

Principales características de la genética bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* que contribuyen con su patogénesis y resistencia

Main features of the bacterial genetics of *Pseudomonas aeruginosa* that contribute to its pathogenesis and resistance

Johanna Marcela Vanegas M.^{*}, Judy Natalia Jiménez Q.^{*†}

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria que ha emergido como un patógeno de gran importancia en el ambiente hospitalario debido a la variedad de cuadros clínicos que ocasiona y su habilidad para desarrollar resistencia a diferentes grupos de antibióticos. Los avances en la biología molecular han permitido el conocimiento del genoma de esta bacteria y dilucidar los componentes que contribuyen a su patogenicidad, resistencia y persistencia en el hospedero humano.

OBJETIVO

Describir las características principales del genoma constitutivo y accesorio de *P. aeruginosa* que contribuyen con su patogénesis y capacidad de resistencia.

METODOLOGÍA

Revisión bibliográfica de la literatura.

DESARROLLO

El genoma de *P. aeruginosa* es un reflejo de su capacidad de adaptación a diferentes hospederos y ambientes en la naturaleza. Mientras que el genoma constitutivo es conservado, el genoma accesorio es altamente variable y está compuesta de elementos genéticos como plásmidos, transposones e integrones que poseen no solo genes de virulencia, sino también genes de resistencia a los antibióticos.

CONCLUSIONES

La patogénesis y resistencia de *P. aeruginosa* está mediada por una diversidad de genes no solo constitutivos, sino también adquiridos, que favorecen su persistencia en diferentes ambientes y en el hospedero humano.

PALABRAS CLAVES

Genética bacteriana, genoma accesorio, genoma constitutivo, *Pseudomonas aeruginosa*, patogénesis.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa has emerged as an important pathogen in the hospital environment due to its role

in the origin of diverse clinical conditions and its development of antibiotic resistance. Advances in molecular biology have enabled genome knowledge of this microorganism and elucidated the components that contribute to its pathogenesis and resistance.

^{*}Línea de Epidemiología Molecular Bacteriana, Grupo de Microbiología Molecular, Grupo de Microbiología Básica y Aplicada (MICROBA), Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. [†]Contacto: nataliajindea@gmail.com
Recepción: 02-25-2014. Aceptación: 06-03-2014.

OBJECTIVE

Describe the main features of core and accessory genomes of *P. aeruginosa* that promote its pathogenesis and resistance.

METHODOLOGY

Narrative review.

DEVELOPMENT

Genome of *P. aeruginosa* shows its ability to adapt to different hosts and environments in nature. While the core genome is conserved, the accessory genome is highly variable and is composed of genetic elements as plasmids, transposons and integrons, which do not possess virulence genes only, but also antibiotic resistance genes.

CONCLUSIONS

Pathogenesis and resistance of *P. aeruginosa* are mediated by diverse genes both constitutive and acquired that promote its persistence in nature and human hosts.

KEY WORDS

Bacteria genetics, accessory genome, core genome, *Pseudomonas aeruginosa*, antimicrobial resistance, pathogenesis.

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria ampliamente distribuida en la naturaleza, que coloniza animales y humanos.^{1,2} En los últimos años, esta bacteria ha emergido como un patógeno de gran importancia hospitalaria que ocasiona diversidad de cuadros clínicos y ha desarrollado resistencia a diferentes grupos de antibióticos.^{1,2} El desarrollo de métodos de secuenciación de genoma completo ha favorecido el conocimiento de los componentes del genoma de *P. aeruginosa* relacionados con su crecimiento, metabolismo, virulencia y resistencia antimicrobiana; reflejando la alta capacidad de adaptación de esta bacteria al medio ambiente y a hospederos animales y humanos.³ Dicho genoma comprende secuencias de ADN constitutivas interrumpidas por secuencias de ADN exógeno que le confieren una apariencia de “mosaico” y es uno de los más largos

descritos en procariotas, con un tamaño que varía desde 5,5 a 7,0 Mbp. El genoma constitutivo posee una diversidad entre 0,5% a 0,75% y comprende genes de regulación, metabolismo y crecimiento.³ En contraste, el genoma accesorio está compuesto por plásmidos, integrones, transposones y ADN exógeno que le confieren alto grado de variabilidad.⁴⁻⁶ Tanto en el genoma constitutivo como en el accesorio, *P. aeruginosa* contiene genes de resistencia a antibióticos que pueden ser fácilmente diseminados de una cepa a otra. A continuación, se presenta una revisión sobre los componentes más importantes del genoma constitutivo y accesorio de *P. aeruginosa* que contribuyen con su capacidad de adaptación, patogénesis y resistencia.

