

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



**ESCUELA DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD
DE CANTABRIA**

**DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOMEDICINA**

TESIS DOCTORAL

**Caracterización del resistoma y viruloma
de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* de
pacientes con fibrosis quística y
bronquiectasias**

Realizada por: Catalina Díaz Ríos
Dirigida por: Dr. Alain Ocampo Sosa

Santander, 2020

*Si eres pobre, trabaja.
Si eres rico, sigue trabajando.
Si te abruman las cargas y responsabilidades, trabaja.
Si eres dichoso, no dejes de trabajar.
¿Sufres decepciones? Disípalas trabajando.
Cuando flaquee tu fe y la razón parezca abandonarte, trabaja.
Cuando se desvanezcan tus más fúlgidos sueños y estés por perder la esperanza,
trabaja.
Trabaja como si estuviera en peligro tu vida, que en realidad lo está.
Trabaja con fe, con entusiasmo; el trabajo es el mejor remedio tanto para los
achaques del cuerpo como para las dolencias del espíritu.
¿Te agobia el dolor, los seres a quien más amas te son infieles, las amistades no te
corresponden? Trabaja.
El trabajo será tu salvación.*

AGRADECIMIENTOS

Estos 4 años de duro trabajo no fueron para nada fáciles, sin embargo, me siento orgullosa de haber llegado hasta aquí y de tener a mi alrededor gente, sin la cual, esto no hubiera sido posible.

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia y a Daniel, por la confianza, paciencia y apoyo incondicional durante estos años.

A mi director, el Dr. Alain Ocampo. Gracias por darme la oportunidad de realizar esta tesis, por tu paciencia y por dedicar tiempo a mi formación.

A Laura, por tu compañía, amistad y complicidad. Por enseñarme todo lo que sé y por ayudarme siempre que lo necesité. Porque como te dije alguna vez, esta tesis también es tuya.

Al equipo de Microbiología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, en especial a la Dra. Marta Fernández, por su ayuda y palabras de apoyo durante estos años.

A las chicas del laboratorio 206, Lizbeth y Lucía, por cada palabra de ánimo, y en especial a Jesús, por todas las veces que hiciste de psicólogo y me levantaste el ánimo con tus charlas motivacionales.

Por último, quiero agradecerte a ti, Pablo García. Para nadie es un secreto lo duro que fue este último año, pero tú me diste la oportunidad de trabajar contigo, y gracias a eso, todo fue más llevadero. Gracias por ser tan buen jefe, compañero y amigo. El 2021 será nuestro.

ÍNDICE

LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS	7
ABREVIATURAS	13
RESUMEN	19
INTRODUCCIÓN	21
1. Aspectos generales e importancia clínica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
2. Bronquiectasias y fibrosis quística	24
2.1. Bronquiectasias	25
2.2. Fibrosis quística	26
2.2.1. Infecciones bacterianas en pacientes con FQ	27
2.2.2. Metales traza como biomarcadores inflamatorios	29
2.2.3. Diversidad y adaptación de <i>P. aeruginosa</i> durante el proceso de infección	30
3. Resistencia a los antibióticos	32
3.1. Mecanismo de acción de los antibióticos en gramnegativos	36
3.2. Mecanismos de resistencia a antibióticos en <i>P. aeruginosa</i>	39
3.2.1. Alteraciones de la permeabilidad de la membrana	42
3.2.2. Modificación de los antibióticos	49
3.2.3. Modificación de las dianas	53
4. Distribución clonal global de cepas de <i>P. aeruginosa</i> en FQ	53
5. Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	54
5.1. Adhesinas y proteínas de membrana	56
5.2. Biofilm	57
5.2.1. Mecanismos implicados en la regulación del biofilm	58

5.3.	Quorum sensing (QS)	61
5.3.1.	Oxilipinas como autoinductores de QS en <i>P. aeruginosa</i>	64
5.4.	Sistemas de secreción	65
5.4.1.	Sistemas de secreción de <i>P. aeruginosa</i>	66
6.	Sistema de secreción tipo VI (T6SS)	75
6.1.	Estructura y homología con el bacteriófago T4	77
6.2.	El T6SS de <i>P. aeruginosa</i>	79
6.2.1.	Regulación del T6SS de <i>P. aeruginosa</i>	85
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS		89
METODOLOGÍA		93
1.	Cepas bacterianas, medio y condiciones de cultivo	95
2.	Determinación de la sensibilidad a los antibióticos	96
2.1.	Definición de los fenotipos de resistencia a los antimicrobianos	97
3.	Extracción de DNA	98
4.	Extracción y cuantificación de ADN genómico	99
5.	Amplificación de genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	100
5.1.	Purificación y secuenciación de los productos de PCR	101
6.	Detección de genes de resistencia	101
7.	Detección de genes de virulencia	102
8.	Extracción de ARN total	103
8.1.	Retrotranscripción y PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)	104
9.	Determinación de la relación clonal de los aislados de <i>P. aeruginosa</i>	105
9.1.	Electroforesis de campo pulsado (PFGE)	105
9.2.	Tipificación de secuencias de múltiples loci (MLST)	109

10.	Secuenciación masiva (WGS)	110
11.	Ensayos de biofilm	111
11.1.	Oxilipinas	112
12.	Ensayos de movilidad	113
13.	Ensayos de supervivencia/mortalidad en modelo de <i>Galleria mellonella</i>	114
1.	Línea celular A549. Descongelación, cultivo y mantenimiento	115
2.	Adhesión e internalización de <i>P. aeruginosa</i> en células A549	115
2.1.	Ensayos de inmunofluorescencia	117
3.	Expresión del sistema de secreción tipo VI (T6SS)	121
3.1.	Determinación del tiempo de infección	121
3.2.	Experimentos de competitividad bacteriana	121
3.3.	Efecto de la presencia de metales traza y concentraciones subinhibitorias (subCMI) de antibióticos sobre la expresión del T6SS	124
	RESULTADOS	127
1.	Características fenotípicas. Morfología colonial, producción de pigmentos y hemólisis	129
2.	Análisis de la sensibilidad a los antibióticos	130
3.	Tipificación molecular	132
3.1.	Electroforesis en campo pulsado (PFGE)	132
3.2.	Análisis de MLST	136
4.	Secuenciación masiva de genomas de aislados de <i>P. aeruginosa</i>	139
4.1.	Pangenoma	139
4.2.	Serotipado in silico	144
4.3.	Resistoma de <i>P. aeruginosa</i>	144

4.3.1.	Genes de resistencia a betalactámicos y carbapenémicos: Presencia de betalactamasas, alteraciones en AmpC y alteraciones en la porina OprD _____	145
4.3.1.1.	Análisis de la porina OprD _____	153
4.3.2.	Genes de resistencia a aminoglucósidos _____	154
4.3.3.	Genes de resistencia a fluoroquinolonas: Mutaciones en las QRDR y disminución de sensibilidad a ciprofloxacino _____	157
4.3.4.	Genes de resistencia a polimixinas _____	161
4.3.5.	Genes de resistencia a fosfomicina _____	162
4.3.6.	Alteraciones en los sistemas de expulsión _____	162
5.	Factores de virulencia en <i>P. aeruginosa</i> _____	169
5.1.	Genes de virulencia _____	169
5.2.	Formación de biofilm _____	177
5.2.1.	Oxilipinas y formación de biofilm _____	178
5.3.	Movilidad _____	181
5.4.	Estudios de supervivencia/mortalidad en <i>G. mellonella</i> _____	183
5.5.	Interacción de <i>P. aeruginosa</i> con la línea celular A549 _____	188
6.	Estudio del T6SS de <i>P. aeruginosa</i> _____	190
6.1.	Ensayo de competitividad bacteriana. Determinación del índice de competitividad y expresión del T6SS _____	190
6.2.	Efecto de metales traza en la expresión del T6SS de <i>P. aeruginosa</i> _____	193
6.2.1.	Hierro _____	194
6.2.2.	Cobre _____	194
6.2.3.	Zinc _____	195
6.3.	Efecto de antibióticos a concentraciones subinhibitorias en la expresión del T6SS en <i>P. aeruginosa</i> _____	196

6.3.1. Gentamicina	196
6.3.2. Imipenem	197
DISCUSIÓN	199
CONCLUSIONES	243
REFERENCIAS	247
ANEXOS	271
Anexo 1 – Aislados	273
Anexo 2 – Antibióticos	294
Anexo 3 – Cebadores empleados en la amplificación de genes de <i>P. aeruginosa</i> y programas de PCR	295
Anexo 4	302

LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

➤ Tablas

Tabla 1. Antibióticos y categorías antimicrobianas

Tabla 2. Principales genes y mutaciones involucradas en la resistencia a antibióticos de *P. aeruginosa*.

