



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

Facultad de  
**MEDICINA**

CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE AISLADOS CLÍNICOS DE  
Pseudomonas aeruginosa DE TRES ESTABLECIMIENTOS DE SALUD DE  
LIMA, 2018-2020

GENOMIC CHARACTERIZATION OF CLINICAL ISOLATES OF  
Pseudomonas aeruginosa FROM THREE MEDICAL CENTERS IN LIMA,  
2018-2020

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO  
EN TECNOLOGÍA MÉDICA EN LA ESPECIALIDAD DE LABORATORIO  
CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA

AUTOR

ANNE MARIE MARTINEZ VENTURA

ASESOR

JESUS HUMBERTO TAMARIZ ORTIZ

CO-ASESOR

PABLO TSUKAYAMA CISNEROS

LIMA – PERÚ

2025



## **JURADO**

**Presidente:** DR. STEEV ORLANDO LOYOLA SOSA

**Vocal:** MG. JUAN CARLOS AGAPITO PANTA

**Secretario:** MG. MARIA DEL CARMEN QUISPE MANCO

**Fecha de Sustentación:** 26 de setiembre de 2025

**Calificación:** Aprobado

**ASESORES DE TESIS**

**ASESOR**

DR. JESUS HUMBERTO TAMARIZ ORTIZ

Facultad de Medicina - Escuela Profesional de Tecnología Médica

ORCID: 0000-0002-0827-8117

**CO-ASESOR**

DR. PABLO TSUKAYAMA CISNEROS

Facultad de Ciencias e Ingeniería

ORCID: 0000-0002-1669-2553

## **DEDICATORIA**

A mis padres, a mi hermano, a mis abuelitos y a mis tías: gracias por enseñarme a perseverar, por su amor incondicional, por acompañarme con alegría en los días difíciles y por celebrar conmigo cada logro. Su apoyo ha sido mi mayor inspiración.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Dr. Jesús Tamariz, del Laboratorio de Resistencia a Antimicrobianos y Fagoterapia, y al Dr. Pablo Tsukayama, del Laboratorio de Genómica Microbiana, por su mentoría y su apoyo constante brindados a lo largo del desarrollo de mi tesis.

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

El estudio ha sido financiado por el grant Prociencia número 088-2018 y el training grant D43 TW007393 concedida a la UPCH por Fogarty International Center of the U.S. National Institutes of Health.

## **DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS**

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

### DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El egresado:

| N° | APELLIDOS Y NOMBRES         |
|----|-----------------------------|
| 1. | MARTINEZ VENTURA ANNE MARIE |

Pertencientes al programa de la **CARRERA PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA EN LA ESPECIALIDAD DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA**, autor del trabajo titulado: **CARACTERIZACIÓN GENÓMICA DE AISLADOS CLÍNICOS DE Pseudomonas aeruginosa DE TRES ESTABLECIMIENTOS DE SALUD DE LIMA, 2018-2020** el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el **TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA EN LA ESPECIALIDAD DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA** bajo la modalidad de **TESIS**.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

| N° | APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE | FACULTAD | NIVEL DE ASESORÍA |
|----|---------------------------------|----------|-------------------|
| 1. | TAMARIZ ORTIZ JESUS HUMBERTO    | MEDICINA | ASESOR            |
| 2. | TSUKAYAMA CISNEROS PABLO        | MEDICINA | CO-ASESOR         |

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de **10 %**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **trn:oid:::1:3400862987**; fecha de entrega: **06-11-2025**).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: **Lima, 06 de noviembre del 2025.**

Firma del asesor  
N° DNI: 10431135  
ORCID: 0000-0002-0827-8117

Firma del Co-asesor  
N° DNI: 41729481  
ORCID: 0000-0002-1669-2553



## TABLA DE CONTENIDOS

|                                  | <b>Pág.</b> |
|----------------------------------|-------------|
| Resumen                          |             |
| Abstract                         |             |
| I. Introducción                  | 1           |
| II. Objetivos                    | 6           |
| III. Materiales y Métodos        | 7           |
| IV. Resultados                   | 13          |
| V. Discusión                     | 16          |
| VI. Conclusiones                 | 22          |
| VII. Referencias Bibliográficas  | 23          |
| VIII. Tablas, gráficos y figuras | 32          |
| Anexos                           |             |

## RESUMEN

**Introducción:** *Pseudomonas aeruginosa*, patógeno oportunista responsable de infecciones crónicas y nosocomiales, caracterizado por presentar clones de alto riesgo asociados a fenotipos de multirresistencia, resistencia extrema y panresistencia, lo que dificulta su tratamiento. Actualmente, no se han documentado reportes de estos clones en el Perú. **Objetivo:** Caracterizar genómicamente, mediante secuenciación del genoma completo, aislados clínicos multirresistentes de *P. aeruginosa* provenientes de tres establecimientos de salud de Lima entre 2018 y 2020. **Metodología:** Se secuenciaron y ensamblaron los genomas de 43 aislados clínicos. Se identificaron secuenciotipos, serotipos, genes de resistencia antimicrobiana, mutaciones cromosómicas y genes de virulencia. Asimismo, se realizó un análisis filogenético para determinar relaciones genéticas entre los aislados. **Resultados:** Se identificaron dos clados principales. El primero agrupó aislados con ST357 y serotipo O11, portadores de genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos (*bla*<sub>AER</sub>, *bla*<sub>IMP-93</sub>, *bla*<sub>GES</sub>), aminoglucósidos (*aph(3'')*-Ib, *aph(6)*-Id, entre otros), junto con mutaciones en *pmrB* (V15I) y *gyrA* (D87H). El segundo clado incluyó aislados con ST179 y serotipo O6, y presentaron genes de resistencia como *bla*<sub>IMP-16</sub> y *bla*<sub>IMP-74</sub>), genes aminoglucósido-modificadores (*aadA11*, *aadA2*) y alteraciones en la porina *OprD*. **Conclusiones:** Este estudio evidencia una alta diversidad de mecanismos de resistencia antimicrobiana, incluyendo genes adquiridos y mutaciones, en clones de alto riesgo como el ST357.

Estos hallazgos constituyen una base importante para futuras investigaciones en vigilancia genómica de *P. aeruginosa* en el país.

**Palabras clave:** *Pseudomonas aeruginosa*, resistencia antimicrobiana, multidrogorresistencia, epidemiología molecular.

## ABSTRACT

**Introduction:** *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen responsible for chronic and nosocomial infections, characterized by the presence of high-risk clones associated with multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and pandrug-resistant phenotypes, which complicates treatment. To date, no reports of these clones have been documented in Peru. **Objective:** To perform genomic characterization, through whole-genome sequencing, of multidrug-resistant *P. aeruginosa* clinical isolates obtained from three healthcare facilities in Lima between 2018 and 2020. **Methods:** The genomes of 43 clinical isolates were sequenced and assembled. Sequence types, serotypes, antimicrobial resistance genes, chromosomal mutations, and virulence genes were identified. In addition, a phylogenetic analysis was conducted to determine the genetic relationships among the isolates. **Results:** Two main clades were identified. The first grouped isolates with ST357 and serotype O11, carrying resistance genes to  $\beta$ -lactams (*blaAER*, *blaIMP-93*, *blaGES*) and aminoglycosides (*aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, among others), along with mutations in *pmrB* (V15I) and *gyrA* (D87H). The second clade included isolates with ST179 and serotype O6, which harbored resistance genes such as *blaIMP-16* and *blaIMP-74*, aminoglycoside-modifying genes (*aadA11*, *aadA2*), and alterations in the porin *OprD*. **Conclusions:** This study reveals a high diversity of antimicrobial resistance mechanisms, including both acquired genes and chromosomal mutations, in high-risk clones such as ST357. These findings provide an important foundation for future research on genomic surveillance of *P. aeruginosa* in the country.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobial resistance, multidrug resistance, molecular epidemiology.