OBJETIVO

Describir las características principales del genoma constitutivo y accesorio de *P. aeruginosa* que contribuyen con su patogénesis y capacidad de resistencia.

METODOLOGÍA DE LA BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA

La información fue recolectada a partir de tres bases de datos bibliográficas: PubMed, ScientiDirect y SpringerLink. En la búsqueda se seleccionaron artículos en español o inglés que fueron publicados preferiblemente entre los años 2000-2013. Los descriptores utilizados en la búsqueda fueron “*P. aeruginosa*”, “genome”, “core genome”, “accessory genome”, “phagotherapy”, “resistance”, “virulence”, “plasmids”, “phagos”, “transposons”, “integrons”. Los descriptores fueron combinados con el operador booleano “AND” para especificar la búsqueda de la información a la bacteria de interés.

DESARROLLO**GENOMA CONSTITUTIVO**

El genoma constitutivo está conformado por genes que se presentan en la mayoría de las cepas independiente de su origen, ambiental o clínico, y constituye cerca del 90% de todo su genoma.⁵

El primer genoma de *P. aeruginosa* secuenciado fue el de la cepa PAO1 reportado en el año 2000.⁷ Esta cepa fue aislada a partir de una herida de un paciente en Australia, en los años 50's y ha sido usada como referencia tanto en pruebas comerciales, como en investigación.⁸ En la actualidad, hay alrededor de 15 genomas reportados y más de 30 proyectos de secuenciación en la página del NCBI (del inglés National Center for Biotechnology Information).⁹ El genoma de la cepa PAO1 está conformado por 5.570 marcos de lectura, pero sólo ha sido demostrada la función en 372. Entre estos genes con funciones conocidas se encuentran los que codifican para polisacáridos, factores de virulencia, regulación y adhesión.⁷ Algunas funciones de los genes que hacen parte del genoma constitutivo de esta bacteria se describen a continuación:

- **Regulación.** Esta función está relacionada con la capacidad de la bacteria para modular la expresión de ciertos genes con el fin de lograr la adaptación a diferentes ambientes. Aproximadamente 8,4% de los genes de la cepa PAO1 están relacionados con regulación, la mayoría de ellos codificando reguladores transcripcionales (que modulan la transcripción de algunos genes) y un alto número de sistemas de dos componentes. Estos últimos son sistemas de señalización en los que participan una proteína denominada histidina quinasa que se autofosforila en la presencia de un estímulo con el fin de transmitir la señal a otra proteína llamada regulador de respuesta con el fin de activar la expresión de ciertos genes. En la base de datos P2CS (del inglés Prokaryotic Two-component Systems) se han reportado 62 histidinas quinasa y 73 reguladores de respuesta.^{7,10}
- **Metabolismo oxidativo.** Es un proceso químico en el cual la bacteria produce energía a partir de nutrientes. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, existen cerca de 300 sistemas de transporte en su membrana citoplasmática que le permiten captar y posteriormente metabolizar una amplia variedad de compuestos de carbono. Dentro de los genes relacionados con el metabolismo oxidativo, se encuentran los involucrados con la β -oxidación, principal ruta metabólica de oxidación de los ácidos grasos, y en la cual se han descrito alrededor de 25 genes relacionados con las enzimas acil-CoA

deshidrogenasas y 16 genes con las enoil-CoA hidratasas. Este alto número de genes no ha sido observado en otros genomas bacterianos, excepto para *Mycobacterium tuberculosis* y evidencia la gran versatilidad metabólica de esta bacteria.⁷

