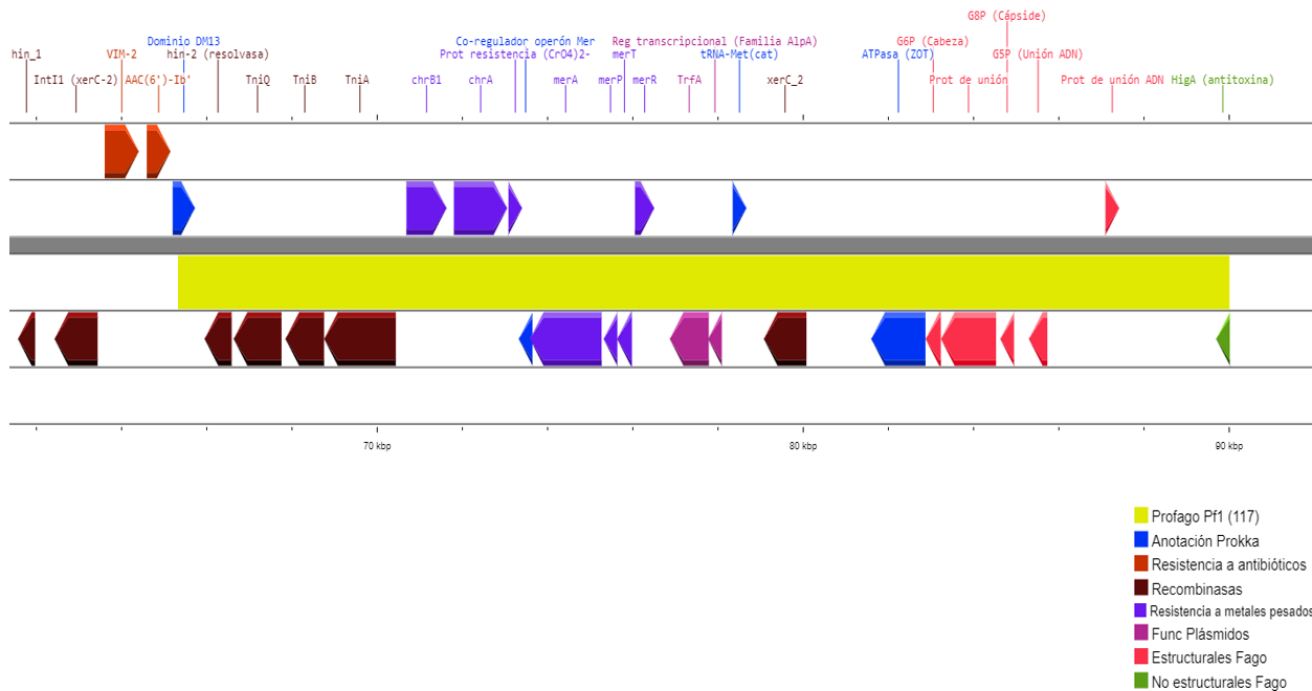


Figura 13: Anotación genética y visualización en “Proksee” del profago Pf1 y parte de su entorno genético. Los genes fueron categorizados en 6 categorías principalmente para apreciar la configuración que tendría este profago en el genoma de P-146. Se identificaron dos sitios de anclajes que no aparecen en la figura, el primero corresponde a *attL* (65323-65334 pb) y *attR* (88937-88408 pb). Las proteínas hipotéticas fueron eliminadas.

El otro resultado positivo fue obtenido en la cepa P-488, específicamente en el “contig” n°64 que posee un tamaño de 26781 pb. En este, se detectó el gen *bla_{VIM-2}* (21714-22514 pb) adyacente al gen codificante *intI1* (20534-21547 pb) y *aac(6')-Ib* (22701-23258 pb). El profago identificado mediante “Prophage Hunter” corresponde a “Pseudo YMC11/02/R656” (NC_028657), el cual obtuvo un

puntaje de 0,96, abarcando la mayor parte del “*contig*” (230-26665 pb) debido al tamaño identificado de 25909 pb, además se encontraron 29 CDS, de las cuales 6 fueron proteínas hipotéticas. Sin embargo no fueron hallados genes estrechamente relacionados con fagos. El entorno genético de este profago se muestra en la Figura 14.