## I. INTRODUCCIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) es un bacilo gramnegativo no fermentador que se encuentran de forma ubicua en diversos entornos. Es considerada una de las principales causas de infecciones nosocomiales, responsable de más de 250,000 muertes anuales a nivel mundial. Posee mecanismos de resistencia intrínseca, como la baja permeabilidad de la membrana externa, atribuida a sus sistemas de porinas que restringen selectivamente la entrada de antibióticos, y a la expresión de varias bombas de eflujo (1,2). Adicionalmente, bajo presión selectiva, puede desarrollar mutaciones puntuales que alteran la función o expresión de genes cromosómicos relacionados con la resistencia antimicrobiana (3,4). Naturalmente, *P. aeruginosa* posee dos genes constitutivos, *bla*<sub>PDC</sub> (*Pseudomonas-Derived Cephalosporinase*) que codifican  $\beta$ -lactamasa tipo *ampC* y *bla*<sub>OXA-50-like</sub>, que codifica oxacilinasas del grupo D según el esquema Ambler (5). Además, puede adquirir genes de resistencia mediante transferencia horizontal, a través de elementos genético móviles como plásmidos y transposones. Entre los determinantes adquiridos destacan las carbapenemasas, enzimas capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos (3). Estas se clasifican, según Ambler, en carbapenemasas de tipo serina (clase A y D) y las de metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL, clase B), siendo estas últimas sensibles a Aztreonam (6). Entre las serincarbapenemasas más prevalentes y clínicamente importantes se encuentran las de Espectro Extendido de Guayana (GES) y las carbapenemasas de *Klebsiella pneumoniae* (KPC), mientras que en las MBL destacan la Nueva Delhi (NDM), la imipenemasa (IMP) y la imipenemasa de Verona (VIM) (6,7).

Producto de la diversidad de mecanismos de resistencia antibiótica que posee, este patógeno es clasificado mediante dos esquemas clínico con enfoques diferentes, el primero, se basa en el número de familias de antibióticos a los que el germen expresa resistencia: multidrogorresistencia (MDR), resistencia extrema (XDR) y pandrogoresistencia (PDR) (8). El segundo, se centra en la relevancia clínica de la resistencia a los antimicrobianos antipseudomonas, se denomina resistencia difícil de tratar (DTR) (9). Desde el punto de vista terapéutico, los carbapenémicos se utilizan como tratamiento de última línea contra infecciones PDR o DTR, lo cual ha favorecido la aparición de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos (PARC) que, en la actualidad representa un desafío significativo (10). Por ello, PARC lidera la lista de patógenos de alta prioridad según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (11).

En este contexto, la epidemiología molecular en *P. aeruginosa* mediante el estudio del secuenciotipo (conjunto de variantes alélicas de siete genes constitutivos) permiten identificar y monitorear, a nivel global, clones de alto riesgo como ST235, ST111, ST233, ST244, así como su asociación con perfiles fenotipos MDR/XDR o DTR (12).

Los genes MBL más frecuentes en *P.aeruginosa* son *bla<sub>VIM</sub>*, que se encuentra en un 27,3% en Indonesia, 18 % en Italia, Oriente Medio y América del Sur y Central. Mientras que el gen *bla<sub>IMP</sub>* se detecta en un 21% tanto en Australia y Singapur, un 51,9% en Indonesia y un 10,1% en Italia (13,14). Entre el 2018 y 2019 en China, se identificaron aislados de PARC del secuenciotipo ST463, de los cuales, el 91%

portaba el gen *bla*<sub>KPC-2</sub>(12). En otro estudio en China, en aislados resistentes a imipenem/relebactam pertenecientes al clon ST463, se identificó *bla*<sub>KPC-2</sub> en un 98,1%, y en el clon ST235 la presencia del *bla*<sub>GES-5</sub> en un 93,1% (15). En Australia y Singapur el 95% de los aislados pertenecían al ST308 que principalmente albergaba el gen *bla*<sub>NDM-1</sub>. En América del Sur y Central, los ST235 y ST111 fueron los más comunes: el 32% de aislados la PARC presentaban *bla*<sub>KPC-2</sub>, el 17 % *bla*<sub>VIM-2</sub>, y el 16 % una combinación de *bla*<sub>KPC-2</sub>/*bla*<sub>VIM-2</sub> (13).

En América Latina, durante 2016 y 2017, los ST relevantes incluyeron ST111 y ST308 en Colombia; ST357 en Chile; y ST309 que albergaba *bla*<sub>GES-19</sub>, en México, Colombia y Chile. También se observó la diseminación del ST575 en México, y del ST235 que albergaba los *bla*<sub>KPC-2</sub> o *bla*<sub>GES-19</sub> en Colombia, México, Brasil y Argentina; y el ST244, principalmente en Argentina (16). En el Perú, durante el 2019, en regiones como Apurímac, Ayacucho, Cusco, Loreto, Lima y el Callao, se identificó la presencia de *bla*<sub>IMP</sub> (17,3%), *bla*<sub>VIM</sub> (7,0%), doble carbapenemasa *bla*<sub>IMP/VIM</sub> (7,6%), y *bla*<sub>NDM</sub> (1,1%) en aislados de *P. aeruginosa* analizadas mediante PCR convencional (17). Reportes del 2021 indican que en Perú *P. aeruginosa* es el microorganismo aislado con mayor frecuencia y con una resistencia a carbapenémicos que supera el 50%, llegando incluso a reportarse una tasa de resistencia del 75% en unidad de cuidados intensivos (18). En un estudio realizado en Lima el 2022, los ST más frecuentes fueron, ST111(44%) y ST357 (38,3%). El ST111 portaba los alelos *bla*<sub>IMP-18</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub> en el 74.2% de los casos, mientras que el ST357 presentó *bla*<sub>IMP-93</sub> en el 96,3% de los aislados (19).

Diversos estudios fenotípicos en el Perú han evidenciado la presencia de *P. aeruginosa* multirresistente (PAMR), en especial cepas resistentes a carbapenémicos mediante múltiples mecanismos. No obstante, los estudios genotípicos siguen siendo escasos, lo que limita nuestra comprensión de la dinámica molecular de los genes asociados a la resistencia de PAMR.

Actualmente, la vigilancia epidemiológica se ha visto fortalecida por la secuenciación de nueva generación (NGS) (20), que permite caracterizar a nivel molecular serotipos, alelos de genes de resistencia, mutaciones relacionadas con resistencia antimicrobiana, genes de virulencia, y clones de alto riesgo mediante tipificación multilocus de secuencias (MLST) (21).

*P. aeruginosa* representa una amenaza para la salud a nivel global. Se ha observado que los pacientes con infecciones por PARC productoras de carbapenemasas tienen una menor tasa de supervivencia a 30 días (78%) en comparación con aquellos infectados con PARC no productores de carbapenemasas (88%) (13). En el contexto peruano, la carbapenemasa tipo IMP es la más prevalente (22), lo que subraya la importancia de estudiar estas enzimas, así como las mutaciones implicadas en la resistencia a carbapenémicos.

La capacidad de *P. aeruginosa* para adquirir genes de resistencia a través de diversos mecanismos pasa desapercibida en la práctica clínica, lo que representa un riesgo latente y un desafío para el manejo terapéutico efectivo, contribuyendo al aumento de la morbilidad y mortalidad asociada con las infecciones por este patógeno. Por lo tanto, el presente estudio, se enfoca en el análisis genómico de aislados clínicos de *P. aeruginosa* procedentes de tres establecimientos de salud en Lima, Perú, su objetivo es aportar información preliminar sobre la variabilidad

genética circulante en el periodo de estudio, que sirva como una línea de base para estudios posteriores, y facilite una mejor comprensión de la epidemiología molecular de este patógeno.

## II. OBJETIVOS

### A. Objetivo general

Caracterizar a nivel genómico aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de tres establecimientos de salud de Lima en el periodo 2018 – 2020.