- **Proteínas de membrana externa.** Estas proteínas son de gran importancia en la adhesión y en el transporte de sustancias, factores de virulencia y antibióticos. Se han identificado aproximadamente 150 genes que codifican para proteínas de membrana externa. Dichas proteínas pueden ser clasificadas en tres familias: (i) La familia OprD: incluye un número de porinas que facilitan la difusión de aminoácidos básicos y de algunos antibióticos como el imipenem, antibiótico del grupo de los carbapenémicos, que constituyen el tratamiento de elección en cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes. Algunos aislamientos de *P. aeruginosa* pueden desarrollar resistencia al imipenem por la presencia de mutaciones en los 19 genes que conforman esta familia de porinas.^{7,11,12} (ii) La familia TonB, que incluye proteínas involucradas en la captación de hierro y vitaminas como la B12 y (iii) la familia OprM relacionadas con la secreción de sustancias y la cual hace parte de diferentes bombas de expulsión relacionadas con resistencia a antibióticos, como los carbapenémicos y los aminoglicósidos.^{7,13}
- **Resistencia intrínseca.** *P. aeruginosa* presenta tres características que le confieren resistencia antimicrobiana intrínseca a un número importante de antibióticos: baja permeabilidad de la membrana externa, una β -lactamasa constitutiva tipo AmpC y bombas de expulsión que expulsan el antibiótico impidiendo su acción. La presencia de estos tres mecanismos genera un perfil de resistencia a ampicilina-sulbactam, cefotaxima, ceftriaxona, eritapenem, tetraciclinas, trimetoprim/sulfametoxazol, cloranfenicol, nitrofurantoína y fosfomicina. Al igual que las demás bacterias Gram negativas no fermentadoras, *P. aeruginosa* es resistente a cefalosporinas de primera y segunda generación, clindamicina, y rifampicina.^{14,15} La mayoría de bombas de expulsión presentes en esta bacteria corresponden a la familia "RND" (del inglés Resistance Nodulation Division), descritas principalmente en bacterias Gram negativas, y responsables de

catalizar la salida activa de muchos antibióticos y agentes quimioterapéuticos. Esta familia está formada por proteínas de grandes dominios periplásmicos que forman complejos tripartitas con canales de la membrana externa y proteínas adaptadoras periplásmicas. La presencia de este complejo proteico tripartita sugiere que los antibióticos son exportados directamente al medio externo, más que al periplasma, lo cual se constituye una ventaja para la bacteria ya que el antibiótico tendría que atravesar la membrana externa para entrar de nuevo.¹⁶ Algunos ejemplos en *Pseudomonas* incluyen las bombas de expulsión MexAB-OprM y MexXY-OprM, cuya sobre-expresión conlleva al desarrollo de resistencia a carbapenémicos y aminoglicósidos, respectivamente.^{7,17}

- **Secreción de proteínas y quimiotaxis.** *P. aeruginosa* secreta diferentes factores de virulencia como toxinas y proteasas, las cuales favorecen su diseminación y permanencia en el hospedero. Algunas de estas proteínas son la exotoxina A que inhibe la síntesis de proteínas y la proteasa “LasA”, que inactiva algunos de los componentes del sistema inmune como los anticuerpos y las proteínas que hacen parte del complemento. La quimiotaxis es el proceso mediante el cual la bacteria logra dirigir su movimiento para captar nutrientes o alejarse de sustancias que puedan ser tóxicas; *P. aeruginosa* parece tener el sistema más complejo de quimiotaxis de las bacterias secuenciadas, con aproximadamente 26 marcos de lectura involucrados en la captación de aminoácidos, fosfatos inorgánicos y azúcares.^{5,7,18}

GENOMA ACCESORIO

La mayoría del genoma accesorio de *P. aeruginosa* se caracteriza por el alto contenido de G+C y la presencia de elementos genéticos móviles; la mayoría de ellos degenerados debido a la acumulación de deleciones, lo que dificulta el conocimiento de los mecanismos de transferencia, al presentar baja similitud con los elementos reportados. Muchos de estos elementos genéticos se insertan cerca a los genes que codifican para el tRNA debido a que son sitios altamente conservados, lo cual se ha reportado para otras bacterias.^{5,19}

El genoma accesorio de *P. aeruginosa* incluye: Elementos Conjugativos Integrativos o ICE (del inglés:

Integrative and Conjugative Elements), islas de reemplazo, transposones, integrones, plásmidos y fagos:

- **Elementos Conjugativos Integrativos (ICE).** Son elementos que pueden integrarse al cromosoma bacteriano mediante recombinación en los sitios *attP* y *attB* y ser replicados. Su tamaño varía entre 81 a 108 kb y tienen un papel importante en metabolismo y virulencia. La mayoría de los ICE pueden ser agrupados en dos familias: “pKLC102” y “*clc*-like”. La familia “pKLC102” posee una alta capacidad de movilización espontánea (10%) y contiene genes que codifican para enzimas como las ácido graso sintetasas, fosfolipasas, proteínas de adaptación al frío, reguladores de transcripción y la β -(1,2) glucano sintasa; proteína que hace parte del espacio periplásmico y media interacciones entre la bacteria y el hospedero.^{4,5} La familia “*clc*-like” está relacionada con el transporte de metales pesados y con el metabolismo y degradación de compuestos químicos como el 3-clorobenzoato. Algunos elementos que conforman esta familia son *clc*, PAG1-2, PAGI-3 y LESGI-3.^{4,5}
- **Islas de reemplazo.** Son elementos similares a las islas genómicas y pueden estar compuestas por cuatro grupos de genes que intervienen en procesos como la captación de hierro, la adhesión, la movilidad y la evasión al sistema inmune: (i) RGP9 que contiene genes relacionados con la glicosilación de la flagelina, (ii) RGP31, cuyos genes están involucrados en la síntesis del antígeno O del lipopolisacárido, (iii) RGP60, con genes asociados con la síntesis de la pioverdina, que actúa como un sideróforo en ambientes con escasez de hierro y (iv) RGP60, que contiene genes relacionados con la síntesis de la pilina, proteína que conforma el pili y es de importancia para la adherencia bacteriana.^{4,5} Estos elementos pueden ser adquiridos de forma horizontal y a pesar de que pueden variar de una cepa a otra, ocupan el mismo lugar en el genoma.
- **Transposones.** Son elementos que se insertan en sitios inespecíficos de un plásmido o del cromosoma bacteriano. La mayoría de transposones pueden ser insertados en diferentes sitios de

una molécula de DNA, pero algunos se insertan en secuencias ricas en A-T y en genes conservados.⁵ Existen dos tipos de transposones: los simples llamados también secuencias de inserción (IS), los cuales están solo conformados por genes necesarios para la transposición, y los compuestos los cuales contienen genes adicionales que codifican para diferentes proteínas y se encuentran flanqueados por secuencias de inserción. Estos elementos son asociados con alta frecuencia con genes de resistencia a antibióticos, lo que es de gran importancia ya que estos pueden ser fácilmente diseminados de una bacteria a otra.⁵ La familia de transposones Tn3 es una de las más frecuentes en *P. aeruginosa* y ha sido relacionada con la presencia del gen que codifica para la carbapenemasa de clase A, KPC, que hidroliza no solo los carbapenémicos, sino los demás antibióticos β -lactámicos.²⁰ Una variante de esta enzima, la KPC-2, fue hallada en nuestro país en una cepa de *P. aeruginosa* en el Tn4401, que hace parte de la familia Tn3.²¹ Esta carbapenemasa inicialmente fue descrita en el 2001 en cepas de *Klebsiella pneumoniae*,²² pero en la actualidad se ha diseminado no solo a otras enterobacterias como *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica* y *Serratia marcescens*, sino también a bacilos Gram negativos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*.²³ Otra carbapenemasa de clase B o metalo- β -lactamasa denominada VIM-1, que hidroliza todos los β -lactámicos excepto el aztreonam, también ha sido reportada en el transposón Tn402.²⁴ Algunos transposones pueden también modular la expresión de genes de resistencia adyacentes como es el caso de la secuencia de inserción IS1999, un tipo de transposón simple, que incrementa la expresión de la betalactamasas de espectro extendido (BLEE), como la VEB-1, la cual confiere resistencia a cefalosporinas.²⁵ En contraste, otros transposones pueden incrementar la sensibilidad a antibióticos como la ciprofloxacina y tetraciclina al insertarse en genes que codifican para algunas proteínas de membrana externa, conservando la estabilidad en la expresión de estas porinas, ya que una baja expresión de las mismas impediría el ingreso del antibiótico al interior de la bacteria.²⁶