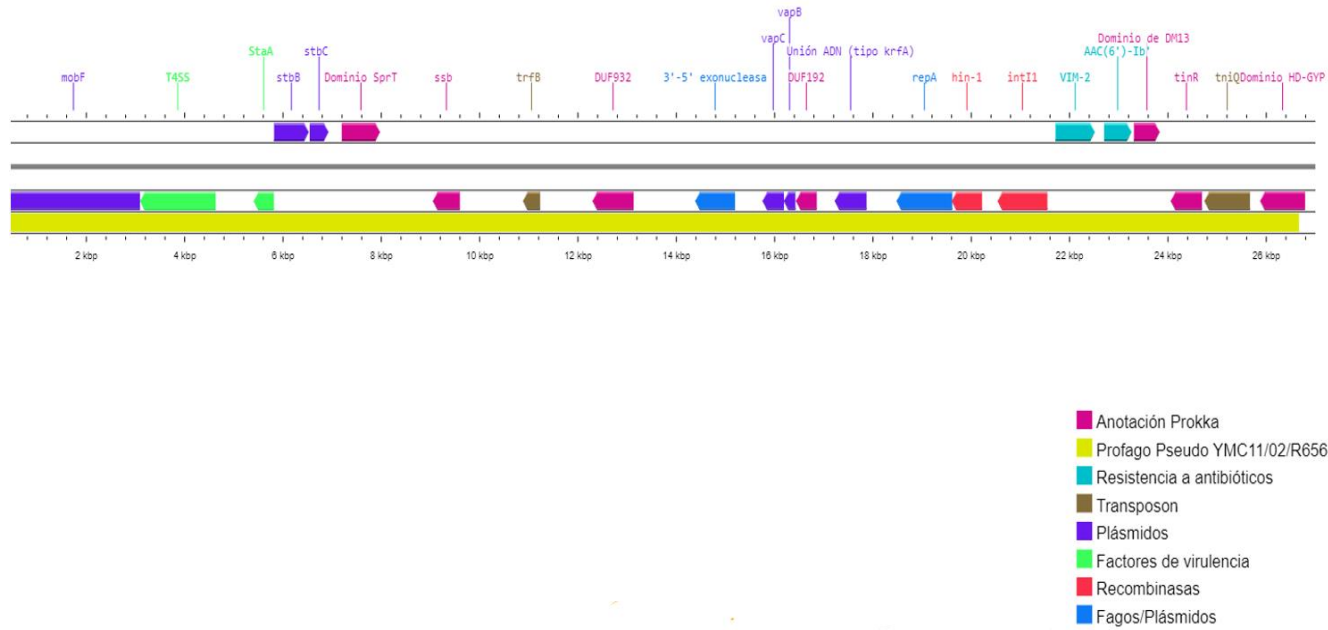


Figura 14: Anotación genética y visualización en “*Proksee*” del profago “Pseudo YMC11/02/R656”. Las proteínas hipotéticas fueron removidas.

DISCUSION

Las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas fueron aisladas en su mayoría desde infecciones del tracto respiratorio (11/40), seguida de piel y partes blandas (8/40) como se puede observar en la Figura 1. Lo anterior, concuerda con el origen de aislamiento con mayor frecuencia reportados, ya que este patógeno oportunista se asocia a neumonías asociadas a ventilador y, por lo tanto, su relación con IAAS es estrecha (Ramírez-Estrada et al., 2016). De forma preocupante, se ha reportado que la frecuencia de aislamiento de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos en pacientes que no han estado en UCI ha incrementado (Gill y Nicolau, 2021).

La identificación de genes de carbapenemasas mediante PCR resultó en una predominancia de genes *bla*_{VIM} (20/37) por sobre *bla*_{KPC} (15/37), lo cual es acorde a estudios que posicionan a VIM por sobre otras carbapenemasas en esta especie (Gill et al., 2021). Debe considerarse la frecuencia de aparición de KPC en este trabajo, ya que es una enzima proveniente de *K. pneumoniae* y se ha movilizado a ciertas cepas de *P. aeruginosa* e inclusive asociándose a las que portan VIM, lo cual fue descrito por Pacheco y colaboradores (Pacheco et al., 2019). En este ensayo una cepa (P-511) resultó con esta posible coportación. Otra forma de coportación detectada por PCR simple, fue la de VIM y NDM en

dos cepas provenientes de Temuco (P-469 y P-493). Esta aparición de cepas co-portadoras de VIM y NDM en *Pseudomonas aeruginosa* se ha reportado en el estudio de Mol Joji y colaboradores (Mol Joji et al., 2019). Los mecanismos de resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa* se ha asociado principalmente a la impermeabilidad de membrana, pero también puede ser una resistencia debido a múltiples factores asociándose con otros tipos de mecanismos tal como las enzimas degradadoras de antibióticos (Pang et al., 2019; Tomás da Costa et al., 2021; Park y Hoe Koo, 2022). Lo anterior nos da indicios de la movilidad que poseen los genes de carbapenemasas mediante la THG mediada por ciertos EGM a los cuales se asocian, permitiendo la diseminación de esta resistencia.

En cuanto al ensamblaje de las cepas fue posible obtener genomas acordes al tamaño reportado de esta especie en la base de datos de genomas de “*Pseudomonas* Genome DB” (<https://pseudomonas.com>) (Winsor et al., 2016). El n° de contigs generado fue mayor a >100, lo cual podría tener relación con el tamaño del genoma o con la aparición de regiones o secuencias repetitivas de ADN causan problemas durante el ensamblaje (Treangen & Salzberg, 2012). A pesar de obtener un número de cepas con valores de N50 altos, algunas resultaron con resultados bajos y mayor número de “contigs”. Razones de esto pueden ser varias, siendo una de ellas la limitación propia de “Illumina” en cuanto a la secuenciación por fragmentos cortos, de igual forma es posible que durante la extracción de ADN y/o transporte de las muestras pudieran haber afectado la

integridad del genoma, lo cual hubiera afectado la preparación de librerías y secuenciación. También podría estar implicado el kit utilizado durante la preparación de librerías, debido a que durante la fragmentación hay diferencias al utilizar kits de “tagmentación” basado en fragmentar con transposasas y otro que utiliza endonucleasas, ya que estos dos métodos son preferibles al ser menos costosos que el “*gold standard*” hecho por sonicación y, además, el kit que utiliza endonucleasas tiene un mejor rendimiento en la etapa de selección de tamaño de los fragmentos previo a la secuenciación (Ribarska et al., 2022). Los gráficos de las Figuras 3 y 4 representan una aproximación para evaluar la calidad de los ensamblajes, evaluándose los valores de N50, número de “*contigs*” y el “*contig*” más largo, sin embargo, debe tenerse en cuenta que los tamaños de lecturas cortos van a generar de forma predominante genomas fragmentados con numerosos “*contigs*” y regiones repetidas erróneas (Mavromatis et al., 2012).