### B. Objetivos específicos

- Identificar y caracterizar los genes de resistencia a antimicrobianos (ARG) y las mutaciones asociadas a RAM de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Identificar los genes de virulencia de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Identificar los determinantes de epidemiología molecular, incluyendo secuenciotipo y serotipo de los aislados de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Determinar las relaciones filogenéticas entre los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* multidrogorresistente y no multidrogorresistente procedentes de tres establecimientos de salud de Lima durante 2018-2020.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **A. Diseño del estudio.**

Estudio descriptivo transversal.

#### **B. Población y lugar de estudio**

Aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* recolectados entre los años 2018 y 2020 en tres establecimientos de salud de Lima Metropolitana. Estos aislados forman parte del criobanco del laboratorio de Resistencia a Antimicrobianos y Fagoterapia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

##### **Criterios de inclusión**

- Aislados de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas de los tres establecimientos de salud de Lima durante 2018-2020.
- Disponibilidad de datos mínimos del aislado (fecha de aislamiento, establecimiento de procedencia y tipo de muestra).

##### **Criterios de exclusión**

- Cepas duplicadas de un mismo paciente, para asegurar independencia.
- Cepas sin viabilidad al momento de la recuperación.
- Cepas con información incompleta de resultados fenotípicos (perfil de susceptibilidad, mecanismo de resistencia a carbapenémicos y producción de biofilms).

#### **Muestra**

De los 103 aislados conservados en el criobanco, se seleccionaron 48 que cumplían con los criterios de inclusión y exclusión previamente establecidos. La selección, realizada mediante muestreo aleatorio proporcional por establecimiento de salud (Anexo 1). El número de aislados se definió por limitaciones presupuestarias asociadas al costo del secuenciamiento, priorizando una cobertura promedio de 50X por aislado. No se calculó el tamaño muestral, dado que el estudio no estuvo orientado a realizar inferencias estadísticas ni a generalizar los resultados.

La unidad de análisis fue el genoma obtenido de un aislado clínico independiente de *P. aeruginosa* (un aislado por paciente-episodio). El análisis fue a nivel aislado-genoma, circunscrito al marco muestral 2018-2020 de tres establecimientos de Lima.

## **C. Procedimientos**

### **a. Identificación bacteriana**

Los aislados criopreservados de *P. aeruginosa* fueron reactivados inoculando 20µl de suspensión en el medio BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid, UK), y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Evidenciado el crecimiento, por turbidez del medio, se sembró en placas de agar Cetrimide (Liofilchem, Italy) e incubados a 37°C por 24 horas y se verificaron las características de las colonias con tonalidades verdosas o amarillas. Para la identificación de *P. aeruginosa*, se realizó la prueba de oxidasa, y se llevó a cabo una batería bioquímica que incluyó pruebas agar TSI (Triple Sugar Iron, Becton Dickinson, USA), MIO (Motilidad- Indol-Ornitina, HiMedia, USA) y Citrato de Simmons (Merck) (23).

## **b. Extracción de ADN**

Se realizó según el Procedimiento Operativo Estándar (POE) del Laboratorio de Genómica Microbiana. El ADN genómico se extrajo de aislados cultivados 24 horas antes en Agar Cetrimide (Liofilchem, Italy). Se obtuvo una colonia y se incubó durante cuatro horas en caldo Trypticase Soya (Oxoid, UK). Luego, se centrifugó durante 5 minutos a 10 000 RPM y a partir del pellet obtenido se procedió a la extracción del ADN. Se utilizó el kit de purificación de ADN genómico GeneJet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se cuantificó mediante el kit Qubit *dsDNA Broad-Range* (Thermo Fisher Scientific) y se evaluó la calidad por Nanodrop (Thermo Fisher Scientific).

## **c. Secuenciación del Genoma**

La secuenciación del genoma completo (WGS) se realizó utilizando la plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.). Las bibliotecas genómicas se prepararon utilizando el kit Nextera XT (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos) y se secuenciaron en la plataforma Illumina Miseq con lecturas de 250 pb por pares utilizando el kit Miseq v2 de 500 ciclos.

El genoma de ADN fue fragmentado por un transposoma modificado adherido a perlas de tamaño específico (M). En el proceso de fragmentación el transposoma añade los indexes y los adaptadores en cada hebra del ADN. Seguidamente se realizó el proceso de amplificación mediante un PCR de ciclo limitado. El objetivo de la amplificación fue incrementar la concentración de las librerías generadas.

Además, se realizó la limpieza de las librerías con las perlas magnéticas AMPure XP y etanol al 80%. Se normalizó el pool de librerías a una concentración de 4nM y se denaturó el ADN de doble hélice con hidróxido de sodio al 0.2N. Finalmente, se cargó 600 µl de librerías a una concentración final de 7pM. Los resultados de las métricas de la corrida y la generación de archivos FASTQ se observaron en la plataforma BaseSpace a las 36 horas.

De los 48 aislados secuenciados, 5 no alcanzaron la profundidad mínima establecida para nuestro laboratorio (20X) y fueron excluidos, quedando 43 aislados para los análisis posteriores.

#### **d. Control de calidad de las secuencias genómicas**

Se evaluó la calidad de las lecturas R1 (Forward) y R2 (Reverse) sin procesar, en formato FASTQ, utilizando *FastQC* v0.12.1 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Los adaptadores y las secuencias de baja de calidad (con nivel menor a Q30, equivalente a un error por cada 1000 pb) fueron eliminados empleando la herramienta *FastP* v0.23.4, generando lecturas pareadas (R1 y R2) (24).

#### **e. Ensamblaje y anotación genómica**

El ensamblaje de *nov* se realizó con *SPAdes* v.3.15.2 (25) usando los parámetros predeterminados de las lecturas pareadas (R1 y R2). La calidad de los ensamblajes se evaluó con *QUAST* v5.0.2 (26). Los archivos en formato FASTA se anotaron mediante *Bakta* v1.5 (27), generando archivos gff3 (General feature format) y gbk(GenBank).

## **f. Determinación de secuenciotipos, serotipos, genes de resistencia y virulencia**

A partir de los archivos FASTA, los secuenciotipos se determinaron mediante *MLST v2.23.0* (<https://github.com/topics/mlst>) y los serotipos se identificaron usando las bases de datos de *Pseudomonas aeruginosa* serotyper (*PAst*) v2.0 (<https://github.com/MAphd/PAst2.0>). Los genes de resistencia, y mutaciones asociadas a RAM se determinaron usando *AMRFinderPlus v3.12.8* (<https://github.com/ncbi/amr>) con identidad  $\geq 90\%$  y cobertura  $\geq 90\%$  (28). Los genes de virulencia se identificaron mediante *ABRIcate v0.9.9* con la base de datos *vfdb* (<https://github.com/tseemann/abricate>). Los nuevos alelos detectados se enviaron a PubMLST para la asignación de un número y posterior denominación de ST.

## **e. Filogenia**

Se extrajo el *core genome* (genomas centrales) del pangenoma utilizando *Panaroo v1.1.2* (29), a partir de los archivos de anotación en formato gff3 generados con *Bakta* y considerando una identidad  $\geq 95\%$ . Posteriormente, se seleccionó el modelo de sustitución nucleotídica más adecuado con *ModelTest-NG v0.1.7*, empleando el archivo de alineamiento en formato FASTA (.aln). Con este modelo se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud en *RaxML v8.2.4* (30), utilizando el modelo de sustitución General Reversible en el Tiempo (*General Time Reversible, GTR*), con fracción de sitios invariantes y corrección gamma para la heterogeneidad de tasas en cuatro categorías (GTR+I+G4), con 100 réplicas de bootstrap. La

visualización, manipulación y anotación del árbol filogenético se realizó en el programa *iTOL v6* (<https://itol.embl.de>).

### **E. Aspectos éticos**

Este protocolo se registró en el Sistema Descentralizado de Información y Seguimiento a la Investigación (SIDISI) - Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT), y fue sometido al Comité de Ética de la UPCH (CIE-UPCH), previamente a su ejecución. Considerando que el estudio no involucró seres humanos ni animales, se solicitó exoneración de la evaluación completa por el CIE, siendo aprobado mediante documento F3 N°214657.