- **Integrones.** Son elementos genéticos que no pueden movilizarse por sí mismos por lo que generalmente se encuentran contenidos en plásmidos conjugativos y transposones y se caracterizan por la capacidad de incorporar diferentes genes de resistencia. Estos elementos son clasificados según la secuencia de su integrasa, proteína que le permite integrarse en un plásmido o en el cromosoma bacteriano. Aunque se han descrito más de 90 variantes para esta proteína, los de clase 1, 2 y 3 son los que contienen genes de resistencia y poseen mayor importancia. Los integrones de clase 1 son uno de los principales mecanismos de diseminación de determinantes de resistencia antimicrobiana en *P. aeruginosa* y han sido relacionados con la presencia de carbapenemasas de clase B o metalo- β -lactamasas, como NDM y VIM.²⁷⁻²⁹ Además de contener genes que codifican para carbapenemasas, estos integrones con frecuencia contienen enzimas modificadoras de aminoglicósidos, que confieren resistencia a este grupo de antibióticos.³⁰ Adicionalmente, cuando se presenta un daño del ADN que genera una respuesta de reparación tipo SOS, se pueden generar rearrreglos en dichos integrones que podrían modular la expresión de integrasas favoreciendo la inserción de BLEE's y confiriendo resistencia a cefalosporinas de tercera generación.³¹ Algunos integrones de clase 1 han sido encontradas en cepas de *P. aeruginosa* provenientes de ambientes acuáticos, lo que sugiere que estas cepas pueden ser reservorios potenciales de genes de resistencia.³²
- **Plásmidos.** Son secuencias de ADN extracromosómico circular o lineal que tienen la capacidad de realizar su propia replicación y transcripción. Se han descrito con alta frecuencia y diversidad no solo en cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico, sino ambiental.³³ Muchos de ellos se caracterizan por contener genes de resistencia y en ocasiones se asocian con integrones y transposones. Como ejemplo de ello, son los plásmidos IncP-6 e IncU que han sido asociados con la presencia del transposón Tn4401 que puede contener el gen que codifica para la carbapenemasa KPC-2.^{34,35} Estos plásmidos pueden replicarse tanto en *P. aeruginosa* como en enterobacterias facilitando la transmisión de mecanismos de resistencia hacia diferentes tipos de bacterias.³⁵

- **Fagos y profagos.** Son virus que pueden desencadenar dos tipos de ciclos al infectar la bacteria: el ciclo lítico, que resulta en una lisis rápida de la bacteria infectada en un período corto de tiempo, con una liberación de numerosas partículas virales infecciosas; y el ciclo lisogénico, en el que el fago invade la célula hospedera y se integra en el cromosoma, transmitiéndose de forma vertical en cada generación de células hijas.⁴¹ En la actualidad se han descrito cerca de 60 fagos con capacidad de permanecer de forma lisogénica en *P. aeruginosa*. La mayoría de ellos son de doble cadena de ADN y son divididos en tres familias basadas en la morfología de la cola: *Siphoviridae* (cola larga y flexible, no contráctil), *Myoviridae* (cola larga, rígida y contráctil) y *Podoviridae* (cola corta, no contráctil); siendo la primera la más frecuente de todas.³⁶ Además de su indudable papel en la diversidad genética, los fagos pueden contener genes de virulencia que pueden conceder ventajas adaptativas a la bacteria. Algunos ejemplos son el profago ØCTX de familia *Myoviridae* que contiene el gen *ctx* que codifica para una toxina formadora de poro y el fago D3 de la familia *Siphoviridae* que puede alterar el LPS de *P. aeruginosa*, originando cambios en el antígeno O que pueden facilitar la evasión de la respuesta inmune durante la infección.³⁷ El fago FIZ15, con propiedades similares a D3, ha sido asociado con resistencia a la fagocitosis por macrófagos en ratón y con incrementar la resistencia al sistema inmune.³⁸ El fago filamentosos Pf4 media la aparición de variantes de colonias pequeñas, un tipo de colonias asociado con disminución de la función del pulmón en pacientes con fibrosis quística y con resistencia bacteriana.³⁹ Algunas bacteriocinas formadoras de poros conocidas como piocinas tipo R y F, son profagos defectuosos que contienen genes de la cola, pero carecen de genes necesarios para la formación de la cabeza, replicación e integración.⁴⁰ En general, las bacteriocinas son proteínas que inhiben el crecimiento de bacterias de la misma especie o especies cercanas. El uso de fagos como agentes antibacterianos ha sido documentado en la literatura. Sin embargo, solamente los fagos líticos son aptos para este uso terapéutico, ya que éstos originan una lisis rápida de la bacteria hospedera, se liberan en altas cantidades y tienen poca