Tabla 3. Betalactamasas según la clasificación de Ambler

Tabla 4. Factores de virulencia de *P. aeruginosa*

Tabla 5. Reactivos y cantidades empleadas para la reacción de la PCR

Tabla 6. Genes de virulencia en *P. aeruginosa*

Tabla 7. Preparación del tampón de lisis y solución de Proteinasa K

Tabla 8. Tampón de estabilización y de mezcla de restricción empleados para la digestión del ADN embebido en los bloques de agarosa

Tabla 9. Composición de medios swim y swarm

Tabla 10. Aislados seleccionados para los experimentos de adhesión e internalización en la línea celular A549

Tabla 11. Distribución de patrones genéticos entre los aislados de pacientes con FQ

Tabla 12. Distribución de patrones genéticos entre las cepas aisladas de pacientes con BNFQ

Tabla 13. Control de calidad de los 79 genomas secuenciados

Tabla 14. Susceptibilidad a betalactámicos y carbapenémicos y mutaciones en AmpC y sus reguladores

Tabla 15. Mutaciones en PBP

Tabla 16. Clasificación de las mutaciones encontradas en OprD

Tabla 17. Mutaciones en los genes de resistencia a aminoglucósidos

Tabla 18. Mutaciones en los genes de resistencia a fluoroquinolonas

Tabla 19. Mutaciones en los genes de resistencia a polimixinas

Tabla 20. Mutaciones encontradas en los sistemas de expulsión y sus reguladores

Tabla 21. Mutaciones en genes reguladores del T6SS

Tabla 22. Selección de aislados con actividad diolsintasa

Tabla 23. Patrones de movilidad según el rango de desplazamiento

Tabla 24. Índice de competitividad

Tabla 25. Pacientes portadores de aislados con distintos pulsotipos y ST

Tabla 26. Distribución de los subtipos del pulsotipo A entre los aislados pertenecientes a ambas colecciones

Tabla 27. Resistencia a carbapenémicos de los aislados pertenecientes a los clones ST274 y ST253

Tabla 28. CMI ($\mu\text{g/ml}$) de los aislados pertenecientes al ST155

Tabla 29. Aislados resistentes a carbapenémicos con mutaciones que afectan los *loops* L2, L3 y L7 en la porina OprD

Tabla 30. Aislados donde se encontraron polimorfismos que llevaron a codones de parada prematuros en OprD

Tabla 31. Mutaciones en GyrA y ParC en aislados pertenecientes al clon del alto riesgo ST175

Tabla 32. Mutaciones en los componentes estructurales del sistema de eflujo MexAB-OprM en aislados de *P. aeruginosa*

Tabla 33. Mutaciones en NfxB

Tabla 34. Mutaciones en MexY y MexY

Tabla 35. Mutaciones en MexZ que impiden su unión con MexX-MexY

Tabla 36. Mutaciones en MexZ

Tabla 37. Perfiles de resistencia, efectores de T3SS y T6SS y serotipos

Tabla A1 – Aislados, colección, pacientes y fuente

Tabla B1 – Selección de aislados secuenciados

Tabla C1 – Nomenclatura de los aislados secuenciados

Tabla D1 – Interacción de *P. aeruginosa* con la línea celular A549: Selección de aislados

Tabla A2 – Antibióticos utilizados

Tabla A3 – Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados y programa de PCR para la amplificación de genes de resistencia de *P. aeruginosa*

Tabla B3 – Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados y programa de PCR para la amplificación de genes de virulencia de *P. aeruginosa*

Tabla C3 – Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados y programa de PCR para la amplificación de genes endógenos de *P. aeruginosa*

Tabla A4 – Genes de virulencia – Base de datos VFDB

➤ Figuras

Figura 1. Imágenes para el diagnóstico de las bronquiectasias

Figura 2. Prevalencia de patógenos respiratorios en pacientes con FQ

Figura 3. Evolución de la infección aguda a la infección crónica

Figura 4. Desarrollo de antibióticos y aparición de resistencia

Figura 5. Representación esquemática de la disposición de los componentes en la membrana de *P. aeruginosa*

Figura 6. Estructura de la porina OprD. Representación de los *loops* principales

Figura 7. Modelos estructurales y funcionales de las bombas de expulsión de *P. aeruginosa*

Figura 8. Patogenicidad y factores de virulencia de *P. aeruginosa*

Figura 9. Proceso de formación de biofilm.

Figura 10. Estructura en forma de seta del biofilm formado por *P. aeruginosa* PAO1.

Figura 11. Mecanismos implicados en la regulación de la producción de biofilm

Figura 12. Cascada jerárquica del QS de *P. aeruginosa*

Figura 13. Modelo del ODS

Figura 14. Sistemas de secreción bacteriana

Figura 15. Sistemas Apr y Has

Figura 16. Sistemas Xcp y Hxc

Figura 17. Estructura del T3SS de *P. aeruginosa*

Figura 18. Estructura de ExoS, ExoT, ExoU y ExoY de *P. aeruginosa*

Figura 19. Regulación del T3SS de *P. aeruginosa*

Figura 20. T3SS como principal determinante de virulencia en *P. aeruginosa*

Figura 21. a) Estructura del autotransportador EstA. b) Vista rotada 90°

Figura 22. Distribución de los sistemas del T6SS entre Proteobacterias

Figura 23. Bacteriófago T4 y su homología con la estructura del T6SS

Figura 24. Mecanismo de inyección del T6SS

Figura 25. A) Clústeres del T6SS de *P. aeruginosa*. B) Organización de los clústeres H1-T6SS y H2-T6SS de *P. aeruginosa*

Figura 26. Localización de los componentes del T6SS en el genoma de PAO1

Figura 27. H1-T6SS de *P. aeruginosa* y cluster VgrG1b

Figura 28. Secreción de proteínas efectoras por el H1-T6SS

Figura 29. Representación esquemática del funcionamiento de los clusters del T6SS

Figura 30. Larvas de *G. mellonella*

Figura 31. Esquema de los experimento de competitividad bacteriana

Figura 32. Diagrama de Venn. Secreción de pigmentos: piorrubina (rojo), pioverdina (amarillo), piocianina (azul), piomelanina (marrón)

Figura 33. Análisis de sensibilidad a antibióticos

Figura 34. Perfiles de resistencia

Figura 35. Distribución de ST entre los perfiles de resistencia

Figura 36. Dendrograma de los 198 aislados de *P. aeruginosa*

Figura 37. Pangenoma: Genes core y genes accesorios

Figura 38. Representación esquemática de la presencia (azul) o ausencia (blanco) de genes. A) Colección FQ. B) Colección BNFQ

Figura 39. Cladogramas según presencia/ausencia de genes accesorios (A) y genes core (B) en los aislados de FQ y presencia/ausencia de genes accesorios (C) y genes core (D) en los aislados de BNFQ

Figura 40. Serotipos de los aislados de *P. aeruginosa*

Figura 41. Presencia de genes efectores del T6SS en los 79 aislados de *P. aeruginosa* secuenciados

Figura 42. Distribución de genes de virulencia entre los 79 aislados de *P. aeruginosa* secuenciados

Figura 43. Formación de biofilm. A) Capacidad productora de biofilm. B1) Cuantificación del biofilm en los aislados de la colección BNFQ. B2) Cuantificación del biofilm en los aislados de la colección FQ

Figura 44. Estudio de la actividad diolsintasa. A) Efecto del ácido oleico en la formación de biofilm. B) Expresión del gen *PA2077*

Figura 45. Movilidad de los aislados de *P. aeruginosa*

Figura 46. Curvas de Kaplan Meier de supervivencia de *G. mellonella* infectadas con *P. aeruginosa*

Figura 47. Interacción de *P. aeruginosa* con la línea celular A549

Figura 48. Competitividad bacteriana. *P. aeruginosa* (PAO1, Pae221) vs *B. cenocepacia* (BcJ2315) y *P. aeruginosa* (PAO1, Pae221) vs *A. xylooxidans* (Ax1203)

Figura 49. Expresión del T6SS en cultivos mixtos de *P. aeruginosa* y *B. cenocepacia* (A1 y A2) y *P. aeruginosa* y *A. xylooxidans* (B1 y B2)

Figura 50. Efecto del hierro (1 µg/ml) en la expresión del T6SS

Figura 51. Efecto del cobre (0,2 µg/ml) en la expresión del T6SS

Figura 52. Efecto del zinc (1,3 µg/ml) en la expresión del T6SS

Figura 53. Efecto de gentamicina a concentraciones subinhibitorias (1/4 CMI) en la expresión del T6SS de *P. aeruginosa*

Figura 54. Efecto de imipenem a concentraciones subinhibitorias (1/4 CMI) en la expresión del T6SS de *P. aeruginosa*

Figura 55. Distribución de AME entre los aislados de *P. aeruginosa* resistentes a aminoglucósidos

Figura 56. Número de genes de virulencia encontrados en aislados de *P. aeruginosa*

Figura 57. Presencia de efectores del T3SS en los 79 aislados de *P. aeruginosa* secuenciados

Figura 58. Alineamientos de las secuencias de las cajas Fur

Figura 59. Alineamiento de los sitios de unión de CueR a las regiones promotoras del H2-T6SS

ABREVIATURAS

µg/ml: Microgramo por mililitro

µl: Microlitro

µm: Micrómetro

µM: Micromolar

1,6 amp: 1,6 anhidromuropéptidos

10-HOME: Ácido (10S)-hidroxi-(8E)-octadecenoico

2-AA: 2-amino acetofenona

7,10-DiHOME: Ácido 7S,10S-dihidroxi-(8E)-octadecenoico

ABC: ATP-binding cassette

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ADNe: Ácido desoxirribonucleico extracelular

AK: Amikacina

AME: Enzima modificadora de aminoglucósidos

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico

ARNs: Ácido ribonucleico de pequeño tamaño

ATP: Adenosín trifosfato

AZT: Aztreonam

BHL: Actil homoserina N-butirilhomoserin lactona

BLEE: Betalactamasas de espectro extendido

BNFQ: Bronquiectasia no asociada a fibrosis quística

bp: Pares de bases

BSA: Albúmina de suero bovino

CAZ: Ceftazidima

CBD: Chaperone Binding Domain

c-di-GMP: Diguanylato cíclico

CFTR: Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística

CIP: Ciprofloxacino

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

cm: Centímetro

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CO₂: Dióxido de carbono

COESANT: Comité Español del Antibiograma

COL: Colistina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DGC: Diguanilato ciclasa