### **F. Análisis estadístico**

Se empleó un análisis univariado para describir cada variable incluida en el estudio. Las variables categóricas (serotipo, secuenciotipo), se presentan en frecuencias relativas y porcentajes correspondientes. Las variables numéricas del control de calidad se resumieron en mediana y rango intercuartílico, dado que no tenían una distribución normal. El manejo de datos y análisis estadístico se desarrollaron mediante el uso de Stata versión 18 (Stata Corp., College Station, TX).

#### IV. RESULTADOS

Se analizaron 43 aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, obtenidos entre 2018 y 2020 en tres establecimientos de salud de nivel III de complejidad de la ciudad de Lima. Del total de secuencias, se obtuvo una cobertura mínima de 21X y máxima de 92X. El N50, el número de contigs y la longitud total del ensamblaje presentaron medianas de 151 044 (RIC: 130 005 – 213 241), 105 (RIC: 72 - 132) y 6 752 207 pb (RIC: 6 401 724 – 6 839 890) respectivamente.

En relación con los genes de RAM, se identificaron betalactamasas de tipo serina, específicamente *bla<sub>AER</sub>* (14%), *bla<sub>GES-1</sub>* (4,7%), *bla<sub>GES-5</sub>* (2,3%). Asimismo, se detectaron MBL: *bla<sub>IMP-16</sub>* (4,7%), *bla<sub>IMP-93</sub>* (9,3%) y *bla<sub>IMP-74</sub>* (7%). Todos los aislados presentaron el gen *aph(3')-IIb*, relacionado con resistencia a aminoglucósidos, así como los genes *fosA* y *catB7*, asociados a resistencia a fosfomicina y fenicoles, respectivamente. En cuanto a mutaciones puntuales relacionadas con resistencia a quinolonas, las más frecuentes fueron *gyrA* (T83I), presente en el 39,5% de los aislados y *parC* (S87L), detectada en el 34,8%. Además, los genes de bombas de eflujo *mexA*, *mexE* y *mexX* se encontraron en el 100% de los aislados. Se observaron también mutaciones en la porina *oprD*(V359L) en el 39,5% y *oprD*(STOP) en el 14% (Figura 1).

Con respecto a la virulencia, se identificaron siete clases de genes. En la clase de efectores del sistema se detectaron en promedio 37 genes tipo TTSS, 22 del tipo HS1-1 y 18 del tipo HSI-2. Además, se observaron en promedio 35 genes pili tipo IV de la clase adherencia y 26 genes en promedio de alginato relacionados con formación de biopelículas. Todos los aislados portaron los genes ExoA y PLC, así como el gen proteasa alcalina, perteneciente a la clase exoenzima (Figura 2).

Se identificaron 19 secuenciotipos, el más frecuente fue el ST357(20,9%), seguido por ST179 y ST640, ambos con una frecuencia del 14%. Además, se registraron cinco nuevos ST no reportados previamente (ST5114, 5115, 5116, 5117 y 5118). En relación con los serotipos, se detectaron ocho variantes alélicas, siendo O11 el más común (39,5%), seguida por O6 (23,3%) y O4 (11,6%) (Tabla 1).

En el análisis filogenético se identificó dos principales clados. El primer clado (CL-A1) incluyó un linaje importante (L1) que agrupó nueve aislados pertenecientes al ST357 y al serotipo O11, distribuidos en los tres centros de salud. En este clado los aislados presentaban principalmente genes asociados a carbanemasa tipo *bla*<sub>AER</sub>, *bla*<sub>GES-like</sub> y *bla*<sub>IMP-like</sub>, así como un conjunto de genes asociados a la resistencia a aminoglucósidos como *aph(3')-Ib* (9/9), *aac(6')-II* (7/9), *aph(3'')-Ib* (7/9) y *aph(6)-Id* (7/9). En particular, se identificaron mutaciones no sinónimas para colistina en el gen *pmrB*(V15I) en todos los aislados, así como mutaciones relacionadas con la resistencia a quinolonas como *parC*(S87L) (8/9) y *gyrA* (T83I) (8/9). Los genes de bombas de eflujo (*mexA*, *mexE* y *mexX*) estuvieron presentes en la totalidad de individuos de este clado(Figura 1).

El segundo clado (CL-B) contenía dos subcluster importantes. El primero (SC-2) conformado por seis aislados que en su mayoría provenían del ES-1 y eran ST179 y serotipo O6. En este subcluster los aislados contenían genes de resistencia a carbapenémicos, como *bla*<sub>IMP-74</sub> (3/6) y *bla*<sub>IMP-16</sub> (2/6). Además, todos los aislados del clado tenían genes de resistencia a aminoglucósidos, resistencia a sulfonamida (*sul1*) fluoroquinolona (*crpP*), fosfomicina (*fosA*) y fenicol (*catB7*). En cuanto a mutaciones puntuales asociadas a quinolonas, todos los aislados presentaron alteraciones en *parC* (S87L) y *gyrA* (T83I). Adicionalmente, se identificaron genes

relacionados con bombas de eflujo (*mexA*, *mexE* y *mexX*), así como mutación en la porina *oprD* (V359L). El segundo subcluster (SC-3), eran todos del ES-3, pertenecían al ST640, y poseían el serotipo O11. En este subcluster los aislados no contenían genes de resistencia a carbapemasas, pero tenían mutaciones *ftsI* (F533L) (Figura 1).

## V. DISCUSIÓN

Durante el periodo 2018-2020, la carbapenemasa más frecuente fue *bla*<sub>IMP-like</sub> (23,2%) de los aislados de *P. aeruginosa*, lo que representa un incremento respecto al 15,7% reportado en Lima en seis hospitales en 2013, y coincide parcialmente con el aumento drástico reportado por un hospital militar en 2019 (95.8% por PCR) (31,32). En otras regiones del país, como Apurímac, Ayacucho, Cusco, Loreto y el Callao, se han reportado frecuencia de *bla*<sub>IMP</sub> del 17,3%, y presencia de aislamientos con doble carbapenemasa (*bla*<sub>IMP</sub>/*bla*<sub>VIM</sub>) en un 7,6% (16). Asimismo, la circulación de estos genes (*bla*<sub>IMP</sub> y *bla*<sub>VIM</sub>) en *P. aeruginosa* también han sido reportados en otros países de la región, como México y Argentina (33), lo que evidencia un fenómeno de diseminación regional.

En este estudio, *bla*<sub>IMP</sub> fue identificado en el 44% de los aislados, y *bla*<sub>GES</sub> en el 33%, lo que sugiere la posible co-circulación de múltiples mecanismos de resistencia emergentes. Dentro de este contexto, destaca el clon ST357, que resultó ser el más frecuente (20,9%). Este hallazgo concuerda con lo reportado previamente en el Perú, donde el ST357 mostró una transición de alelos *bla*<sub>IMP-74</sub> (11% en 2018) hacia *bla*<sub>IMP-93</sub> (> 90% en 2021) (19). A nivel internacional, este clon ST357 fue reportado por primera vez en Japón entre 2004 a 2006, portando *bla*<sub>IMP-1</sub> (20,7%) y en años posteriores adquirió otros alelos (*bla*<sub>IMP-7</sub> y *bla*<sub>IMP-11</sub>), alcanzando hasta el 80% de los aislados en seis regiones del país (34,35). De manera similar, en hospitales de República checa en 2015, el 95,8% de los ST357 portaban *bla*<sub>IMP-7</sub>, mientras que el 4,2% albergaba *bla*<sub>VIM-2</sub> (36), evidenciando la alta capacidad de este clon de alto riesgo para incorporar y diseminar diversos alelos de carbapenemasas.

Respecto al ST179, en este estudio se observó que el 50% de sus aislados albergaban *bla*<sub>IMP-16</sub>, duplicando su frecuencia previamente reportada en 2018 (25%) (19). Aunque no se clasifica como clon de alto riesgo, su capacidad para portar carbapenemasasa, como IMP-16, KPC-2 o KPC-35 y su detección de casos con posible diseminación internacional desde Perú hacia España en 2024 (37) justifican su vigilancia epidemiológica sostenida.