Por lo tanto, una buena calidad de ensamblaje fue considerada al comparar los resultados de todas las cepas, idealmente obteniendo un menor n° de “*contigs*” junto a un N50 alto, considerando que fue un ensamblaje *de novo* y que se correlacione con el tamaño de genoma correspondiente a la especie. Un ensamblaje guiado utilizando un genoma de referencia arreglaría la fragmentación que existe en los genomas. A pesar de esta posibilidad, es posible perder información relevante e incluir un sesgo durante el ensamblaje utilizando un genoma molde, por ejemplo, la conformación de EGM ya que estas

regiones genéticas conforman el genoma accesorio y, debido a esto, existe la posibilidad de que estas secuencias de ADN sean reemplazadas de forma fortuita usando como molde otro genoma. Debido a esto se prefirió utilizar la herramienta “Unicycler” que utiliza el algoritmo de “SPAdes” implementado especialmente para realizar ensamblajes *de novo* de lecturas cortas, a través de la construcción de gráficos de Bruijn, remoción por simplificación de aristas erróneas en los gráficos contruidos causados por errores y/o artefactos de secuenciación, mapeo de vuelta al gráfico de ensamblaje (gráfico de Bruijn) por emparejamiento de lecturas cortas utilizando esta información de alineación para realizar la resolución de repeticiones y andamiajes a través del módulo “exSPAdes”, el cual apunta a construir vías correctas y continuas del genoma que será ensamblada en el gráfico de ensamblaje (Prijbelski et al., 2020).

Posteriormente, se realizaron los análisis *in silico* de identificación de especie se llevado a cabo por dos herramientas dio resultados muy distintos. Mediante “Species Finder 2.0” no se obtuvo los resultados esperados, ya que el 50% de las muestras obtuvo un resultado negativo. Sin embargo, con “KmerFinder 3.2” se logró corroborar que la mayor parte de las cepas secuenciadas correspondía a *P. aeruginosa* excepto por una (P-436). La discrepancia entre estos resultados puede tener 2 razones principales, una posiblemente tenga relación con el algoritmo utilizado en la comparación, debido a que “Kmer Finder 3.2” realiza comparaciones con cepas de referencia utilizando porciones de longitudes

definidas de secuencias nucleotídicas y no en base a la secuencia de un solo gen como sería el codificante para 16S. La segunda razón, que tiene cierta relación con el primer punto, es que la fragmentación y posterior ensamblaje podrían haber perjudicado la reconstrucción de la secuencia codificante para 16S, por lo cual se generaron falsos negativos en la identificación de *P. aeruginosa*.

Mientras que la identificación de genes de resistencia a antibióticos *in silico* posterior de los genomas secuenciados, en donde la mayor parte de los resultados tuvieron correlación, salvo la cepa P-511 que resultó ser falso positivo para la coportación de VIM y KPC, ya que solo se identificó el gen *bla_{KPC}* realizando una nueva PCR de punto final para corroborar este resultado. A pesar del singular fallo, la pesquisa por PCR simple sigue teniendo la especificidad y sensibilidad adecuada para la búsqueda de genes de resistencia a antibióticos. Además, el análisis en conjunto con la secuenciación del genoma completo permite descubrir nuevos genes determinantes de resistencia a antimicrobianos, como también estudiar nuevos rasgos genéticos que otorguen mecanismos de resistencia (Anjum et al., 2017; Quainoo et al., 2017).

El análisis de MLST fue posible identificar la mayoría de STs, solo no fue posible determinar dos cepas (P-20 y P-338), lo que posiblemente se deba a nuevos STs no descritos o la detección e identificación los genes marcadores se vio

imposibilitada, en donde la distribución quedó demostrada en la Figura 7. Junto al análisis filogenético fue posible corroborar los resultados de identificación de STs, en donde pudo observarse un clado predominante que correspondió a los ST-654, los cuales poseen una portación mayoritaria de genes *bla*_{KPC} en 79% (15/19) de este ST como queda demostrado en la Figura 7. De igual forma el ST-654 se caracterizó por presentar las cepas co-portadoras de VIM y NDM. Además, es destacable que todas las cepas de este grupo presentaron carbapenemasas. En los restantes STs, solo se identificó *bla*_{VIM} en el 75% (15/20) de las cepas. Dentro de estos encontramos cepas pertenecientes al ST-111, este es considerado parte de los clones de alto riesgo. En un estudio llevado a cabo por Feng y colaboradores en China 92 cepas aisladas fue identificado de los predominantes junto a ST-235, obteniendo 11 y 29 cepas, respectivamente (Feng et al., 2017). De igual manera, debe destacarse el preocupante hallazgo de ST-654 que también es considerado un clon de alto riesgo, debido a que se asocia a cepas MDR (Hammoudi & Ayoub, 2022). Debido a lo anterior, se debería considerar implementar la epidemiología molecular para potenciar la vigilancia, sobre todo en centros de salud y teniendo en cuenta que ya se ha reportado la amenaza que presentan los clones de alto riesgo (Oliver et al., 2015). La masificación de las técnicas de secuenciación y análisis *in silico* de los genomas, ha resaltado la importancia de la epidemiología molecular de los patógenos causantes de enfermedades infecciosas. Tal es el caso de *P.*

aeruginosa que se ha reportado su amplia diseminación clonal en distintos lugares geográficos.

La búsqueda de profagos mediante herramientas bioinformáticas demostró obtener una cantidad considerable de información. Existe la posibilidad de que la información de los fagos asociados a genes de resistencia a antibióticos se encuentre subestimada, especialmente su rol en la THG, ya que gran parte de investigaciones está centrada en los plásmidos y su capacidad de diseminación (Lerminiaux & Cameron, 2019; Partridge et al., 2018). Sin embargo, el rol evolutivo de los fagos en las bacterias es importante, sobre todo en ambientes naturales (Chevallereau et al., 2022; Gilling, 2016). Los resultados obtenidos mediante las dos herramientas utilizadas resultaron en 150 potenciales fagos en las 34 cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos y portadoras de carbapenemasas, aunque la predominancia fue de los fagos incompletos y/o ambiguos (275 en total) que podría deberse a la fragmentación del genoma. En determinadas cepas fue posible hallar más de un posible profago funcional, por ejemplo, en “PHASTER” se logró detectar 4 cepas portando 5 profagos en el genoma y en “Prophage Hunter” se predijo que 3 cepas portaban más de 5 profagos activos. Esta capacidad de portar más de un profago es denominada polilisogenia que ha sido descrito en *P. aeruginosa* y otras especies (Burns et al., 2015; Argov et al., 2019). En contraste con los resultados de “PHASTER” que detectó más profagos intactos y con abundancia en ciertas especies de profagos,