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO₆₀₀: Densidad óptica a 600 nm de absorbancia

DOR: Doripenem

EBP: Enhancer binding protein

ECDC: European Centre for Diseases Prevention and Control

ECOFF: Epidemiological cut-off value

EF-Tu: Factor de elongación Tu

EMA: European Medicines Agency

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

EUCAST: European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing

FBS: Suero fetal bovino

Fe: Hierro

FEP: Cefepime

FOS: Fosfomicina

FQ: Fibrosis quística

g/l: gramo por litro

g: Fuerza centrífuga relativa o fuerza g

GEN: Gentamicina

GFP: Proteína de fluorescencia verde

GMP: Guanosina monofosfato

GOF: Gain of function

GTP: Grupo trifosfato

HIV: Virus de inmunodeficiencia humana

I: Intermedio

IC: Índice de competitividad

IDCV: Inmunodeficiencia común variable

IL-1 β : Interleucina 1

IMP: Imipenem

kb: Kilobase

L-Ara4N: 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa

LEV: Levofloxacino

MATE: Multidrug and toxic compound extrusion

MBL: Metalobetalactamasas

MDR: Multirresistente

MER: Meropenem

MFP: Proteína de fusión de membrana

MFS: Major facilitator family

mg/ml: Miligramo por mililitro

MHA: Mueller Hinton Agar

MHB: Caldo Mueller Hinton

min: Minuto

ml: Mililitro

MLD: Membrane Localization Domain

MLST: Secuencia de múltiples loci

mm: milímetro

modR: Moderadamente resistente

MOI: Ratio de bacterias por célula

MRSA: *S. aureus* resistente a meticilina

multiS: Sensible

N: Normal

NAD+: Nicotinamida adenina dinucleótido

NADP+: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

ng/ml: Nanogramo por mililitro

nm: Nanómetro

nM: Nanomolar

°C: Grados centígrados

OdDHL: N-(3-oxododecanoyl)-homoserin lactona

ODS: Oxylipin-dependent quorum sensing system

OMF: Factor de membrana externa

ORCC: Outwardly Rectifying Chloride Channel

p/v: Peso por volumen

PBP: Penicillin binding protein

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDC: *Pseudomonas* derived cephalosporinase

PDE: Fosfodiesterasa

PDR: Panresistente

PFA: Paraformaldehído

PFGE: Electroforesis de campo pulsado

pGpG: Fosfatidilglicerol fosfoglicerol

PI3K: Ruta fosfoinositol-3-kinasa

PIP: Piperacilina

PQS: *Pseudomonas* quinolone signal

QS: Quorum sensing

R: Resistente

RND: Resistance-nodulation-division

Rpm: Revoluciones por minuto

RT-qPCR: PCR cuantitativa a tiempo real

S: Sensible

Sec: General secretory pathway

seg: Segundo

SMR: Small multidrug resistance

ST: Secuencia tipo

SVC: Single colony variant

T1SS: Sistema de secreción tipo I

T2SS: Sistema de secreción tipo II

T3SS: Sistema de secreción tipo III

T4SS: Sistema de secreción tipo IV

T5SS: Sistema de secreción tipo V

T6SS: Sistema de secreción tipo VI

T7SS: Sistema de secreción tipo VII

T8SS: Sistema de secreción tipo VIII

T9SS: Sistema de secreción tipo IX
Tat: Twin arginine translocation pathway
TBE: Tris-Borato-EDTA
TC: Tomografía computarizada
TE: Tris-HCl-EDTA
TLR5: Receptor Toll-like 5
TOB: Tobramicina
TPP: Ruta de fosforilación de treonina
TPS: Two-partner secretion
TPTZ: 2,4,6-Tris-s-triazine
TZP: Piperacilina + Tazobactam
U/ μ l: Unidades por microlitro
UFC/ml: Unidades formadoras de colonias por mililitro
UFC: Unidades formadoras de colonias
UV: Ultravioleta
V/cm: Voltios por centímetro
v/v: Volumen por volumen
XDR: Extremadamente resistente

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista, con una gran versatilidad metabólica y habilidad para crecer en distintos nichos. A su vez, es uno de los mayores responsables de infecciones nosocomiales y se caracteriza por su resistencia a antibióticos y su gran arsenal de factores de virulencia.

El objetivo general de esta tesis fue analizar el resistoma y viruloma de aislados de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con fibrosis quística y bronquiectasias del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla en Santander, Cantabria.

Se estudiaron 198 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística (FQ) (123 aislados, 23 pacientes) y bronquiectasia no asociada a fibrosis quística (BNFQ) (75 aislados, 17 pacientes) entre 2007 y 2016. Se estudió la sensibilidad a 15 antibióticos antipseudomonales (AZT, FEP, CAZ, PIP, TZP, IMP, MER, DOR, GEN, TOB, AK, LEV, CIP, COL y FOS), y se observó que colistina fue el más eficaz frente a los aislados de la colección de FQ y amikacina frente a los aislados de la colección de BNFQ. En ambas colecciones predominó el fenotipo MDR. Mediante PFGE y MLST se estableció la relación clonal entre los aislados. Se encontraron 27 pulsotipos y 41 subtipos en la colección de FQ y 16 pulsotipos y 14 subtipos en la colección de BNFQ. Así mismo, ambas colecciones se caracterizaron por su policlonalidad, encontrándose clones de alto riesgo (ST111, ST155, ST175, ST179, ST308, ST446), epidémicos (ST274) e intercontinentales (ST17, ST198, ST252, ST253, ST313, ST455, ST560 y ST569). Se describió por primera vez el ST3449 en 5 cepas aisladas de un mismo paciente.

Mediante WGS se secuenció el genoma completo de 79 aislados, pertenecientes a ambas colecciones y se analizó el resistoma y viruloma de los mismos. Treinta y cuatro de estos aislados fueron resistentes a aminoglucósidos debido a la presencia de enzimas modificadoras, mutaciones en los factores de elongación y a la sobreexpresión de la bomba MexXY-OprM. Los 79 aislados fueron resistentes a betalactámicos, y dicha resistencia fue consecuencia de la hiperproducción de AmpC, a la presencia de PDC y oxacilinasas y a la pérdida de la porina OprD. Las mutaciones en las regiones QRDR, la presencia del gen *crpP* en el cromosoma bacteriano y la sobreexpresión de la bomba MexCD-OprJ explican la resistencia de los 79 aislados a fluoroquinolonas. Treinta y siete cepas fueron resistentes a fosfomicina gracias a mutaciones en el transportador GlpT y a la presencia de la enzima

FosA. No fue posible establecer una relación entre las mutaciones encontradas en los genes que confieren resistencia a colistina con los fenotipos de las cepas resistentes a dicho agente.

Se identificó un amplio rango de genes de virulencia, utilizando el software VirulenceFinder. Los aislados de BNFQ se caracterizaban por tener un mayor número de genes de virulencia que los aislados de FQ. El genotipo *exoS* predominó sobre *exoU*, lo que supone la prevalencia de aislados invasivos frente a citotóxicos. Se corroboró además que las cepas con actividad diolsintasa en presencia de ácido oleico sobreexpresaban el operón PA2077-PA2078, lo cual estaba directamente relacionado con un aumento en la producción de biofilm en *P. aeruginosa*, debido al efecto de las oxilipinas. Se estudió la virulencia de los aislados en el modelo animal *Galleria mellonella*, y se observó que los aislados pertenecientes a los secuenciotipos ST198, ST293, ST1399, ST446, ST3449, ST111 (colección FQ) y ST312, ST313, ST252 y 447 (colección BNFQ) mostraron una alta virulencia este modelo.

Se observó además una alta prevalencia de efectores del sistema de secreción tipo VI (T6SS). Se evidenció que la expresión del T6SS en una selección de aislados en presencia de hierro, cobre, zinc y concentraciones subinhibitorias de gentamicina e imipenem era cepa-dependiente.

INTRODUCCIÓN

1. Aspectos generales e importancia clínica de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gramnegativo que pertenece al género *Pseudomonas* y a la familia *Pseudomonadaceae*. Tiene una longitud de 1-5 μm y un diámetro de 0,5-1 μm , posee un flagelo polar que le permite moverse en medios líquidos y adherirse a las membranas celulares. Además, posee pequeños filamentos, o pili, los cuales utiliza para moverse en medios semisólidos y adherirse a superficies. Es un microorganismo aerobio, aunque en presencia de nitrato y arginina puede crecer en un ambiente anaerobio. Es catalasa y oxidasa positiva, no fermentador, no productor de esporas y con la capacidad de sintetizar pigmentos hidrosolubles como pioverdina, piocianina, piorrubina y piomelanina (1).

P. aeruginosa tiene la capacidad de utilizar más de 100 moléculas inorgánicas como fuente de carbono y energía. Su temperatura óptima de crecimiento es 37°C, sin embargo, puede crecer en un rango de temperaturas de 4-42°C, lo que le permite estar ampliamente distribuido en la naturaleza, pudiéndose encontrar en el suelo, agua, plantas y animales (1).

A día de hoy las principales cepas utilizadas en los laboratorios como cepas de referencia son PAO1 y PA14. PAO1 se aisló de una herida en los años 50 y en el año 2000 se secuenció su genoma por primera vez (2). Al igual que PAO1, la cepa PA14 es altamente virulenta (3). Tiene origen ambiental aunque también se ha encontrado en heridas provocadas por quemaduras (1). *P. aeruginosa* PA7 es una cepa aislada de una herida por primera vez en Argentina en 1948 (4).