Actualmente, la epidemiología de *P. aeruginosa* en Lima está dominada por ST111 (44%) y ST357 (38,3%), con asociación de ST111 a *bla*<sub>IMP-18</sub>/*bla*<sub>VIM-2</sub> (74,2%) y de ST357 a *bla*<sub>IMP-93</sub> (96,3%) (18). Este perfil se asemeja parcialmente a los reportado en Colombia, donde *bla*<sub>VIM-2</sub> estuvo presente en el 86% de los aislamientos ST111, y todos los portadores con *bla*<sub>KPC-2</sub> pertenecieron al ST235 (38). En contraste, en Ecuador, los clones predominantes en 2021 fueron ST3750 y ST253, con alta frecuencia del gen *bla*<sub>VIM</sub> (73,9%) (39). Estas diferencias en la distribución de clones y genes de resistencia reflejan características propias de cada país, probablemente influenciadas por el uso de antibióticos, las prácticas clínicas y las capacidades locales para la detección y el control de *P. aeruginosa*.

Otro hallazgo relevante fue la detección de ST640, donde el 14% de los aislados presentaron resistencia combinada a aztreonam y carbapenémicos. Esta podría estar vinculada a la sobreexpresión de bombas de eflujo y a la mutación F533L en *ftsI*, que codifica la PBP3. Esta mutación reduce la afinidad por los β-lactámicos y, en combinación con la pérdida de la porina *oprD*, contribuye a la resistencia a carbapenémicos (40,41). En concordancia, un estudio en la provincia de Hebei, China (2020), mostró que la mutación en *ftsI* duplicó la CMI de meropenem, mientras que las mutaciones en *oprD* incrementan la CMI de meropenem de 0,25 a

4 µg/mL (16 veces) y la de imipenem de 2 a 16 µg/mL (8 veces) (41), reforzando la relevancia de estos mecanismos combinados en la resistencia observada en *P. aeruginosa*.

Asimismo, se identificó el clon ST274, carente de carbapenemasas, pero con mutaciones *oprD* (V359Ly STOP), y sobreexpresión de las bombas de eflujo (*mexA*, *mexE* y *mexX*), lo que se asoció a un fenotipo resistente a carbapenémicos. Este hallazgo coincide con reportes en hospitales de Bélgica y Alemania en el 2016, donde la resistencia a carbapenémicos se explicó por la combinación de múltiples mecanismos, incluyendo la inactivación de *oprD*, la sobreexpresión de las bombas de eflujo y de cefalosporinasas tipo AmpC, alcanzando CMI de imipenem y meropenem de hasta 256 y 128 mg/L, respectivamente (42). A pesar de ello, estudios como el de Ocampo-Sosa *et al.* han señalado que las mutaciones en *oprD* no siempre explican el fenotipo resistente, ya que también se han detectado cepas susceptibles con CMI de imipenem o meropenem entre 0,06 y 4 mg/L. Estos hallazgos refuerzan la naturaleza multifactorialidad de los mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa* (43). Los ST179, ST640 y ST274 forman un clado cercano y comparten mecanismos de resistencia enzimáticos y no enzimáticos, lo que apunta a un posible ancestro común (o a convergencia/transferencia horizontal). Estos resultados subrayan la importancia de mantener vigilancia genómica sobre estos linajes.

Además de los mecanismos de resistencia, los factores de virulencia desempeñan un rol central en la adaptabilidad y patogenicidad de *P. aeruginosa*. Esta especie posee múltiples determinantes, como toxinas, adhesinas, sideróforos, formación de biopelículas, que en conjunto favorecen su persistencia en el huésped y en entornos

hospitalarios. En este estudio se identificaron once tipos de familias de efectores de sistema, destacando el sistema de secreción tipo III (T3SS o TTSS), responsable de la secreción de las exotoxinas: *exoS*, *exoT*, *exoU* y *exoY*, implicadas en la colonización, evasión de respuesta inmune y persistencia bacteriana (4,44). La relevancia de estos efectores ha sido documentada: por ejemplo, la presencia de *exoU* se ha asociado con formas clínicas más graves, como en pacientes con otitis media crónica, donde alcanzó una prevalencia del 70,6% frente al 6,7% en controles ( $p < 0,01$ ); además de mostrar una correlación con resistencia a ciprofloxacino y tobramicina ( $p = 0,035$ ) (45).

En este estudio se identificaron diversos factores de virulencia en *P. aeruginosa*, incluyendo genes asociados al sistema de secreción tipo III (T3SS), pili tipo IV, producción de alginato y mecanismos de quorum sensing (QS). Estos determinantes tienen un rol reconocido en la colonización, persistencia y patogenicidad de la bacteria. En la literatura, se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el T3SS poseen capacidad neutralizante frente a *P. aeruginosa* en modelos murinos de fibrosis quística, lo que evidencia el potencial de este sistema como diana terapéutica (46). Asimismo, pili tipo IV se asociaron significativamente con infecciones en pacientes con fibrosis quística ( $p < 0,001$ ) (47), mientras que la sobreproducción del exopolisacárido alginato favorece la formación de biopelículas crónicas, que confiere resistencia a antibióticos y al sistema inmune (48). Se ha demostrado que niveles de alginato  $> 400 \mu\text{g/ml}$  se relaciona con una mayor formación de biopelículas fuertes (53%), en contraste con el 30,7 % en aislados con formación intermedia, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0,047$ ) (49,50). La expresión de estos factores de virulencia está regulada por el

sistema de *quorum sensing* (QS), que es un mecanismo de comunicación bacteriana basado en la producción y detección de moléculas de señalización (51). Este mecanismo, de regulación genética mediada por QS permite la coordinación de comportamientos individuales y colectivos a través de cuatro sistemas principales: *lasI/lasR*, *rhlI/rhlR*, PQS y un sistema integrado basado en autoinductores (AI) (51). En entornos hospitalarios, la presión antibiótica puede favorecer la aparición de mutaciones en los genes *lasR*, regulando el gasto metabólico y permitiendo el mantenimiento de la virulencia mediante rutas alternativas, como la activación del sistema *rhlI* en un nicho de infección aguda (52,53). Estos hallazgos resaltan cómo la plasticidad regulatoria de *P. aeruginosa* le permite compensar la presión selectiva ejercida por los antibióticos, asegurando tanto la persistencia como el mantenimiento de su potencial patogénico en entornos clínicos.

Los hallazgos de este estudio enfatizan la necesidad de fortalecer la vigilancia genómica constante de *P. aeruginosa*, orientada a la detección de los clones de alto riesgo, genes de resistencia y virulencia. La identificación de mutaciones y determinantes de resistencia en aislados con perfiles fenotípicos diversos evidencia la complejidad de los mecanismos involucrados y refuerza la importancia de desarrollar estrategias diagnósticas más robustas para el control de infecciones en entornos hospitalarios donde la vulnerabilidad y la resistencia antibiótica es prevalente.

## LIMITACIONES

- Debido a las restricciones presupuestarias del secuenciamiento, sólo se secuenciaron 48 de 103 aislados, priorizando una cobertura promedio de 50X por aislado. La muestra restringe la generalización de los resultados a la población de estudio, sin embargo, estos datos brindan una base para futuros estudios de epidemiología molecular más representativos.
- La secuenciación del genoma completo no siempre presenta concordancia con los resultados fenotípicos, ya sea porque no se expresan el gen por la falta de identificación bioinformática de genes de resistencia y mutaciones la cual depende de bases de datos que están en constante actualización. Además, se requiere de más estudios bacteriológicos, que en combinación con otras herramientas ómicas, pueda mejorar la predicción *in silico* de nuevos genes asociados a la resistencia antibiótica.
- La detección de genes de virulencia se basa únicamente en predicciones *in silico* y no validaciones *in vitro*, lo que dificulta diferenciar cuales podrían estar asociadas a fenotipos más resistentes o tener relevancia clínica en pacientes.