probabilidad de ser transmitidos a otra bacteria a través del proceso de transducción.⁴¹⁻⁴³

CONCLUSIÓN

El conocimiento del genoma de *P. aeruginosa* permite dilucidar no solo la presencia de una gran variedad de genes relacionados con la regulación genética, metabolismo, captación de nutrientes, patogénesis y resistencia antimicrobiana presentes en el genoma constitutivo, sino también la alta capacidad de diseminación de genes de virulencia y resistencia adicionales que favorecen la permanencia de esta bacteria en diferentes ambientes y en el hospedero humano.

FINANCIACIÓN

Este trabajo fue realizado en el marco de un proyecto financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación, Colciencias (proyecto: 418-2011) y por el Comité para el Desarrollo de la Investigación, CODI, Universidad de Antioquia (proyecto: CIMB-068-12).

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses para la publicación de este manuscrito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P.** Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(11): 4783-8.
2. **Jimeno A, Alcalde MM, Blazquez A.** [Epidemic outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem-resistant producing metallo-beta-lactamase]. *Rev Clin Esp.* 2011; 211(4): 187-91.
3. **Spencer FA, Allegrone J, Goldberg RJ, Gore JM, Fox KA, Granger CB, et al.** Association of statin therapy with outcomes of acute coronary syndromes: the GRACE study. *Ann Intern Med.* 2004; 140(11): 857-66.
4. **Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, Davenport CF, Tümmler B.** *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front Microbiol.* 2011; 2:150.

5. **Kung VL, Ozer EA, Hauser AR.** The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010; 74(4): 621-41.
6. **Bezuidt OK, Klockgether J, Elsen S, Attree I, Davenport CF, Tümmler B.** Intraclonal genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* clones CHA and TB. *BMC Genomics.* 2013; 14:416.
7. **Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, et al.** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature.* 2000; 406(6799): 959-64.
8. **HOLLOWAY BW.** Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol.* 1955; 13(3): 572-81.
9. **NCBI (National Center for Biotechnology Information).** Genome *Pseudomonas aeruginosa*. [Acceso: 10 de octubre de 2013]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=pseudomonas+aeruginosa>
10. **P2CS (Prokaryotic 2-Component Systems).** *Pseudomonas aeruginosa*. [Acceso: 10 de octubre 2013]. Disponible en: <http://www.p2cs.org/>.
11. **Lee JY, Ko KS.** OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo- β -lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. *Int J Antimicrob Agents.* 2012; 40(2): 168-72.
12. **Li H, Luo YF, Williams BJ, Blackwell TS, Xie CM.** Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. *Int J Med Microbiol.* 2012; 302(2): 63-8.
13. **Tomás M, Doumith M, Warner M, Turton JF, Becerra A, Bou G, et al.** Efflux pumps, OprD porin, AmpC beta-lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(5): 2219-24.
14. **CLSI.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. January 2013.
15. **Vila J, Marco F.** [Interpretive reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28(10): 726-36.
16. **Nikaido H, Takatsuka Y.** Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1794(5): 769-81.
17. **Schweizer HP.** Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res.* 2003; 2(1): 48-62.
18. **Moulton RC, Montie TC.** Chemotaxis by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 1979; 137(1): 274-80.
19. **Kiewitz C, Tümmler B.** Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution. *J Bacteriol.* 2000; 182(11): 3125-35.
20. **Riera E, Cabot G, Mulet X, García-Castillo M, del Campo R, Juan C, et al.** *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(9): 2022-7.
21. **Cuzon G, Naas T, Villegas MV, Correa A, Quinn JP, Nordmann P.** Wide dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing beta-lactamase blaKPC-2 gene in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(11): 5350-3.
22. **Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al.** Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(4): 1151-61.
23. **Arnold RS, Thom KA, Sharma S, Phillips M, Kristie Johnson J, Morgan DJ.** Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *South Med J.* 2011; 104(1): 40-5.
24. **Tato M, Coque TM, Baquero F, Cantón R.** Dispersal of carbapenemase blaVIM-1 gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(1): 320-7.
25. **Aubert D, Naas T, Nordmann P.** IS1999 increases expression of the extended-spectrum beta-lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2003; 185(17): 5314-9.
26. **Shen L, Gao X, Wei J, Chen L, Zhao X, Li B, et al.** PA2800 plays an important role in both antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Microbiol.* 2012; 65(5): 601-9.
27. **Martinez E, Marquez C, Ingold A, Merlino J, Djordjevic SP, Stokes HW, et al.** Diverse mobilized class 1 integrons are common in the chromosomes of pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(4): 2169-72.
28. **Janvier F, Jeannot K, Tessé S, Robert-Nicoud M, Delacour H, Rapp C, et al.** Molecular characterization of blaNDM-1 in a ST235 *Pseudomonas aeruginosa* isolate, France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013.
29. **Ingold AJ, Castro M, Nabón A, Borthagaray G, Márquez C.** [VIM-2 metallo- β -lactamase gen detection in a class 1 integron associated to bla(CTX-M-2) in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Uruguay: first communication]. *Rev Argent Microbiol.* 2011; 43(3): 198-202.
30. **Ruiz-Martínez L, López-Jiménez L, Fusté E, Vinuesa T, Martínez JP, Viñas M.** Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents.* 2011; 38(5): 398-402.