Gracias a los estudios de secuenciación masiva, se ha observado que los aislados de *P. aeruginosa*, se agrupan en tres grandes grupos, el grupo I, el cual incluye la cepa *P. aeruginosa* PAO1, grupo II, que incluye la cepa *P. aeruginosa* PA14 y un tercer grupo minoritario de linajes no relacionados. Más recientemente, estudios de pangenoma han revelado la existencia de dos grupos más, genéticamente distintos a los 3 anteriores, y cuya correlación entre aislados clínicos y ambientales aún debe ser determinada (1,5).

P. aeruginosa se comporta como un patógeno nosocomial oportunista, cuyos mínimos requerimientos nutricionales, su tolerancia a una amplia variedad de condiciones físicas y su resistencia intrínseca a un gran número de antibióticos, explican su importancia a nivel clínico (1,6). En la mayoría de los casos la infección comienza con alguna alteración de los mecanismos de defensa

del huésped, como puede ser la disrupción en la integridad de barreras físicas como catéteres urinarios e intravenosos, quemaduras extensas en la piel o tubos endotraqueales que facilitan la colonización bacteriana. Así mismo la neutropenia, inmunosupresión y patologías como el cáncer, desnutrición o diabetes, son condiciones que deterioran el sistema inmune del paciente y favorecen las infecciones (6). Por esto, la estancia prolongada en el hospital, especialmente en unidades de cuidados intensivos, y la presión de selección de antibióticos son factores que favorecen la aparición de cepas multirresistentes, convirtiendo las infecciones por *P. aeruginosa* en un verdadero problema de salud pública (7).

P. aeruginosa puede afectar a pacientes con quemaduras, causando una bacteriemia que puede complicarse y llegar a ser mortal, y a pacientes con heridas profundas, originando fístulas, celulitis y osteomielitis. En raras ocasiones puede causar endocarditis bacteriana aguda por la contaminación de prótesis valvulares en pacientes que hayan tenido cirugías cardíacas abiertas. Además, es un frecuente contaminante de los líquidos de limpieza de los lentes de contacto, por lo que se le atribuyen infecciones oculares manifestadas como úlceras de la córnea. *P. aeruginosa* es una causa frecuente de infecciones urinarias intrahospitalarias, colonizando el tracto urinario de pacientes con catéteres (7,8).

P. aeruginosa afecta gravemente a las vías aéreas. Es la principal causa de neumonía asociada a ventilación mecánica y de infecciones pulmonares crónicas, afectando principalmente a pacientes con fibrosis quística (1,6,7).

2. Bronquiectasias y fibrosis quística

Cuando hay una infección aguda por *P. aeruginosa* y esta no es eliminada por completo, la bacteria se adapta al ambiente pulmonar, crece formando biopelículas (biofilm) y causa una infección crónica. Las infecciones pulmonares crónicas afectan sobre todo a personas con bronquiectasias y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (7).

2.1. Bronquiectasias

Las bronquiectasias son la dilatación irreversible de los bronquios causada por una inflamación e infección respiratoria crónica. Aunque en algunos casos esta afección tiene causas desconocidas, la fibrosis quística, los trastornos inmunitarios y las infecciones reincidentes son sus principales causas (9).

Los síntomas comienzan lentamente y empeoran gradualmente con el paso de los años. La tos crónica productora de esputo espeso y a menudo purulento, es el síntoma más común de este trastorno. Los pacientes presentan también disnea, sibilancias y dolor torácico, y, en casos avanzados, hipoxemia e insuficiencia cardíaca. A menudo se presentan exacerbaciones por la presencia de fiebre, un agravamiento de la tos, aumento de la disnea y volumen y purulencia del esputo (9).

La enfermedad se diagnostica mediante anamnesis, examen físico y estudios radiológicos.



Figura 1. Imágenes para el diagnóstico de las bronquiectasias. a) Tomografía computarizada (TC). Los hallazgos de la TC incluyen la dilatación de las vías respiratorias y el signo del anillo de sello en el que una vía respiratoria engrosada y dilatada aparece adyacente a una arteria más pequeña en la vista transaxial. b) Radiografía. Los hallazgos radiológicos incluyen el engrosamiento de las paredes de las vías respiratorias y/o la dilatación de las vías aéreas (9).

Según las zonas pulmonares afectadas, las bronquiectasias pueden ser de carácter focal o difuso (9):

- La **bronquiectasia focal** afecta una o dos áreas pulmonares y es el resultado de neumonías sin tratar o de una obstrucción.
- La **bronquiectasia difusa** afecta muchas áreas pulmonares. Se desarrolla con mayor frecuencia en pacientes con defectos genéticos, inmunológicos o anatómicos. En un principio aparenta ser de carácter idiopático debido a la lentitud en su aparición, lo que dificulta el rápido diagnóstico del problema desencadenante. Las deficiencias inmunológicas como la inmunodeficiencia común variable (IDCV) y la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), la desnutrición, tuberculosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma y los defectos congénitos en el mecanismo de limpieza mucociliar pueden causar esta enfermedad. Un 20% de los casos de fibrosis quística asociados a este trastorno son de carácter idiopático, que a menudo se complican por la colonización por *P. aeruginosa* o *S. aureus* representando un grave riesgo para la salud del paciente.

2.2. Fibrosis quística

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética de transmisión autosómica recesiva que afecta en mayor medida a la población caucásica. Está causada por mutaciones en el cromosoma 7 del gen regulador de la conductancia transmembrana, *cftr*, que codifica la proteína CFTR. Esta proteína está presente en varios órganos, incluyendo los tractos respiratorio e intestinal, el hígado, el páncreas y el aparato reproductor masculino y se encarga de regular otros canales, como el canal de cloro ORCC (Outwardly Rectifying Chloride Channel), el canal de sodio epitelial (ENaC) y los canales de potasio ROMK1 y ROMK2. También interviene en el transporte de ATP y en la regulación del pH de los orgánulos intracelulares. Hasta la fecha se han descrito más de 2000 mutaciones, de las cuales 127 se confirman como causantes de la enfermedad (10,11).

El mal funcionamiento o la ausencia de CFTR en las vías aéreas reduce el volumen de líquido en la superficie de las mismas, originando la secreción de moco anormalmente espeso, lo que disminuye el aclaramiento mucociliar de los patógenos bacterianos, causando infecciones crónicas e

inflamación descontrolada. Estas infecciones conllevan al desgaste pulmonar progresivo que termina provocando un fallo respiratorio (10,12).

Los pacientes con FQ presentan infecciones recurrentes a lo largo de su vida y la composición de su microbiota pulmonar cambia con la edad. De esta forma, microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* son aislados de niños pequeños y predisponen a los pulmones a ser infectados por microorganismos más problemáticos como *P. aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia* complex y *S. aureus* resistentes a la meticilina (en inglés, MRSA), los cuales se aíslan de niños mayores y adultos (Figura 2). Aunque estas bacterias se consideran como los patógenos habituales, otros como micobacterias, hongos y virus han comenzado a ser reconocidos entre los pacientes con FQ (10,12,13).

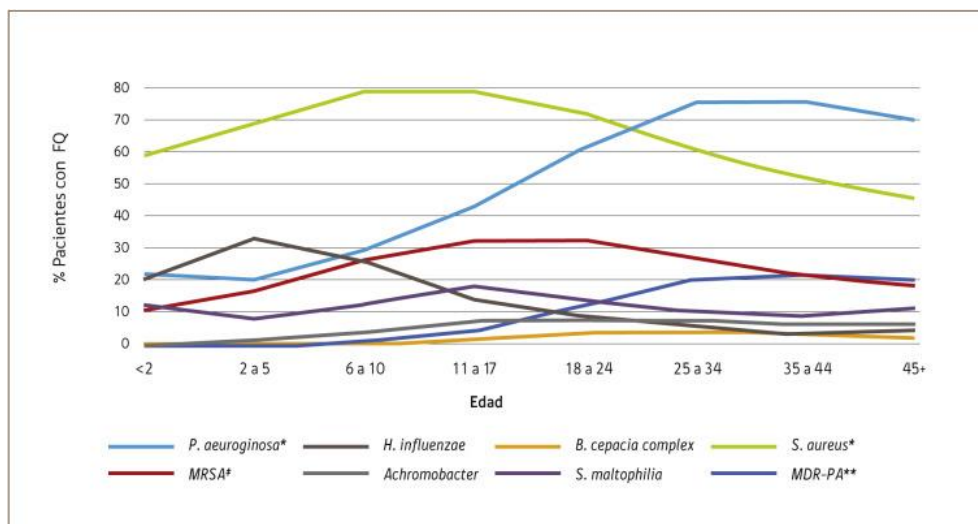


Figura 2. Prevalencia de patógenos respiratorios en pacientes con FQ (11).

2.2.1. Infecciones bacterianas en pacientes con FQ

S. aureus es el microorganismo prevalente en niños entre 11 y 17 años. Sus factores de virulencia incluyen la leucocidina de Pantón-Valentine, que se asocia a la neumonía hemorrágica necrotizante y las variantes de colonia pequeña (en inglés, SCV) y la formación de biofilm contribuyen a un aumento en la resistencia a los antibióticos. Las infecciones por MRSA se dan en adultos jóvenes y se asocian a pronósticos mucho más graves que incluyen un deterioro pulmonar muy rápido, aumentando los tiempos de hospitalización y la mortalidad del paciente (12).