## VI. CONCLUSIONES

- Los aislados de *P. aeruginosa* mostraron  $\beta$ -lactamasa (*bla*<sub>IMP-like</sub> y *bla*<sub>GES-like</sub>), genes de resistencia a aminoglucósidos (*aph*(3')-IIb), fos fomicina(*fosA*) y fenicol(*catB7*), además de mutaciones en *gyrA* y *parC*.
- Identificamos una alta frecuencia de genes de virulencia, principalmente aquellos relacionados con la clase de sistemas de efectores y formación de biofilm.
- En el estudio, se identificaron clones de alto riesgo, destacando ST357 (serotipo O11, 20,9%), portador del gen *bla*<sub>IMP-93</sub> o *bla*<sub>GES-like</sub>; y ST274 (O3, 9,3%), con doble mutación en la porina *oprD*.
- El análisis filogenético mostró la coexistencia, en un mismo entorno hospitalario, de clones con y sin determinantes de resistencia, lo que refleja la complejidad evolutiva de *P. aeruginosa*.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reynolds, D., Kollef, M. The Epidemiology and pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections: An update. *Drugs*. 2021; 81, 2117–2131. doi: 10.1007/s40265-021-01635-6.
2. Murray C, Ikuta K, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022; 399: 629-655. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
3. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. 2019; 37(1):177-192. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013.
4. Qin, S., Xiao, W., Zhou, C. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Sig transduct target ther*. 2022. 7, 199. doi: 10.1038/s41392-022-01056-1
5. Espinoza Pesantez DI, Esparza Sanchez GF. Resistencia enzimática en *Pseudomonas aeruginosa*, aspectos clínicos y de laboratorio. *Rev Chil Infectol*. 2021. feb; 38(1):69-80. doi:10.4067/S0716-10182021000100069.
6. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J Intensive Care*. 2020 Jan 28; 8:13. doi: 10.1186/s40560-020-0429-6.
7. Behzadi P, Baráth Z, Gajdács M. It's Not Easy Being Green: A narrative review on the microbiology, virulence and therapeutic prospects of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel)*. 2021; 10(1):42. doi: 10.3390/antibiotics10010042.

8. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin microbiol infect.* 2012; 18(3):268-281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
9. Kadri SS, Adjemian J, Lai YL, Spaulding AB, Ricotta E, et al. Difficult-to-treat resistance in gram-negative bacteremia at 173 US hospitals: retrospective cohort analysis of prevalence, predictors, and outcome of resistance to all first-line agents. *Clinical infectious diseases.* 2018;67(12):1803-1814. doi:10.1093/cid/ciy378
10. Oliver A, Rojo-Molinero E, Arca-Suarez J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial susceptibility profiles, resistance mechanisms and international clonal lineages: update from ESGARS-ESCMID/ISARPAE Group. *Clin microbiol infect.* 2023; doi: 10.1016/j.cmi.2023.12.026.
11. Organización Mundial de la Salud [Internet]. Lista de patógenos bacterianos prioritarios de la OMS, 2024: Patógenos bacterianos de importancia para la salud pública para orientar la investigación, el desarrollo y las estrategias de prevención y control de la resistencia a los antimicrobianos. ISBN:978-92-4-009346-1:72. [citado el 15 de julio de 2024]. Disponible: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>
12. Del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Oliver A. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with horizontally-acquired  $\beta$ -lactamases: 2020 update. *Int J Antimicrob Agents.* 2020; 56(6):106196. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106196.
13. Reyes J, Komarow L, Chen L, et al. Global epidemiology and clinical outcomes of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and associated carbapenemases

(POP): a prospective cohort study. *Lancet Microbe*. 2023; 4(3):e159-e170. doi:10.1016/S2666-5247(22)00329-9.

14. Wang M-G, Liu Z-Y, Liao X-P, Sun R-Y, Li R-B, Liu Y, Fang L-X, Sun J, Liu Y-H, Zhang R-M. Retrospective data insight into the global distribution of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*. 2021; 10(5):548. doi: 10.3390/antibiotics10050548.

15. Li Y, Fang L, Dong M, Cai H, Hua X, Jiang Y, Yu Y, Yang Q. blaKPC-2 overexpression and blaGES-5 carriage as major imipenem/relebactam resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones ST463 and ST235, respectively, in China. *Antimicrob agents chemother*. 2023; 67(11):e0067523. doi: 10.1128/aac.00675-23.

16. Mojica MF, De La Cadena E, García-Betancur JC, et al. Molecular mechanisms of resistance to ceftazidime/avibactam in clinical isolates of Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* in Latin American hospitals. *mSphere*. 2023; 8(2):e0065122. doi:10.1128/msphere.00651-22.

17. Mayta-Barrios M, Ramirez-Illescas J, Pampa-Espinoza L, Yagui-Moscoso M. Caracterización molecular de carbapenemasas en el Perú durante el 2019. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2021; 38(1):113-8. doi: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.381.5882>.

18. Pérez-Lazo G, Abarca-Salazar S, Lovón R, Rojas R, Ballena-López J, Morales-Moreno A, Flores-Paredes W, Arenas-Ramírez B, Illescas LR. Antibiotic Consumption and its relationship with bacterial resistance profiles in ESKAPE pathogens in a Peruvian hospital. *Antibiotics*. 2021; 10(10):1221. doi:10.3390/antibiotics10101221.

19. Tickler IA, Torre JCG, Alvarado L, Obradovich AE, Tenover FC. Mechanisms of carbapenemase-mediated resistance among high-risk *Pseudomonas aeruginosa* lineages in Peru. *J Glob Antimicrob Resist*. 2022; 31:135-140. doi: 10.1016/j.jgar.2022.08.018.
20. Liu B, Gao J, Liu XF, et al. Direct prediction of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by whole genome sequencing and metagenomic sequencing. *J Clin Microbiol*. 2023; 61(11): e0061723. doi:10.1128/jcm.00617-23.
21. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome open Res*. 2018. 3:124. Published 2018 Sep 24. doi:10.12688/wellcomeopenres.14826.1
22. Angles-Yanqui E, Huaranga-Marcelo J, Sacsquispe-Contreras R, Pampa-Espinoza L. Panorama de carbapenemases in Peru. *Rev Panam Salud Publica*. 2020;44: e61. Published 2020 Sep 23. doi:10.26633/RPSP.2020.61
23. Garry GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, et al. *Bergey's manual of systematic bacteriology. The Proteobacteria. Part B: The Gammaproteobacteria*. New York: Springer; 2005. 1106p. doi: 10.1007/0-387-28022-7.
24. Shifu Chen, Yanqing Zhou, Yaru Chen, Jia Gu; fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor, *Bioinformatics*. 2018; 34(17):884–890. doi: 10.1093/bioinformatics/bty560
25. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol*. 2012; 19(5):455-77.

26. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072-1075. doi:10.1093/bioinformatics/btt086
27. Schwengers O, Jelonek L, Dieckmann MA, Beyvers S, Blom J, Goesmann A. Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microbial Genomics*. 2021; 7(11). doi:10.1099/mgen.0.000685
28. Feldgarden M, Brover V, Gonzalez-Escalona N, et al. AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Sci Rep*. 2021;11(1):12728. doi:10.1038/s41598-021-91456-0.
29. Tonkin-Hill G, MacAlasdair N, Ruis C, Weimann A, Horesh G, et al. Producing polished prokaryotic pangenomes with the panaroo pipeline. *Genome Biol*. 2020;21(1):180. doi:10.1186/s13059-020-02090-4.
30. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 2014; 30(9):1312-1313. doi:10.1093/bioinformatics/btu033.
31. Salvador-Luján G, García-de-la-Guarda R, Gonzales-Escalante E. Caracterización de metalo- $\beta$ -lactamasas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* recuperados de pacientes hospitalizados en el Hospital Militar Central. *Rev peru med exp salud pública*. 2018 Oc; 35(4): 363-71. doi:10.17843/rpmesp.2018.354.3755.
32. Gonzales Escalante E, Vicente Taboada W, Champi Merino R, Soto Pastrana J, Flores-Paredes W, Lovera García M, et al. Metallo- $\beta$ -lactamasas en aislamientos

clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* en Lima, Perú. Rev peru med exp salud pública. 2013;30(2):241-5.