31. **Hocquet D, Llanes C, Thouverez M, Kulasekara HD, Bertrand X, Plésiat P, et al.** Evidence for induction of integron-based antibiotic resistance by the SOS response in a clinical setting. *PLoS Pathog.* 2012; 8(6): e1002778.
32. **Zanetti MO, Martins VV, Pitondo-Silva A, Stehling EG.** Antimicrobial resistance, plasmids and class 1 and 2 integrons occurring in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Brazilian aquatic environments. *Water Sci Technol.* 2013; 67(5): 1144-9.
33. **Ranjbar R, Owlia P, Sadari H, Bameri Z, Izadi M, Jonaidi N, et al.** Isolation of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* harboring different plasmids. *Pak J Biol Sci.* 2007; 10(17): 3020-2.
34. **Stokes HW, Martinez E, Roy Chowdhury P, Djordjevic S.** Class 1 integron-associated spread of resistance regions in *Pseudomonas aeruginosa*: plasmid or chromosomal platforms? *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(7): 1799-800.
35. **Naas T, Bonnin RA, Cuzon G, Villegas MV, Nordmann P.** Complete sequence of two KPC-harboring plasmids from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2013.
36. **Sepúlveda-Robles O, Kameyama L, Guarneros G.** High diversity and novel species of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78(12): 4510-5.
37. **James CE, Fothergill JL, Kalwij H, Hall AJ, Cottell J, Brockhurst MA, et al.** Differential infection properties of three inducible prophages from an epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* 2012; 12:216.
38. **Vaca-Pacheco S, Paniagua-Contreras GL, García-González O, de la Garza M.** The clinically isolated FIZ15 bacteriophage causes lysogenic conversion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Curr Microbiol.* 1999; 38(4): 239-43.
39. **Webb JS, Lau M, Kjelleberg S.** Bacteriophage and phenotypic variation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol.* 2004; 186(23): 8066-73.
40. **Nakayama K, Takashima K, Ishihara H, Shinomiya T, Kageyama M, Kanaya S, et al.** The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Mol Microbiol.* 2000; 38(2): 213-31.
41. **Harper DR, Enright MC.** Bacteriophages for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Appl Microbiol.* 2011; 111(1): 1-7.
42. **Krylov V, Shaburova O, Krylov S, Pleteneva E.** A genetic approach to the development of new therapeutic phages to fight *Pseudomonas aeruginosa* in wound infections. *Viruses.* 2013; 5(1): 15-53.
43. **Soothill J.** Use of bacteriophages in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013; 11(9): 909-15.