Las infecciones por *P. aeruginosa* en pacientes menores de 18 años han disminuido con el tiempo (de un 47% de positivos en 1997 a un 27,5% en 2017), probablemente debido al pronto tratamiento con antibióticos para erradicar infecciones reincidentes. Sin embargo, en 2017 un 44,6% de individuos con FQ presentaron infecciones por este patógeno. Las infecciones por *P. aeruginosa* se adquieren, inicialmente, de fuentes ambientales y una vez que la bacteria se establece en las vías respiratorias comienza una serie de cambios que le permiten adaptarse al ambiente pulmonar. Las infecciones crónicas por este patógeno suponen un riesgo para el paciente por su fenotipo mucóide y su elevada resistencia a los antibióticos, lo que acelera el daño pulmonar y acelera el fallo respiratorio que conlleva a la muerte del paciente (10,12,14).

Dentro del complejo *Burkholderia cenocepacia* (Bcc) se incluyen más de 20 especies que pueden ser adquiridas tanto de fuentes ambientales como por transmisión entre personas y son resistentes a diferentes clases de antibióticos incluyendo aminoglucósidos y betalactámicos. En un principio *Burkholderia cenocepacia* fue descrita como la bacteria predominante dentro del Bcc en pacientes con FQ, sin embargo, *Burkholderia multivorans* comienza a ser cada vez más común. Las infecciones por ambos patógenos dan lugar a pronósticos graves que derivan en neumonía necrotizante, sepsis y muerte (11,12).

La prevalencia de *Stenotrophomonas maltophilia* en pacientes con FQ varía entre 12% y 30%. Aunque es una bacteria comúnmente aislada de pacientes, las infecciones iniciales son más comunes por adquisición ambiental que por transmisión entre personas. En estudios previos se ha visto que los pacientes infectados por *S. maltophilia* son de edad avanzada y con baja función pulmonar y aquellos con infecciones crónicas tienen tres veces más probabilidades de necesitar un trasplante pulmonar o de morir (12).

Las infecciones por *Achromobacter* se dan entre el 3% y 30% de los casos, siendo las provocadas por *Achromobacter xylosoxidans* las más frecuentes y se adquieren tanto por fuentes ambientales como por transmisión entre personas. Las infecciones crónicas por esta bacteria doblan las probabilidades de necesitar un trasplante pulmonar o morir. Además, los riesgos y el mal pronóstico son mayores en pacientes de edad avanzada y en aquellos con infecciones por *P. aeruginosa* (12).

2.2.2. Metales traza como biomarcadores inflamatorios

Los metales traza son factores importantes en procesos enzimáticos tanto humanos como bacterianos, sin embargo, su concentración debe regularse rigurosamente para prevenir niveles tóxicos. En los esputos de pacientes con FQ, BNFQ y bronquitis crónicas se han encontrado niveles elevados de metales como hierro, cobre y zinc, lo que sugiere que la presencia de estos influye en la gravedad de la enfermedad (15).

Hay un interés especial por la presencia de hierro en los pulmones de pacientes con FQ, pues se considera un factor de riesgo pulmonar dada su capacidad de generar radicales hidroxilo tóxicos y estrés oxidativo. Así mismo, interviene en el comportamiento de *P. aeruginosa*, induciendo la formación de biofilm. Por este motivo, una de las estrategias terapéuticas más novedosas para tratar las infecciones crónicas por *P. aeruginosa* es la regulación de los niveles de hierro (15).

En condiciones de déficit de zinc la inflamación de las vías respiratorias y la susceptibilidad al estrés oxidativo aumentan. Sin embargo, las metaloproteínas, como ADAM33, contribuyen a la remodelación de las vías respiratorias. Del mismo modo, se ha demostrado que el zinc reactiva el transporte de cloro mediante la activación de los canales de cloro dependientes de calcio (15). En *P. aeruginosa* la captación de zinc y cobre están reguladas por los sistemas de dos componentes CzcRS y CopRS, los cuales inducen la expresión del sistema de expulsión CzcCBA. A su vez, CzcRS y CopRS reprimen la expresión de OprD, induciendo la resistencia a imipenem (15,16). En conclusión, el efecto del zinc en el pronóstico de la enfermedad crea controversia y es aún incierto, pues por una parte tiene propiedades antiinflamatorias y por otra promueve la resistencia a antibióticos (15).

Por lo general, el magnesio se considera antiinflamatorio, pero estudios en modelos animales han demostrado que su capacidad de inhibir la fagocitosis y alterar la capacidad oxidativa de los neutrófilos promueve la infección crónica. Desde un punto de vista bacteriano y, a diferencia de lo que los estudios *in vitro* han demostrado, se sugiere que el magnesio podría inhibir la formación de biofilm nuevo por parte de *P. aeruginosa*, pero a su vez proteger al ya existente (15).

El calcio también ha sido encontrado en altas concentraciones en el esputo de pacientes con FQ y BNFQ. Su presencia desempeña un papel importante en el aumento del grosor del biofilm y la sobreexpresión de factores de virulencia (15).

2.2.3. Diversidad y adaptación de *P. aeruginosa* durante el proceso de infección

El pulmón de los pacientes con FQ es un ambiente heterogéneo, hostil y estresante al cual *P. aeruginosa* debe adaptarse para persistir y sobrevivir. Los factores de estrés en el pulmón de pacientes con FQ son el estrés osmótico debido al moco viscoso, estrés oxidativo y nitrosativo debido a respuestas inmunes del paciente, tratamiento antibiótico y la presencia de otros microorganismos (17).

La persistencia de *P. aeruginosa* en las vías aéreas de los pacientes con FQ está asociada a una función pulmonar pobre y una alta tasa de mortalidad. A pesar de la respuesta inmune del paciente y de los tratamientos con antibióticos, *P. aeruginosa* persiste en los pulmones de los pacientes con FQ gracias a la plasticidad de su genoma, lo que le permite adaptarse con rapidez al ambiente pulmonar. Durante el desarrollo de la infección en pacientes con FQ *P. aeruginosa* pasa de ser un patógeno ambiental característico de infecciones agudas a ser un patógeno adaptado, característico de infecciones crónicas (17).

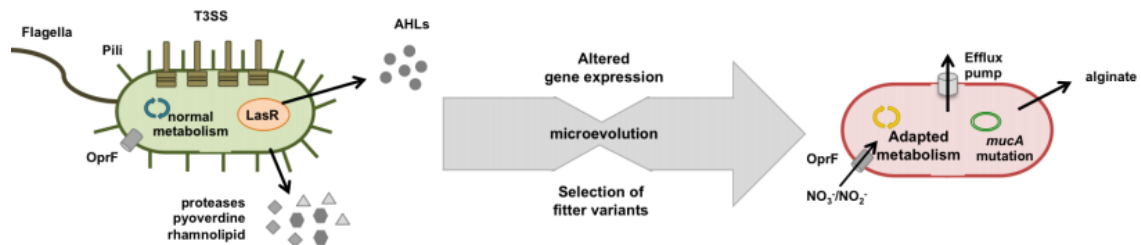


Figura 3. Evolución de la infección aguda a la infección crónica (18).

En la fase temprana de la infección *P. aeruginosa* posee un alto potencial de virulencia y citotoxicidad y una baja frecuencia de mutación. Durante esta fase *P. aeruginosa* presenta sensibilidad a antibióticos, produce piovérdina, hemolisina y fosfolipasa C, rhamnolípidos que la protegen de la respuesta inmune del paciente, proteasas que promueven el fenotipo mucoso, son móviles gracias a la presencia de pili y flagelos, y expresa factores de virulencia del sistema de secreción tipo III, del cual se hablará con más detalle más adelante. Es posible erradicar a este patógeno durante esta fase con tratamiento antibiótico siempre y cuando el tratamiento empiece lo antes posible, sin embargo, una vez que se ha alcanzado el fenotipo mucoso, su erradicación es

prácticamente imposible y se produce una recolonización de las vías aéreas, llegando así a la infección crónica. Durante esta etapa, *P. aeruginosa* está adaptada al ambiente pulmonar, se produce una alteración en su morfología colonial cambiando a un fenotipo mucoide producido por un exceso de alginato. El fenotipo mucoide se debe a mutaciones en el gen *mucA* que codifica una proteína de membrana que limita la expresión del operón *algD*, necesario para la síntesis de alginato. Por tanto, la inactivación de *mucA* implica una sobreproducción de alginato. La adaptación de *P. aeruginosa* trae consigo la formación de SCV (small colony variant), las cuales tienen una alta capacidad de formación de biofilm ya que tienen una movilidad reducida y sobreexpresan los loci de *pel* y *psl*, codificantes de los exopolisacáridos Pel y Psl. Durante la fase crónica de infección *P. aeruginosa* disminuye la expresión de factores de virulencia, modula sus rutas metabólicas y adquiere resistencia frente a los antibióticos (17,18).

El quorum sensing (QS) es utilizado por las bacterias para comunicarse mediante señales químicas. El QS controla el comportamiento de las bacterias y les permite regular procesos biológicos que les permiten adaptarse y sobrevivir. Básicamente este fenómeno consiste en la regulación de la expresión de genes específicos en respuesta a la señal de un auto inductor. Durante la patogénesis el QS de *P. aeruginosa* juega un papel importante coordinando la supervivencia con los cambios fenotípicos. El paso de infección aguda a crónica está influenciado por los genes regulados por el QS. Estos genes están involucrados en la producción de factores de virulencia, movilidad, producción de biofilm, mecanismos de resistencia a antibióticos y el ajuste de rutas metabólicas como respuesta al estrés. La ruta del QS se activa en condiciones de hipoxia. La hipoxia es influenciada por diversos factores de virulencia como la reducción de la ventilación debida a las capas viscosas, inflamación crónica, poblaciones de otros microorganismos y formación de biofilm. Sin embargo, *P. aeruginosa* puede sobrevivir y crecer bajo estas condiciones (17–19).