33. Labarca JA, Salles MJ, Seas C, Guzmán-Blanco M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. Crit rev microbiol. 2016; 42(2):276-92. doi: 10.3109/1040841X.2014.940494.

34. Kouda S, Ohara M, Onodera M, Fujiue Y, Sasaki M, Kohara T, et al. Increased prevalence and clonal dissemination of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with the blaIMP-1 gene cassette in Hiroshima. J Antimicrob Chemother. 2009 Jul;64(1):46-51. doi: 10.1093/jac/dkp142.

35. Mano Y, Saga T, Ishii Y, Yoshizumi A, Bonomo RA, Yamaguchi K, et al. Molecular analysis of the integrons of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected by nationwide surveillance programs across Japan. BMC Microbiol. 2015; 15:41. doi: 10.1186/s12866-015-0378-8.

36. Papagiannitsis C, Medvecky M, Chudejova K, Skalova A, Rotova V, Spanelova P, et al. Molecular Characterization of Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* of Czech Origin and Evidence for Clonal Spread of Extensively Resistant Sequence Type 357 Expressing IMP-7 Metallo- $\beta$ -Lactamase. Antimicrob agents chemother. 2017; 61(12):e01811-17. doi: 10.1128/AAC.01811-17.

37. Viñes J, Lopera C, Vergara A, Roca I, Vila J, Casals-Pascual C, Martínez JA, García-Vidal C, Soriano A, Pitart C. Emergence of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST179 producing both IMP-16 and KPC-2: a case study of introduction from Peru to Spain. Microbiol Spectr. 2024; 12(6):e0061424. doi: 10.1128/spectrum.00614-24.

38. Correa A, Del Campo R, Perenguez M, Blanco VM, Rodríguez-Baños M, Perez F, et al. Dissemination of high-risk clones of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(4):2421-5. doi: 10.1128/AAC.03926-14. *Pseudomonas aeruginosa* in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(4):2421-5. doi: 10.1128/AAC.03926-14.
39. Zurita J, Sevillano G, Solís MB, Paz y Miño A, Alves BR, Changuan J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with multidrug-resistant. *Journal of global antimicrobial resistance.* 2024; 38:332-8. doi: 10.1016/j.jgar.2024.07.003.
40. Cabot G, Zamorano L, Moyà B, Juan C, Navas A, Blázquez J, Oliver A. Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Antimicrobial Resistance and Fitness under Low and High Mutation Rates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Jan 4;60(3):1767-78. doi: 10.1128/AAC.02676-15.
41. Yang Y, Li X, Sun L, Wang X, Zhang Y, Pang J, Li G, Hu X, Nie T, Yang X, Liu J, Brandis G, You X, Li C. High level non-carbapenemase carbapenem resistance by overlaying mutations of *mexR*, *oprD*, and *ftsI* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol spectr.* 2025; 13:e01398-24. doi: 10.1128/spectrum.01398-24.
42. Chalhoub H, Sáenz Y, Rodriguez-Villalobos H, Denis O, Kahl BC, Tulkens PM, Van Bambeke F. High-level resistance to meropenem in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the absence of carbapenemases: role of active efflux and porin alterations. *Int J Antimicrob Agents.* 2016 Dec;48(6):740-743. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.09.012.

43. Ocampo-Sosa AA, Cabot G, Rodríguez C, Roman E, Tubau F, Macia MD, et al. Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrob agents chemother.* 2012; 56(4):1703-13. doi: 10.1128/AAC.05451-11.
44. Horna G, Ruiz J. Type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol res.* 2021; 246:126719. doi: 10.1016/j.micres.2021.126719
45. Park MH, Kim SY, Roh EY, Lee HS. Difference of Type 3 secretion system (T3SS) effector gene genotypes (exoU and exoS) and its implication to antibiotics resistances in isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from chronic otitis media. *Auris nasus larynx.* 2017;44(3):258–65. doi:10.1016/j.anl.2016.07.005.
46. Taglialegna A. Antibodies versus *P. aeruginosa*. *Nat rev microbiol.* 2024; 22:2. doi:10.1038/s41579-023-00997-w.
47. Kus JV, Tullis E, Cvitkovitch DG, Burrows LL. Significant differences in type IV pilin allele distribution among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis (CF) versus non-CF patients. *Microbiology (reading).* 2004; 150(Pt 5):1315-1326. doi: 10.1099/mic.0.26822-0.
48. Liang Z, Rybtke M, Kragh KN, Johnson O, Schicketanz M, Zhang YE, et al. Transcription of the alginate operon in *Pseudomonas aeruginosa* is regulated by c-di-GMP. *Microbiol pectr.* 2022; 10(4): e0067522. doi: 10.1128/spectrum.00675-22.
49. Davarzani F, Saidi N, Besharati S, Saderi H, Rasooli I, Owlia P. Evaluation of antibiotic resistance pattern, alginate and biofilm production in clinical isolates of

*Pseudomonas aeruginosa*. Iranian journal of public health. 2021; 50(2):341-349.  
doi: 10.18502/ijph.v50i2.

50. Pournajaf A, Razavi S, Irajian G, Ardebili A, Erfani Y, Solgi S, et al. Integron types, antimicrobial resistance genes, virulence gene profile, alginate production and biofilm formation in Iranian cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Infez med. 2018; 26(3):226-236. PMID: 30246765.

51. Singh VK, Almpani M, Wheeler KM, Rahme LG. Interconnections of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing systems in intestinal permeability and inflammation. mBio. 2023; 14(2): e0352422. doi: 10.1128/mbio.03524-22.

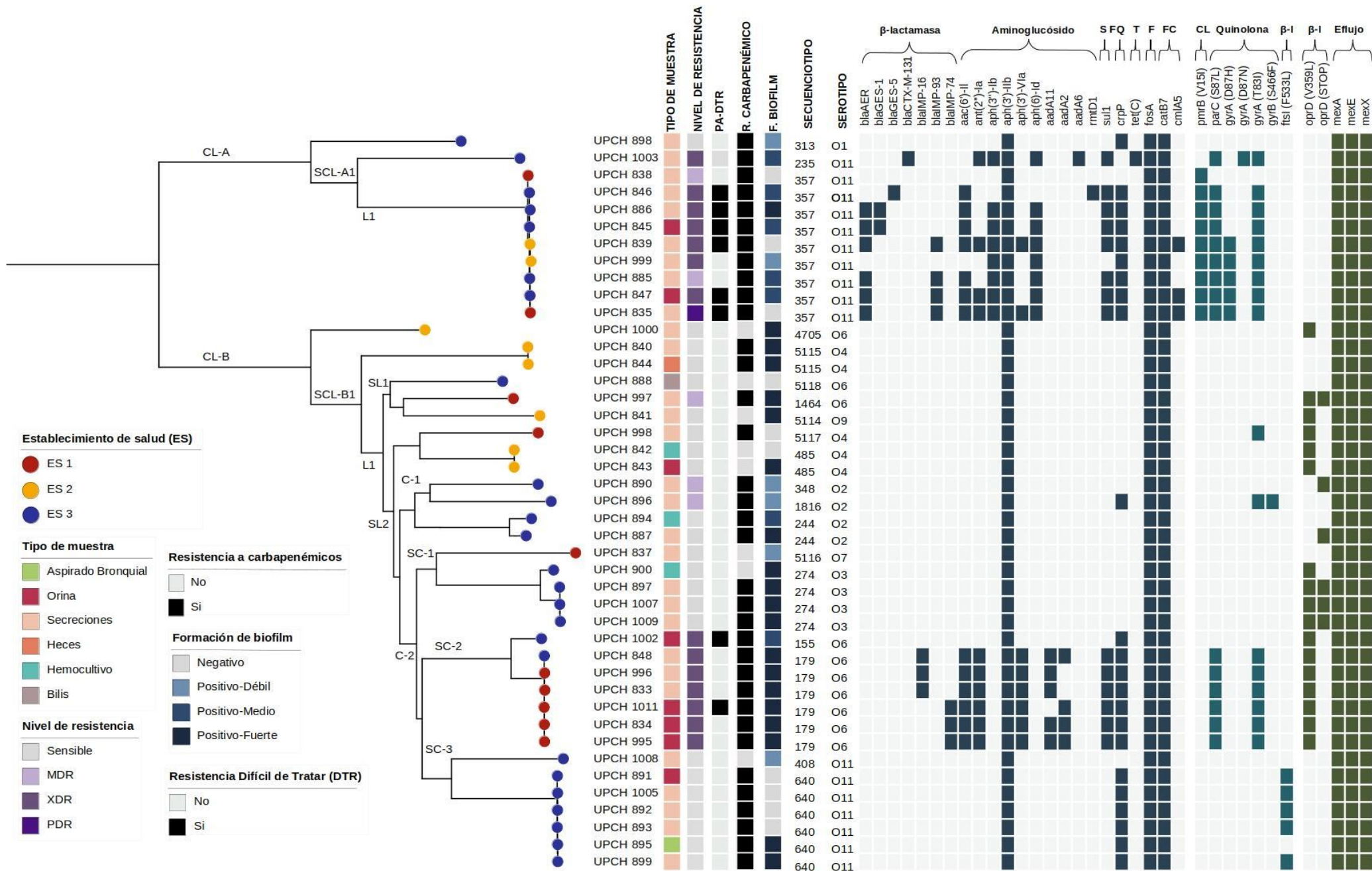
52. Simanek KA, Schumacher ML, Mallery CP, Shen S, Li L, Paczkowski JE. Quorum-sensing synthase mutations re-calibrate autoinducer concentrations in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to enhance pathogenesis. Nat Commun. 2023; 14:7986. doi:10.1038/s41467-023-43702-4.