“Prophage Hunter” tuvo menor detección y una predicción heterógena de especies, además de que no detectó profagos activos en 6 cepas en comparación a “PHASTER” que no identificó solo en una. Posiblemente esta diferencia en los resultados se deba a que “Prophage Hunter” utiliza una base predefinida de genomas de profagos, ya que para identificarlos analiza el contexto genómico y características de la secuencia. Mientras que “PHASTER” utiliza una base de datos llamada “PHAGE_DB” para realizar el BLASTN. Lo anterior podría explicar, la menor cantidad de cepas negativas a la asociación con potenciales profagos.

Al analizar por ST pudo observarse que el ST-654 existió una predominancia del fago “Pseudo Dobby” detectados mediante “PHASTER” en comparación a los restantes STs, como queda demostrado en las Figuras 11a y 12a. Es destacable que “Pseudo Dobby” es un fago tipo CTX, el cual en un trabajo llevado a cabo por Kiel y colaboradores lo asociaron a la formación de biopelículas en cierto grupo de cepas, comparándola a otras que no portaban este profago en *Pseudomonas aeruginosa* (Kiel et al., 2022). De forma similar, “Pseudo phi297” fue solo detectado en las cepas ST-654 y este también fue descrito en el trabajo de Kiel et al. (2022), siendo considerado un homólogo de AUS531phi, el cual mediante el gen *bci* induce la formación de biopelículas. Por otro lado, los restantes STs identificaron 24 profagos intactos en “PHASTER”, en donde los profagos predominantes fueron “Pseudo Pf1” y “Pseudo YMC11/02/R656”. El

primero es un fago filamentoso que ha sido reportado clones relacionados con infección de pacientes con fibrosis quística (Ambroa et al., 2020). En cambio, “Prophage Hunter” identificó una menor cantidad de profagos en el ST-654 (27), en donde predominó un fago no identificado anotado como “NN” (4). Mientras que en los otros STs se identificaron más profagos activos (40) en comparación con “PHASTER” y predominó el profago “Pseudo YMC/01/01/P52_PAE_BP” (9/40). De este profago, se encontró que posee una actividad lítica frente a cepas de *P. aeruginosa* productoras de VIM y es altamente homólogo al profago “Pseudo phi 297” (Jeon et al., 2012).

La asociación entre potenciales profagos y genes de carbapenemasas fue encontrada en dos cepas. Una fue P-146, perteneciente al ST-111, portadora de VIM-2. asociado al profago “Pseudo Pf1”. A pesar de que la región asignada al profago activo no abarcaba al gen *bla_{VIM}*, esta se encontraba de forma adyacente al sitio de integración *attL* identificado por “PHASTER”. También se halló el gen *aaac(6')-Ib*, el cual otorga resistencia a ciertos antibióticos de la familia aminoglicósidos. En el entorno genético de los dos genes de resistencia se hallaron recombinasas, de las cuales destacan *Int11* (*xerC-2*) que es parte del integrón de clase 1, *hin-2* que es una resolvasa y *hin-1* implicado en la integración/escisión de ADN. Este arreglo genético ha sido reportado , ya que los integrones se caracterizan por incorporar *cassettes* genéticos que incluyen uno o más genes de distinta naturaleza, incluyendo los que otorgan resistencia

a antibiótico, por lo que han supuesto una fuente de diseminación importante (Zaidi et al., 2020; Pirzadian et al., 2021). Lo particular de esta configuración observada en P-146 es que no se encuentran genes característicos de los integrones clase I ríoabajo (3'CS) que serían *qacEΔ1*, *sul1* y *orf5*, pero si posee las transposasas (*tniQ*, *tniB* y *tniA*) reportadas en el integrón hallado en plásmidos (Liu et al., 2021). Este profago puede ser un buen modelo de estudio, ya que podría probarse la inducción/escisión e infección para evaluar una potencial transducción especializada, debido a que presenta genes estructurales, un gen asociado a replicación (*trfA*) y también otras proteínas con funciones desconocidas (proteínas hipotéticas) cercanas a la región conservada del fago.

Por otro lado, la cepa P-488 resultó ser portar VIM-2 y un profago “Pseudo YMC11/02/R656” en un mismo “*contig*”. El entorno genético de la carbapenemasa resultó tener una conformación similar al caso anterior, con el gen *aaac(6')-Ib* de forma adyacente, ríoabajo se encuentra *Int1* e *hin-1*, mientras que ríoarriba está *tniQ* y *tinR* que es una resolvasa. Cabe destacar que este profago detectado en “Prophage Hunter” no presentó genes asociados a fagos, salvo *repA* y una 3'-5' exonucleasa (*dinG*) identificados por BLASTP en “NCBI”. El primero es un gen reportado en un EGM de características híbridas entre un fago y plásmido (P1), por lo que existe la posibilidad de encontrarlo en fagos (Wang et al., 2022). A pesar de esto, las dos herramientas lograron identificar

este profago en el “*contig*” número 10 diferente, “PHASTER” lo clasificó como un profago intacto con un puntaje máximo de 150 y un tamaño de 31117 pb debido al hallazgo de genes conservados de fagos y, de forma paralela, “Prophage Hunter” lo detectó clasificándolo como un profago ambiguo de 43517 pb y un puntaje 0.57. El hallazgo de este fago es ambiguo, evidenciando las limitantes durante el análisis, entre ellas las lecturas cortas, el ensamblaje de las secuencias y/o la fragmentación del genoma. Categóricamente existe una diferencia de tamaño entre el profago activo de “Prophage Hunter” de 26997 pb v/s el profago “Pseudo YMC11/02/R656” (NC_028657.1) con 60919 pb almacenado en la base de datos “RefSeq” de “NCBI”, dejando en evidencia la fragmentación. Este profago ha sido asociado a la portación de genes asociados a plásmidos, específicamente una replicasa (Pfeifer et al., 2021). Una gran ayuda para superar este problema de análisis es realizar un ensamblaje híbrido entre una lectura corta y otra lectura larga que ayuden a completar los vacíos y/o regiones repetidas que imposibilitan una lectura del genoma de forma íntegra.

CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

Con este trabajo fue posible determinar que la presencia de carbapenemasas en *P. aeruginosa* supone un riesgo epidemiológico, ya que era de conocimiento que la principal resistencia a carbapenémicos es la impermeabilidad de la membrana y este análisis también confirma que la portación de carbapenemasas en estas cepas es un reflejo de lo que puede encontrarse en los recintos de salud chilenos, de las cuales es posible obtener aún más información que nos permitirá conocer diversas características genéticas de esta especie. Ciertamente, esta ventaja de secuenciar nos permite profundizar la epidemiología molecular, sobre todo en el ámbito clínico, pudiendo identificar el impacto generado por la contundente alza de bacterias resistentes a antibióticos debido a la aparición de variaciones genéticas entre cepas de una misma o distinta especie, por lo que obtener esta información puede resultar una gran ayuda para caracterizar el medio local, conocer las características de los patógenos circulantes, detectar mutaciones y monitorear para prevenir brotes de clones peligrosos.

Al menos una cepa resultó tener un profago asociado a genes de carbapenemasas realizando análisis *in silico*. Esto deja el precedente de que la búsqueda de profagos o secuencias asociadas a fagos asociados a genes de resistencia a antibióticos puede facilitarse utilizando análisis bioinformáticos, lo

cual podría ayudar a trazar la evolución que han tenido los genes de resistencia a antibióticos. De igual forma, se podría estudiar como los fagos temperados junto a otros EGM van moldeando su propia genoma y el de las bacterias con fines adaptativos, lo cual sustentaría la asociación con diversos genes bacterianos.

Para finalizar, la búsqueda de profagos podría mejorarse utilizando técnicas de secuenciación más sofisticadas, ya que permiten estudiar con mayor certeza regiones genéticas de mayor tamaño. Junto a lo anterior, es ideal que todo el análisis *in silico* sea validado experimentalmente, lo cual beneficiará las capacidades de la bioinformática.

GLOSARIO

ATCC: Colección americana de cultivos tipo.

BLAST: Herramienta básica de búsqueda de alineación local.

CDS: Secuencia codificante.

IAAS: Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud.

ICE: Elementos conjugativos-integrativos.

IS: Secuencias de inserción.

EGM: Elementos genéticos móviles.

GFF3: Formato de característica generales 3.

MDR: Multidrogoresistentes.

MLST: Tipificación Multilocus de Secuencias.

pb: Pares de bases.

PBP: Proteína unidora de penicilina.

SARS-CoV-2: Coronavirus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo 2.

ssADN: ADN de hebra simple.

ssARN: ARN de hebra simple.

ST: Secuencio-tipo.

THG: Transferencia horizontal de genes.

TSA: Agar Trypticase-Soya.

BIBLIOGRAFIA

- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., van den Beek, M., Bouvier, D., Čech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Grüning, B., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko, A., & Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: update. *Nucleic Acids Res*, 46(1), 537–544.
- Altschul, S., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25 (17), 3389-3402.
- Altschul, S., Wootton, J., Gertz, M., Agarwala, R., Morgulis, A., Z., Schäffer, A. & Yu, Y. (2005). Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *The FEBS journal*, 272 (20), 5101-5109.
- Ambroa, A., Blasco, L., López-Causapé, C., Trastoy, R., Fernandez-García, L., Bleriot, I., Ponce-Alonso, M., Pacios, O., López, M., Cantón, R., Kidd, T., Bou, G., Oliver, A. & Tomás, M. (2020). Temperate Bacteriophages (Prophages) in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Belonging to the International Cystic Fibrosis Clone (CC274). *Frontiers in Microbiology*, 11:556706.
- American Thoracic Society Documents. (2005). Guidelines for the Management of Adults with Hospital-acquired, Ventilator-associated, and Healthcare-associated Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 171, 388-416
- Aminov, R. I. (2009). The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology*, 11(12), 2970-2988.
- Angeletti, S., Cella, E., Prosperi, M., Spoto, S., Fogolari, M., De Florio, L. et al. (2018). Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial strains: Molecular epidemiology and evolution. *Microb Pathog*, 123, 233-241.
- Anjum, M., Zankari, E. & Hasman, H. (2017). Molecular Methods for Detection of Antimicrobial Resistance. *Microbiology Spectrum*, 5(6).
- Argov, T., Ran Sapir, S., Pasechnek, A., Azulay, G., Stadnyuk, O., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I. & Herskovits, A. (2019). Coordination of cohabiting phage elements supports bacteria-phage cooperation. *Nature Communications*, 10 (1), 5288.
- Arndt, D., Grant, J., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., Wishart, D.S. (2016) PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Research*.
- Bartual, S., Seifert, H., Hippler, C., Luzon, M., Wisplinghoff, H. & Rodriguez-Valera, F. (2005). Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*, 43(9), 4382-4390.