La movilidad de *P. aeruginosa* implica un fenotipo más virulento. Una célula con movilidad es más fácilmente reconocible por el sistema inmune del hospedador, activando la respuesta inmune inflamatoria y fagocitosis por macrófagos. El cambio a un estado sésil, debido a la pérdida del flagelo y pili, junto a una menor virulencia es una ventaja con la que *P. aeruginosa* evade el estrés y las condiciones adversas. Gracias a la pérdida de la movilidad, *P. aeruginosa* se adhiere a superficies formando agregados celulares o microcolonias recubiertas de sustancias poliméricas extracelulares que protegen a la bacteria del ambiente que le rodea. Estas estructuras, denominadas biofilm, le dan

la capacidad de persistencia frente a fagocitosis, estrés oxidativo, hipoxia, falta de nutrientes, gasto metabólico, competición interbacteriana y agentes antimicrobianos (17–19).

3. Resistencia a los antibióticos

Las enfermedades infecciosas son una de las causas principales de muerte en la humanidad. Proviene tanto de fuentes exógenas como endógenas, y se transmiten por contacto directo o indirecto entre pacientes, personal sanitario, material contaminado, e incluso agentes ambientales (20). Hasta la cuarta década del siglo XX la mortalidad por enfermedades infecciosas, como la fiebre puerperal o la neumonía, era predominante. El descubrimiento y uso de las sulfamidas (1935) y de la penicilina (1940) representaron un progreso crucial que permitió combatir dichas enfermedades (21). En aquel entonces los antibióticos eran considerados como una droga maravillosa que atacaba de manera selectiva a los microorganismos causantes de la enfermedad sin afectar al hospedador. Desde ese momento comenzaron a incorporarse otras familias de antimicrobianos a la práctica clínica (Figura 4) (20,22).

Durante su discurso de recepción del Premio Nobel, Alexander Fleming advirtió la aparición de mutantes resistentes como resultado de la exposición a la penicilina en el laboratorio. Sin embargo, sus advertencias fueron ignoradas. Por ello, durante 70 años se produjeron de forma masiva más de 25 familias de antibióticos creándose una falsa confianza en lo inagotable de la terapia antibiótica. El aumento de la demanda por parte de varios sectores y su uso irresponsable ha contribuido a la aparición de cepas resistentes a los mismos. Desafortunadamente, hoy en día, todavía predomina una fe ciega en los antibióticos, tanto por parte de profesionales de la salud como de los pacientes (21,22). La creciente resistencia a los antimicrobianos es un problema, que de no combatirse a tiempo puede comprometer el futuro de la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo y la economía de los países. Los microorganismos resistentes han aumentado dramática y exponencialmente en las últimas décadas como consecuencia del uso y abuso de antibióticos. La situación es tal que las enterobacterias productoras de carbapenemasas resistentes a todos los betalactámicos y a otras familias de antibióticos causan infecciones graves en pacientes inmunocomprometidos, prolongando las hospitalizaciones y aumentando las tasas de mortalidad entre un 24% y 70% (21).

La resistencia a los antibióticos se reconoció poco tiempo después de que estos comenzaran a utilizarse en la clínica. Las técnicas de antibiograma permiten definir la concentración mínima inhibitoria (CMI), definida como la cantidad de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento in vitro de 10^5 bacterias/ml en condiciones estandarizadas (23). Los comités del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) y EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing) establecieron los puntos de corte que definen los criterios de interpretación de la sensibilidad a los antibióticos. A lo largo de los años la CMI ha variado. En general, los valores de CMI₉₀ son mayores en la actualidad que en el momento en que se descubrió el antibiótico considerado (23).

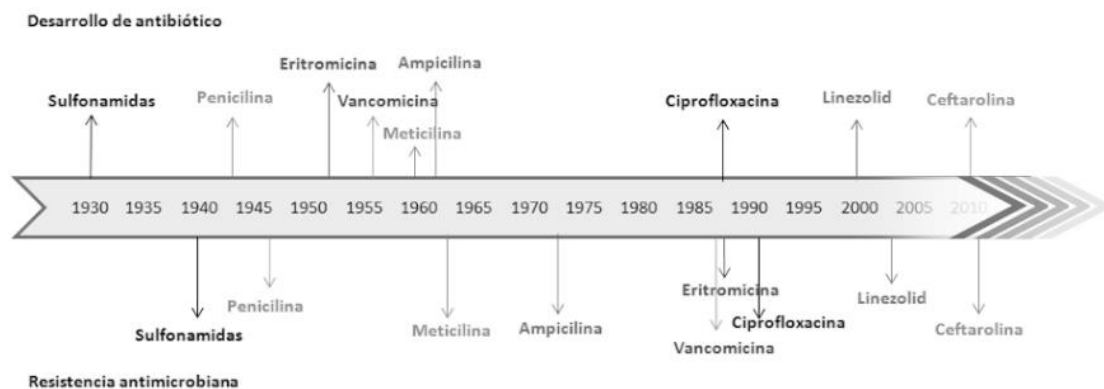


Figura 4. Desarrollo de antibióticos y aparición de resistencia (21).

En la actualidad tanto el CLSI como el EUCAST establecen puntos de corte clínicos basándose en aspectos microbiológicos, en parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos y en resultados clínicos. Para el EUCAST la categoría resistente se define como un valor “mayor de” mientras que el CLSI lo define como un “mayor o igual a”. Aunque el EUCAST no refiere de forma individualizada la categoría de sensibilidad intermedia, esta existe y se refiere a la zonas comprendidas entre los puntos de corte de sensible y resistente. Además, el EUCAST aporta puntos de corte epidemiológicos, o ECOFF, que a diferencia del CLSI, clasifica al microorganismo en función de si presenta o no algún mecanismo de resistencia adquirida para un mayor número de combinaciones microorganismo-antimicrobiano. A día de hoy, el EUCAST está aceptado como el comité de puntos de corte de la EMA (European Medicines Agency) y del ECDC (European Centre for Diseases Prevention and Control). Así mismo, el COESANT (Comité Español del Antibiograma) tiene como prioridad promover la implementación de la normativa del EUCAST en los Servicios y Unidades de Microbiología Clínica en

España, mismo objetivo que se plantea en el Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN). En estos momentos, en torno a 50 – 65% de los servicios de microbiología en España ya han implementado la normativa del EUCAST como referencia única o complementada con algunos criterio del CLSI (24).

A medida que la resistencia a los antibióticos era un problema que avanzaba, fue necesario estandarizar definiciones mediante las cuales las bacterias se clasificaban según su resistencia a los antimicrobianos, obteniendo unos datos epidemiológicos fiables que permitan entender con claridad el impacto sobre la salud pública (25):

- Se definen como **MDR** (multirresistentes, de las siglas en inglés de multidrug-resistant) aquellos microorganismos resistentes al menos a un antibiótico dentro de 3 o más categorías antimicrobianas.
- Se definen como **XDR** (extremadamente resistentes, de las siglas en inglés de extensively-drug resistant) aquellos microorganismos resistentes a al menos un antibiótico en todas excepto en dos o menos categorías antimicrobianas.
- Se definen como **PDR** (pan-resistentes, de las siglas en inglés de pandrug-resistant) aquellos microorganismos resistentes a todos los antibióticos de todas las categorías antimicrobianas.

Aquellos microorganismos cuya resistencia no se ajustaba a ninguno de los perfiles descritos anteriormente se clasificaron en dos categorías (26):

- Se definen como **multiS** (sensibles, de las siglas en inglés de multisusceptible) aquellos microorganismos sensibles a todos los antibióticos de todas las categorías antimicrobianas.
- Se definen como **modR** (moderadamente resistentes, de las siglas en inglés de moderately-resistant) aquellos microorganismos resistentes a al menos un antibiótico de 1 o 2 categorías antimicrobianas.

Tabla 1. Antibióticos y categorías antimicrobianas. Adaptada de (25)

Categoría antimicrobiana	Antibiótico
Ácido fusídico	Ácido fusídico
Ácidos fosfóricos	Fosfomicina
Aminoglucósidos	Gentamicina Tobramicina Amikacina Netilmicina
Ansamicinas	Rifampicina
Carbapenémicos	Imipenem Meropenem Doripenem Ertapenem
Cefalosporinas	Ceftazidima Cefepime Ceftriaxona Cefotaxima Ceftarolina Cefazolina Cefuroxima
Cefamicinas	Cefoxitina Cefotetan
Estreptograminas	Quinupristina-dalfopristina
Estreptomicina	Estreptomicina
Fenicoles	Cloranfenicol
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino Levofloxacino Moxifloxacino
Glicilciclinas	Tigecilina
Glicopéptidos	Vancomicina Teicoplanina

Categoría antimicrobiana	Antibiótico
	Telavancina
Lincosamidas	Clindamicina
Lipopéptidos	Daptomicina
Macrólidos	Eritromicina
Monobactámicos	Aztreonam
Oxazolidinonas	Linezolid
Penicilinas	Ampicilina
Penicilinas + Inhibidores de betalactamasas	Piperacilina-tazobactam Amoxicilina-ácido clavulánico Ticarcilina-ácido clavulánico Ampicilina-Sulbactam
Polimixinas	Colistina Polimixina B
Sulfonamidas	Cotrimoxazol
Tetraciclinas	Tetraciclina Doxiciclina Minociclina

A raíz de esto, la Sociedad Americana de Enfermedades infecciosas comenzó a referirse a aquellos patógenos causantes de infecciones nosocomiales como patógenos ESKAPE. Bajo este acrónimo se recogen las seis especies bacterianas de mayor importancia clínica debido a su nivel de resistencia antimicrobiana: *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter* spp. (20,27).