53. Naga NG, Zaki AA, El-Badan DE, Rateb HS, Ghanem KM, Shaaban MI. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by methyl gallate from mangifera indica. Scientific reports. 2023; 13:17942. doi:10.1038/s41598-023-44063-0.

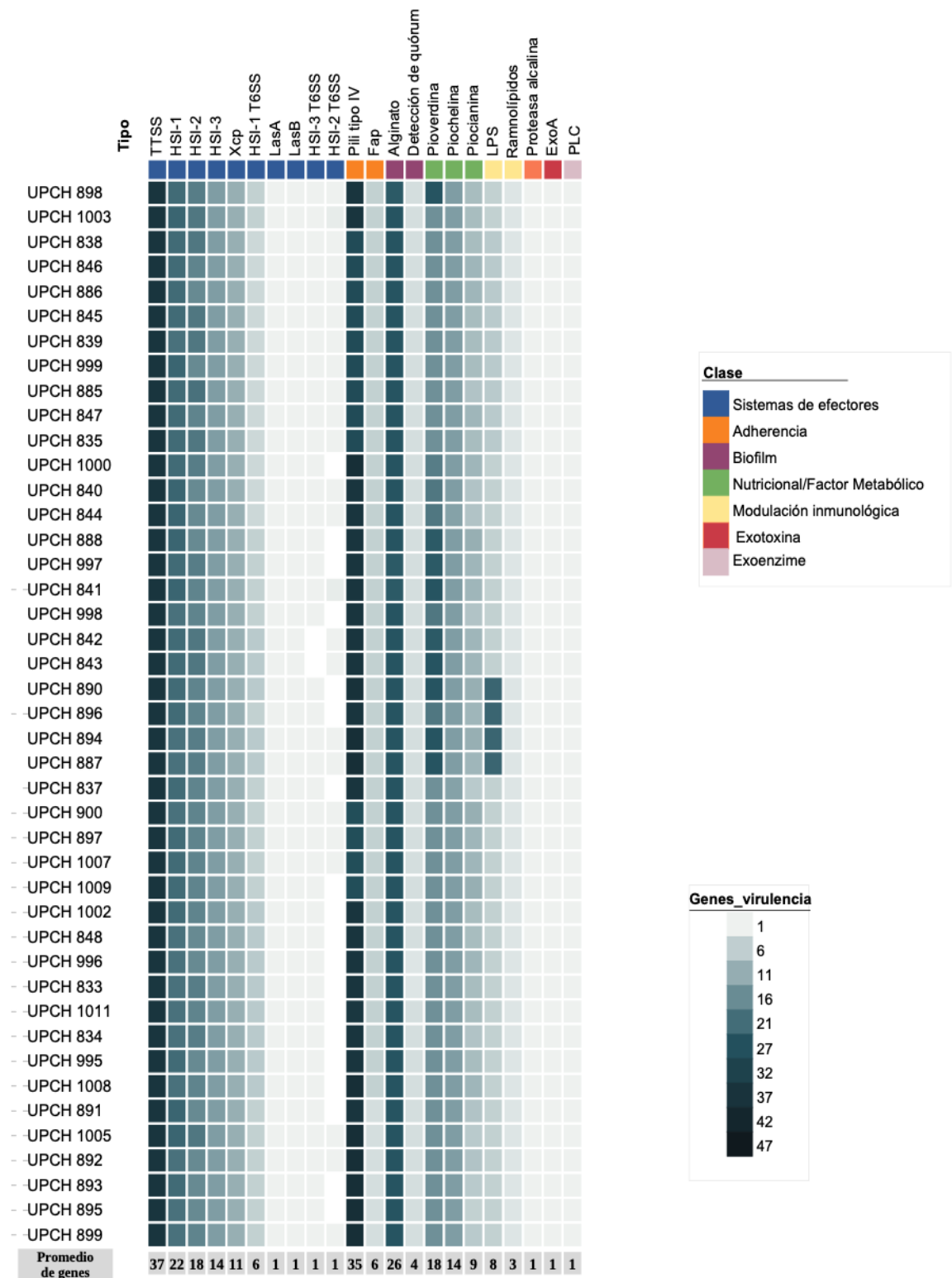
## VIII. TABLAS, GRÁFICOS Y FIGURAS

**Tabla 1.** Características genotípicas de *Pseudomona aeruginosa* (n=43)

| Características      | n(%)      |
|----------------------|-----------|
| <b>Secuenciotipo</b> |           |
| 357                  | 9(20,9)   |
| 179                  | 6 (14)    |
| 640                  | 6(14)     |
| 274                  | 4(9,3)    |
| 244                  | 2(4,7)    |
| 485                  | 2(4,7)    |
| 5115                 | 2(4,7)    |
| 348                  | 1(2,3)    |
| 155                  | 1(2,3)    |
| 313                  | 1(2,3)    |
| 235                  | 1(2,3)    |
| 408                  | 1(2,3)    |
| 1464                 | 1(2,3)    |
| 1816                 | 1(2,3)    |
| 4705                 | 1(2,3)    |
| 5116                 | 1(2,3)    |
| 5117                 | 1(2,3)    |
| 5118                 | 1(2,3)    |
| 408                  | 1(2,3)    |
| <b>Serotipo</b>      |           |
| O11                  | 17 (39,5) |
| O6                   | 10 (23,3) |
| O4                   | 5 (11,6)  |
| O2                   | 4 (9,3)   |
| O3                   | 4 (9,3)   |
| O7                   | 1(2,3)    |
| O1                   | 1(2,3)    |
| O9                   | 1(2,3)    |



**Figura 1.** Árbol filogenético de 43 aislados de *Pseudomonas aeruginosa* y genes de resistencia. ST= Secuenciotipo. S=Sulfonamida. FQ=Fluoroquinolona. T=Tetraciclina. F=Fosfomicina. CF=Fenicol. CL=Colistina. β-l=β-lactamasa. Clado(CL) → subclado(SCL) → linaje(L) → sublinaje(SL) → clúster (grupo)(C) → subcluster(SC).



**Figura 2.** Genes de virulencia de 43 aislados de *Pseudomonas aeruginosa*

## ANEXO

### Anexo 1. Selección de aislados