- Bobay, L., Touchon, M. & Rocha, E. (2014). Pervasive domestication of defective prophages by bacteria. *Biological Sciences, PNAS*, 111 (33), 12127-12132.
- Breidenstein, E. B. M., de la Fuente-Núñez, César., Hancock, Robert E.W. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: All roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, 19(8).
- Brown-Jaque, M., Rodriguez Oyarzun, L., Cornejo-Sanchez, T., Martin-Gomez, M. T., Gartner, S., de Gracia, J., Rovira, S., Alvarez, A., Jofre, J., Gonzalez-Lopez, J. J., & Muniesa, M. (2018). Detection of Bacteriophage Particles Containing Antibiotic Resistance Genes in the Sputum of Cystic Fibrosis Patients. *Front Microbiol*, 9, 856.
- Bush, K. (2018). Past and Present Perspectives on beta-Lactamases. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 62(10).
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. & Madden, T. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *Bmc Bioinformatics*, 10(1), 421.
- Cerezales, M., Biniossek, L., Gerson, S., Xanthopoulou, K., Wille, J., Wohlfarth, E., Kaase, M., Seifert, H., & Higgins, P. G. (2021). Novel multiplex PCRs for detection of the most prevalent carbapenemase genes in Gram-negative bacteria within Germany. *J Med Microbiol*, 70(3).
- Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Chiang, Y., Bacigalupe, R., Fillol-Salom, A., Su Juan Chee, M., Fitzgerald, J. & Penadés, J. (2018). *Science*. 362 (6411), 207-212.
- Chevellereau, A., Pons, B. & van Hout, S. (2022). Interactions between bacterial and phage communities in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 20, 49-62.
- Chiang, Y. N., Penades, J. R., & Chen, J. (2019). Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLoS Pathog*, 15(8), e1007878.
- Clausen, P., Aaerstrup, F. & Lund, O. (2018). Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics*, 19(307), 1-8.
- Davies, E., Winstanley, C., Fothergill, J. & James, C. The role of temperate bacteriophages in bacterial infection. *FEMS, Microbiology letters*, 363, 1-10.
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology Molecular Biology Review*, 74(3), 417-433.
- Davis, J., Wattam, A., Aziz, R., Brettin, T., Butler, R., Butler, R., Chlenski, P., Conrad, N., Dickerman, A., Dietrich, E., Gabbard, J., Gerdes, S., Guard, A., Kenyon, R., Machi, D., Mao, C., Murphy-Olson, D., Nguyen, M., Nordberg, E., Olsen, G., Olson, R., Overbeek, J., Overbeek, R., Parrello, B., Pusch, G., Shukla,

- M., Thomas, C., VanOeffelen, M., Vonstein, V., Warren, A., Xia, F., Xie, D., Yoo, H. & Stevens, R. (2020). The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities. *Nucleic Acids Res.* 48(8), 606-612
- De Oliveira, D., Forde, B., Kidd, T., Harris, P., Schembri, M., Beatson, S., Paterson, D. & Walker, M. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev*, 33(3), e181-219.
- Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovorok, I. and Herskovits, A.A. . (2015). A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nature Reviews, Microbiology*, 13, 641-650.
- Feng, W., Sun, F., Wang, Q., Xiong, W., Qiu, X., Dai, X. & Xia, P. (2017). Epidemiology and resistance characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the respiratory department of a hospital in China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 8, 142-147.
- Filloux, A., & Ramos, J. L. (Eds.). (2022). *Pseudomonas aeruginosa: Biology, Pathogenesis and Control Strategies*. Springer.
- Galetti, R., Neves, L., Varani, A. & Costa, A. (2019). A Phage-Like Plasmid Carrying blaKPC-2 Gene in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 10,572.
- Gill, C., Aktap, E., Alfouzan, W., Bourassa, L., Brink, A., Burnham, C., Canton, R., Carmeli, Y., Falcone, M., Kiffer, C., Marchese, A., Martínez, O., Pournaras, S., Satlin, M., Seifert, H., Thabit, A., Thomson, K., Villegas, M., Nicolau, D. & on behalf of the ERACE-PA Global Study Group. (2021). The ERACE-PA Global Surveillance Program: Ceftolozane/tazobactam and Ceftazidime/avibactam *in vitro* activity against a Global Collection of Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 40, 2533-2541.
- Gill, C., Nicolau, D. & on behalf of the ERACE-PA Global Study Group. (2022). Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an assessment of frequency of isolation from ICU versus non-ICU, phenotypic and genotypic profiles in a multinational population of hospitalized patients. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 11:146.
- Gillings, M. (2016). Lateral Gene transfer, bacterial genome evolution, and the Anthropocene. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 1389 (1), 20-36.
- Griffiths, D., Fawley, W., Kachrimanidou, M., Bowden, R., Crook, D., Fung, R., Golubchik, T., Harding, R., Jeffery, K., Jolley, K., Kirton, R., Peto, T., Rees, G., Stoesser, N., Vaughan, A., Walker, A., Young, B., Wilcox, M. & Dingle, K. (2010). Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*, 48(3),770-778.

- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N. & Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072-1075.
- Hammoudi, D. & Ayoub, C. (2022). The intriguing Carbapenemases of *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Genetic Profile, and Global Epidemiology. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 95, 507-515.
- Hasman, H., Saputra, D., Sicheritz-Ponten, T., Lund, O., Svendsen, C., Frimodt-Møller, N. & Aarestrup, F. (2014). Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(1), 139-46.
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D. & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82, 801-811.
- Jaureguy, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., Carbonnelle, E., Lortholary, O., Clermont, O., Denamur, E., Picard, B., Nassif, X. & Brisse, S. (2008). Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics*, 9(1), 560.
- Jeon, J., Kim, J., Yong, D., Lee, K. & Chong, Y. (2012). Complete Genome Sequence of the Bacteriophage YMC01/01/P52 PAE BP, Which Causes Lysis of Verona Integron-Encoded Metallo- β -Lactamase-Producing, Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Virology*, 86(24), 13876-13877.
- Jia, B., Raphenya, A., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K., Lago, B., Dave, B., Pereira, S., Sharma, A., Doshi, S., Courtot, M., Lo, R., Williams, L., Frye, J., Elsayegh, T., Sardar, D., Westman, E., Pawlowski, A., Johnson, A., Brinkman, F., Wright, G. & McArthur, A. (2017). CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, 45, 566-573.
- Johnson, G., Banerjee, S. & Putonti, C. (2022). Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Temperate Phages. *mSphere*, 7(1), e1015-21.
- Jolley, K. & Maiden, M. (2010). BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*, 11:595.
- Kiel, A., Creutz, I., Rückert, C., Kaltschmidt, B., Hütten, A., Niehaus, K., Busche, T., Kaltschmidt, B. & Kaltschmidt, C. (2022). Genome-Based Analysis of Virulence Factors and Biofilm Formation in Novel *P. aeruginosa* Strains Isolated from Household Appliances. *Microorganisms*, 10, 2508.
- Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C. F., & Tummli, B. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front Microbiol*, 2, 150.
- Knezevic, P., Voet, M., & Lavigne, R. (2015). Prevalence of Pf1-like (pro)phage genetic elements among *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Virology*, 483, 64-71.