En 2017 la OMS publicó una lista con las bacterias prioritarias en la búsqueda de nuevos antibióticos para combatirlos. A sí mismo, la lista se dividió en 3 categorías de prioridad (crítica, elevada y media). La categoría crítica la encabeza *A. baumannii*, seguida de *P. aeruginosa* (21,28).

3.1.Mecanismo de acción de los antibióticos en gramnegativos

En las bacterias gramnegativas la diana de los antibióticos es la envoltura externa. Esta membrana es una bicapa lipídica que contiene un lipopolisacárido y desempeña un papel importante

de barrera frente a determinados antibióticos. En esta membrana existen unas proteínas entre las cuales se encuentran las porinas, que son proteínas triméricas o monoméricas que forman conductos o poros hidrófilos que permiten el acceso al peptidoglicano. A través de estos poros difunden de forma pasiva pequeñas moléculas hidrofílicas, pero se impide el paso de otras mayores. Por el contrario, los antibióticos más lipofílicos se difunden a través de la bicapa lipídica y algunos utilizan un mecanismo de transporte con gasto de energía. Una vez dentro del microorganismo los antibióticos deben evitar ser hidrolizados o inactivados y reconocer de forma efectiva una diana antes de que algún sistema de expulsión lo lance de nuevo fuera de la bacteria (20).

Los antibióticos de uso clínico ejercen su función inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, alterando la integridad de la membrana citoplásmica, impidiendo la síntesis proteica o bloqueando la síntesis o las funciones de ácidos nucleicos. En función de su efecto antibacteriano, los antibióticos pueden ser bacteriostáticos, cuando solo inhiben transitoriamente el crecimiento, o bactericidas, cuando ejercen una acción letal para la bacteria (29).

❖ Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana

La síntesis de la pared celular se desarrolla en 3 etapas: la fase citoplasmática, en la que se sintetizan los precursores del peptidoglicano, el transporte de estos precursores a través de la membrana citoplasmática y la organización final de la estructura del peptidoglicano. En la síntesis del peptidoglicano intervienen las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), las cuales tienen actividad transpeptidasa, transglucosilasa y carboxipeptidasa. Las bacterias poseen varias PBP, las cuales tienen funciones distintas. Las PBP-1a y PBP-1b actúan como transpeptidasas causantes de la elongación. La PBP-2 determina la forma bacteriana. La PBP-3 interviene en la división bacteriana. Las PBP-4, PBP-5 y PBP-6 tienen función carboxipeptidasa y son responsables de la liberación del quinto aminoácido del pentapéptido necesario para terminar la síntesis del peptidoglicano. A su vez, las bacterias poseen un sistema activación de enzimas líticas, o autolisinas, mediante las cuales el peptidoglicano se degrada cuando es necesario. El peptidoglicano está en continua renovación gracias a un equilibrio entre los procesos de síntesis e hidrólisis (29).

La **fosfomicina** es un compuesto bactericida que impide la síntesis de la pared inhibiendo la enzima *MurA*. Esta enzima cataliza la primera etapa de la biosíntesis del heteropolímero del

peptidoglicano previa a la incorporación del fosfoenolpiruvato a la uridin-N-acetilglucosamina para originar el ácido uridin-difosfo-N-acetilmurámico (29,30).

Por otra parte, los **betalactámicos** son compuestos bactericidas que actúan sobre la fase final de la síntesis del peptidoglicano. Representan el grupo más numeroso y de mayor uso en la clínica. Abarcan los monobactámicos (Aztreonam), cefalosporinas (por ejemplo, ceftazidima y cefepime), penicilinas (Piperacilina) y carbapenémicos (por ejemplo, imipenem, meropenem y doripenem). Los betalactámicos rompen el equilibrio entre los procesos de síntesis e hidrólisis mediante el bloqueo de las PBP y la activación de autolisinas (29).

❖ Alteración de la membrana citoplasmática

La membrana citoplasmática interviene en los procesos de difusión y transporte activo, controlando así la composición del medio interno celular. Su alteración implica cambios en la permeabilidad que alteran el metabolismo bacteriano (29).

Las **polimixinas**, como polimixina B y colistina, son compuestos bactericidas, polipeptídicos, cíclicos y policatiónicos. Tienen una parte hidrofílica cargada positivamente y un extremo lipofílico. El péptido se une a la superficie de la membrana, la cual tiene carga negativa y el extremo lipofílico se une a los fosfolípidos de la membrana. Como consecuencia, se produce un desorden de la estructura de la membrana, aumentando su permeabilidad y perdiendo metabolitos esenciales (29).

❖ Inhibición de la síntesis proteica

Los **aminoglucósidos**, como gentamicina, tobramicina y amikacina, actúan sobre la subunidad 30S de los ribosomas. Producen errores en la lectura del ARN mensajero (ARNm), dando como resultado proteínas anómalas que se unen a la membrana y deterioran su integridad, acelerando la difusión de más moléculas de aminoglucósido que terminan bloqueando los ribosomas y deteniendo, de manera irreversible, la síntesis de proteínas. Estos antibióticos poseen un efecto bactericida que depende de su concentración, es decir, la exposición a concentraciones inferiores a la mínima inhibitoria supone un efecto bacteriostático sobre la bacteria (29).

❖ Alteración del metabolismo o estructura de ácidos nucleicos

El genoma bacteriano contiene la información para la síntesis de proteínas, la cual se transmite a través del ARNm, y para la síntesis de ARN ribosómico (ARNr). La información del ADN debe duplicarse en el momento de división bacteriana para ser transmitida a la descendencia. Los procesos de replicación y transcripción se realizan en varias etapas, involucrando enzimas y sustratos que actúan como dianas para la acción de diversos antibióticos (29).

Las **fluoroquinolonas**, como ciprofloxacino y levofloxacino, tienen actividad bactericida y actúan en el ADN cromosómico bacteriano uniéndose a las topoisomerasas e inhibiendo su acción. Las topoisomerasas son enzimas que participan en el proceso de síntesis del ADN. Las dianas de las fluoroquinolonas son las subunidades A y B de la ADN-girasa y las subunidades ParC y ParE de la topoisomerasa IV (29,31).

3.2. Mecanismos de resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa*

La resistencia a los antimicrobianos es un problema multifactorial, con implicaciones microbiológicas, terapéuticas, epidemiológicas y de salud pública. Desafortunadamente, *P. aeruginosa* posee genes intrínsecos que confieren resistencia, independientemente de que se usen o no antibióticos. Aún no se sabe con precisión el papel real de estos genes intrínsecos, pues algunos podrían estar relacionados con procesos metabólicos, de expulsión de sustancias nocivas o de señalización, y estar relacionados con la resistencia de forma indirecta (23).

La resistencia a los antibióticos generalmente se clasifica como intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano. La resistencia adquirida es variable y es adquirida de otras cepas bacterianas. La resistencia adquirida es la que se estudia en el laboratorio, pues es la que conlleva al fracaso terapéutico cuando se utiliza un antibiótico que en principio actúa sobre la bacteria que produce la infección (32). La resistencia de *P. aeruginosa* es el resultado de la combinación de ciertos factores. Su resistencia intrínseca se debe a la baja permeabilidad de su membrana, genéticamente tiene la capacidad de expresar un amplio repertorio de mecanismos de resistencia, tiene la habilidad de volverse resistente mediante la mutación de genes del cromosoma que regulan genes de resistencia y pueden adquirir genes de resistencia adicionales de otros organismos mediante plásmidos, transposones y bacteriófagos (Tabla 2) (33).

Tabla 2. Principales genes y mutaciones involucradas en la resistencia a antibióticos de *P. aeruginosa*. Adaptada de (34)

Gen	Mecanismo de resistencia / Diana alterada	Antibióticos afectados*	Tipo de mutación*	Ejemplos relevantes de mutaciones GOF
<i>gyrA</i>	ADN girasa	FQ	GOF	G ₈₁ D, T ₈₃ A, T ₈₃ L, Y ₈₆ N, D ₈₇ G, D ₈₇ N, D ₈₇ Y, Q ₁₀₆ L
<i>gyrB</i>	ADN girasa	FQ	GOF	S ₄₆₆ F, S ₄₆₆ Y, Q ₄₆₇ R, E ₄₆₈ D
<i>parC</i>	ADN topoisomerasa IV	FQ	GOF	S ₈₇ L, S ₈₇ W
<i>parE</i>	ADN topoisomerasa IV	FQ	GOF	S ₄₅₇ G, S ₄₅₇ T, E ₄₅₉ D, E ₄₅₉ K
<i>pmrA</i>	Lípido A	COL	GOF	L ₁₅₇ Q
<i>pmrB</i>	Lípido A	COL	GOF	L ₁₄ P, A ₅₄ V, R ₇₉ H, R ₁₃₅ Q, A ₂₄₇ T, A ₂₄₈ T, A ₂₄₈ V, R ₂₅₉ H, M ₂₉₂ I, M ₂₉₂ T
<i>phoQ</i>	Lípido A	COL	LOF	
<i>parR</i>	Lípido A	COL		
	Represión de OprD	IMP, MER	GOF	M ₅₉ I, E ₁₅₆ K
	Sobreexpresión de MexEF-OprN	FQ		
Sobreexpresión de MexXY-OprM	FQ, AG, FEP			
<i>parS</i>	Lípido A	COL	GOF	L ₁₄ Q, V ₁₀₁ M, L ₁₃₇ P, A ₁₃₈ T, A ₁₆₈ V, Q ₂₃₂ E, G ₃₆₁ R
	Represión de OprD	IMP, MER		
	Sobreexpresión de MexEF-OprN	FQ		
	Sobreexpresión de MexXY-OprM	FQ, AG, FEP		
<i>cprS</i>	Lípido A	COL	GOF	R ₂₄₁ C
<i>colR</i>	Lípido A	COL	GOF	D ₃₂ N
<i>colS</i>	Lípido A	COL	GOF	A ₁₀₆ V
<i>mexR</i>	Sobreexpresión de MexAB-OprM	FQ, CAZ, FEP,	LOF	
		TZP, MER, CAZ/AVI		
<i>nalC</i>	Sobreexpresión de MexAB-OprM	FQ, CAZ, FEP,	LOF	
		TZP, MER, CAZ/AVI		
<i>nalD</i>	Sobreexpresión de MexAB-OprM	FQ, CAZ, FEP,	LOF	
		TZP, MER, CAZ/AVI		