- Kondo, K., Kawano, M., & Sugai, M. (2021). Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes within the Prophage-Associated Regions in Nosocomial Pathogens. *mSphere*, 6(4), e0045221.
- Lang, A. S., Zhaxybayeva, O., & Beatty, J. T. (2012). Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nat Rev Microbiol*, 10(7), 472-482.
- Larsen, M., Cosentino, S., Lukjancenko, O., Saputra, D., Rasmussen, S., Hasman, H., Sicheritz-Pontén, T., Aarestrup, F., Ussery, D. & Lund, O. (2014). Benchmarking of Methods for Genomic Taxonomy. *J Clin Microbiol*, 52(5), 1529-1539.
- Larsen, M., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Lykke Marvig, R., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T. Ussery, D., Aarestrup, F. & Lund, O. (2012). Multilocus sequence typing of a total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol*, 50(4), 1355-1361.
- Lemee, L., Dhalluin, A., Pestel-Caron, M., Lemeland, J. & Pons, J. (2004). Multilocus sequence typing analysis of human and *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types. *J Clin Microbiol*, 42(6), 2609-2617.
- Lerminiaux, N. & Cameron, A. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, 65, 34-44
- Letunic, I. & Bork, P. (2021). Interactive tree of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(1), 293-296.
- Li, H., Luo, Y. F., Williams, B. J., Blackwell, T. S., & Xie, C. M. (2012). Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *Int J Med Microbiol*, 302(2), 63-68.
- Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*, 22(4), 582-610.
- Liu, S., Xu, H., Guo, X., Li, S., Wang, Q., Li, Y., Liu, R. & Gou, J. (2021). Emergence and Genetic Characterization of Plasmid-Encoded VIM-2-Producing *Pseudomonas stutzeri* with Novel Integron In1998 Isolated from Cerebrospinal Fluid. *Infection and Drug Resistance*, 14, 3415-3424.
- Mavromatis, K., Land, M., Brettin, T., Quest, D., Copeland, A., Clum, A., Goodwin, L., Woyke, T., Lapidus, A., Klenk, P., Cottingham, R. & Kyrpides, N. (2012). The Fast Changing Landscape of Sequencing Technologies and Their Impact on Microbial Genome Assemblies and Annotation. *PLOS ONE*, 7(12): e48837.
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2).

- Marti, E., Variatza, E., & Balcazar, J. L. (2014). Bacteriophages as a reservoir of extended-spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes in the environment. *Clinical Microbiology Infectology*, 20(7), O456-459.
- Martinez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov Today Technol*, 11, 33-39.
- Mol Joji, R., Al-Rashed, N., Saeed, N. & Mubarak, K. (2019). Detection of VIM and NDM-1 metallo-beta-lactamase genes in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in Bahrain. *J Lab Physicians*, 11(2), 138-143.
- Mulcahy, L. R., Isabella, V. M., & Lewis, K. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb Ecol*, 68(1), 1-12.
- Naas, T., Oueslati, S., Bonnin, R., Dabos, M., Zavala, A., Dortet, L., Retaillieu, P. & Iorga, B. (2017). Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry*. 32(1), 917-919.
- Nguyen, L., Schmidt, H., von Haeseler, A. & Minh, B. (2014). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274.
- Oliver, A., Mulet, X., Lopez-Causape, C., & Juan, C. (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat*, 21-22, 41-59.
- O'Neill, J. (2014). Tackling a crisis for the health and wealth of the nations. *Review on Antimicrobial Resistance*.
- Oliver, A., Mulet, X., Lopez-Causape, C., & Juan, C. (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat*, 21-22, 41-59.
- Pacheco, T., Bustos-Cruz, R. H., Abril, D., Arias, S., Uribe, L., Rincon, J., . . . Escobar-Perez, J. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* Coharboring *BlaKPC-2* and *BlaVIM-2* Carbapenemase Genes. *Antibiotics (Basel)*, 8(3), 98.
- Page, A., Cummins, C., Hunt, M., Wong, V., Reuter, S., Holden, M., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. & Parkhill, J. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691-3693.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*, 37(1), 177-192.
- Park, Y. & Hoe Koo, S. (2022). Epidemiology, Molecular Characteristics, and Virulence Factors of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients with Urinary Tract Infections. *Infection and drug resistance*, 15, 141-151.
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev*, 31(4).

- Patil, A., Banerji, R., Kanojiya, P., Koratkar, S., & Saroj, S. (2021). Bacteriophages for ESKAPE: role in pathogenicity and measures of control. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 19(7), 845-865.
- Paz-Zarza, Victor Manuel, Mangwani-Mordani, Simran, Martínez-Maldonado, Alejandra, Álvarez-Hernández, Diego, Solano-Gálvez, Sandra Georgina, & Vázquez-López, Rosalino. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista chilena de infectología*, 36(2), 180-189.
- Pfeifer, E., Moura da Sosusa, J., Touchon, M. & Rocha, E. (2021). Bacteria have numerous distinctive groups of phage-plasmids with conserved phage and variable plasmid gene repertoires. *Nucleic Acids Research*, 49(5), 2655-2673.
- Pierce, J., & Stevens, M. P. (2021). COVID-19 and antimicrobial stewardship: lessons learned, best practices, and future implications. *Int J Infect Dis*, 113, 103-108.
- Pirzadian, J., Persoon, M., Severin, J., Klaassen, C., de Greeff, S., Mennen, M., Schoffelen, A., Wielders, C., Witteveen, S., van Santen-Verheувel, M., Schouls, L., Vos, M. & the Dutch CPE surveillance Study Group. (2021). National surveillance pilot study unveils a multicenter, clonal outbreak of VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST111 in the Netherlands between 2015 and 2017. *Scientific Reports*, 11, 21015.
- Poirel, L., Walsh, T., Cuvillier, V. & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 70(1), 119-123.
- Poole, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Frontier Microbiology*, 2, 65.
- Prijbelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A. & Korobeynikov. (2020). Using SPAdes De Novo Assembler. *Current Protocols in Bioinformatics*, 70(1), e102.
- Quainoo, S., Coolen, K., van Hijum, S., Huynen, M., Melchers, W., van Schaik, W. & Wertheim, H. (2017). Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis. *Clinical Microbiology Reviews*, 30: 1015-1063.
- Quiñones, D. (2017). Antimicrobial resistance: evolution and current perspectives in the context of the “One health” approach. *Rev Cuvana Med Trop*, 69(3), 1-17.
- Ramírez-Estrada, S., Borgatta, B. & Bello, J. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia management. *Infection and Drug Resistance*, 9, 7-18.
- Ribarska, T., Bjornstad, P., Sundaram, A. & Gilfillan. (2022). Optimization of enzymatic fragmentation is crucial to maximize genome coverage: a comparison

of library of preparation methods for Illumina sequencing. *BMC Genomics*, 23, 92.

Sawa, T., Momiyama, K., Mihara, T., Kainuma, A., Kinoshita, M., & Moriyama, K. (2020). Molecular epidemiology of clinically high-risk *Pseudomonas aeruginosa* strains: Practical overview. *Microbiol Immunol*, 64(5), 331-344.

Seemann, T. Abricate. *Github*, <https://github.com/tseemann/abricate>

Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics, Applicationes Note, Genome analysis*, 30(14), 2068-2069.

Sepulveda-Robles, O., Kameyama, L., & Guarneros, G. (2012). High diversity and novel species of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *Application Environmental Microbiology*, 78(12), 4510-4515.

Song, W., Sun, H., Zhang, C., Cheng, L., Peng, Y., Deng, Z., Wang, D., Wang, Y., Hu, M., Liu, W., Yang, H., Shen, Y., Li, J., You, L. & Xiao, M. (2019). Prophage Hunter: an integrative hunting tool for active prophages. *Nucleic Acids Research*, 47(1), 74-80.

Spagnolo, A. M., Sartini, M., & Cristina, M. L. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* in the healthcare facility setting. *Reviews in Medical Microbiology*, 32(3), 169-175.

Tomás da Costa, J., Lima, C. A., Vera-Leiva, A., San Martin Magdalena, I., Bello-Toledo, H., Dominguez Yevenes, M., Opazo-Capurro, A., Mella Montecinos, S., Quezada-Aguiluz, M., Gonzalez-Rocha, G., & Grupo Colaborativo de, R. (2021). Carbapenemases produced by Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals in Chile. *Rev Chilena Infectol*, 38(1), 81-87.

Thomas, C., Nielsen, K. (2005). Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Review Microbiology*, 3, 711–721.

Treangen, T. & Salzberg, S. (2012). Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nature Reviews Genetics*, 13, 36-46

Tseemann, S. (2016). MLST: Scan contigs files against PubMLST typing schemes. <https://github.com/tseemann/mlst>.

Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. B., Dhama, K., Ripon, M. K. H., Gajdacs, M., Sahibzada, M. U. K., Hossain, M. J., & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *J Infect Public Health*, 14(12), 1750-1766.

Walsh, C. & Wencewicz, T. (2016). Antibiotics: Challenges, Mechanisms, Opportunities. *ASM Press*

Wang, M., Jiang, L., Zhu, H., Zhang, J., Liu, Z., Zhang, W., He, X., Liu, Y., Li, R., Xiao, X., Sun, Y., Zeng, Z. & Wang, Z. (2022). Similarities of P1-Like Phage

Plasmids and Their Role in the Dissemination of *bla*_{CTX-M-55}. *Microbiology Spectrum*, 10(5):e01410-22.

Wang, X., Kim, Y., Ma, Q., Hong, S. H., Pokusaeva, K., Sturino, J. M., & Wood, T. K. (2010). Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. *Nat Commun*, 1, 147.

Wick, R., Judd, L., Gorrie, C. & Holt, K. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS, Computational Biology*, 13(6), e1005595.

Winsor, G., Griffiths, E., Lo, R., Dhilon, B., Shay, J. & Brinkman, F. (2016). Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic acids research*, 44(1), 646-653.

Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L., Karch, H., Reeves, P., Maiden, M., Ochman, H. & Achtman, M. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: An evolutionary perspective. *Mol Microbiology*, 60(5), 1136-1151.

Yoon, E. J., & Jeong, S. H. (2021). Mobile Carbapenemase Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*, 12, 614058.

Zaidi, F., Dali-Yahia, R., Zenati, K., Yazli, L., Lounes, M., Aberkane, S., Pierre, H., Barraud, O., Goudreuil, S. & Touati, A. (2020). Characterization of VIM-4 Producing Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Western Algeria: Sequence Type and Class 1 Integron Description. *Microbial Drug Resistance*, 26(12), 1437-1441.

Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F. & Larsen, M. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemoter*, 67, 2640-2644.