Gen	Mecanismo de resistencia / Diana alterada	Antibióticos afectados*	Tipo de mutación*	Ejemplos relevantes de mutaciones GOF
<i>nfxB</i>	Sobreexpresión de MexCD-OprJ	FQ, FEP	LOF	
<i>mexS</i>	Sobreexpresión de MexEF-OprN Represión de OprD	FQ IMP, MER	LOF	
<i>mexT</i>	Sobreexpresión de MexEF-OprN Represión de OprD	FQ IMP, MER	GOF	G ₂₅₇ S, G ₂₅₇ A
<i>cmrA</i>	Sobreexpresión de MexEF-OprN	MER, FQ	GOF	A ₆₈ V, L ₈₉ Q, H ₂₀₄ L, N ₂₁₄ K
<i>mvaT</i>	Sobreexpresión de MexEF-OprN	FQ	LOF	
PA3271	Sobreexpresión de MexEF-OprN	FQ	LOF	
<i>mexZ</i>	Sobreexpresión de MexXY-OprM	FQ, AG, FEP	LOF	
PA5471.1	Sobreexpresión de MexXY-OprM	FQ, AG, FEP	LOF	
<i>amgS</i>	Sobreexpresión de MexXY-OprM	FQ, AG, FEP	GOF	V ₁₂₁ G, R ₁₈₂ C
<i>oprD</i>	Inactivación de OprD	IMP, MER	LOF	
<i>ampC</i>	Modificación de la estructura de AmpC	CAZ/AVI, C/T	GOF	T ₉₆ I, G ₁₈₃ D, E ₂₄₇ K
<i>ampD</i>	Sobreexpresión de AmpC	CAZ, FEP, TZP	LOF	
<i>ampDh2</i>	Sobreexpresión de AmpC	CAZ, FEP, TZP	LOF	
<i>ampDh3</i>	Sobreexpresión de AmpC	CAZ, FEP, TZP	LOF	
<i>ampR</i>	Sobreexpresión de AmpC	CAZ, FEP, TZP	GOF	D ₁₃₅ N, G ₁₅₄ R
<i>dacB</i>	Sobreexpresión de AmpC	CAZ, FEP, TZP	LOF	
<i>ftsI</i>	<i>Penicillin binding-protein 3</i> (PBP3)	CAZ, FEP, TZP, MER, CAZ/AVI, C/T	GOF	R ₅₀₄ C, R ₅₀₄ H, P ₅₂₇ T, F ₅₃₃ L I ₆₁ M, V ₉₃ A, E ₁₀₀ G, K ₅₀₄ E, Y ₅₅₂ C, P ₅₅₄ L, A ₅₅₅ E, N ₅₉₂ I, P ₆₁₈ L, T ₆₇₁ A, T ₆₇₁ I
<i>fusA1</i>	Factor de elongación G	AG	GOF	
<i>glpT</i>	Proteína de transporte GlpT	FOS	LOF	
<i>rpoB</i>	Cadena β de ARN polimerasa	RIF	GOF	S ₅₁₇ F, Q ₅₁₈ R, Q ₅₁₈ L, D ₅₂₁ G, H ₅₃₁ Y, H ₅₃₁ L, S ₅₃₆ F, L ₅₃₈ I, S ₅₇₉ F, S ₅₇₉ Y, N ₆₂₉ S, D ₆₃₆ Y

*FQ: Fluoroquinolonas, COL: Colistina, IMP: Imipenem, MER: Meropenem, AG: Aminoglucósidos, FEP: Cefepime, CAZ: Ceftazidima, CAZ/AVI: Ceftazidima + Avibactam, TZP: Piperacilina + Tazobactam, C/T: Ceftolozano + Tazobactam, FOS: Fosfomicina, RIF: Rifampicina, GOF: Gain of function, LOF: Loss of function

P. aeruginosa tiene la capacidad de crecer en una gran variedad de sustratos y alterar sus propiedades en respuesta a los cambios ambientales. Tiene un genoma de aproximadamente 6,26 Mbp que codifican 5567 genes, mientras que otros microorganismos como *Escherichia coli* K12, *S. aureus* N315 y *H. influenzae* Rd tienen unos genomas de entre 2 y 5 Mbp. Este hecho explica su elevada capacidad de adaptación, que incluye la habilidad de desarrollar resistencia frente a los antibióticos (33).

La absorción limitada y expulsión de los antibióticos fuera de la bacteria, la inactivación de estos y cambios en las dianas de los antibióticos son los tres mecanismos principales que utiliza *P. aeruginosa* para resistir a la acción de los antimicrobianos (33).

3.2.1. Alteraciones de la permeabilidad de la membrana

La resistencia innata de *P. aeruginosa* a aminoglucósidos, fluoroquinolonas, betalactámicos y polimixinas se debe a la baja permeabilidad de la membrana bacteriana. El fallo de los antibióticos es el resultado de la combinación de esa impermeabilidad que dificulta la entrada de estos y la expulsión, mediante bombas de eflujo, de aquellos que consiguen entrar (33). La entrada de los antibióticos a través de la membrana externa tiene lugar a través del lipopolisacárido o a través de las porinas (Figura 5) (23,33).

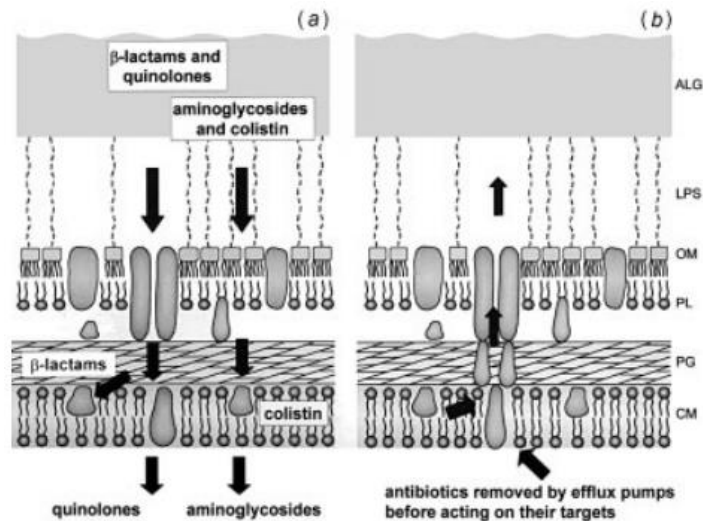


Figura 5. Representación esquemática de la disposición de los componentes en la membrana de *P. aeruginosa*. a) Entrada de betalactámicos y fluoroquinolonas a través de porinas en la membrana externa, y aminoglucósidos y colistina interactuando con el lipopolisacárido de la membrana externa. b) Expulsión de los antibióticos fuera de la bacteria, mediante bombas de eflujo, antes de actuar sobre su diana (33). CM: Membrana citoplasmática, OM: Membrana externa, PL: Peptidoglicano, LPS: Lipopolisacárido, ALG: Alginato

❖ El biofilm como barrera de entrada

En pacientes con FQ es muy común la formación de biofilm de las bacterias que colonizan el aparato respiratorio. Se ha demostrado que el biofilm tiene una alta persistencia una vez establecidas las infecciones y por tanto son responsables de muchos procesos infecciosos crónicos (33,35).

La matriz extracelular del biofilm actúa como una barrera física, retrasando el tiempo de incorporación del fármaco, facilitando así la adaptación bacteriana al antibiótico. La asociación de una barrera que reduce la velocidad de difusión del fármaco y la presencia de otros elementos como enzimas hidrolizantes pueden actuar sinérgicamente, especialmente si estas enzimas se degradan más rápido que lo que se difunden los antibióticos (35). En la matriz se albergan componentes con carga negativa que repelen a antibióticos con carga positiva, como los aminoglucósidos, y enzimas betalactamasas que destruyen la integridad de los antibióticos betalactámicos (35).

Muchos antibióticos, como los betalactámicos, son más eficaces en bacterias metabólicamente activas y en fase de crecimiento. El biofilm genera un ambiente bajo en pH y oxígeno y alto en CO₂ y falta de nutrientes, impidiendo la acción de los antibióticos (35).

Finalmente, los sistemas LasR/LasI y RhIR/RhII del QS facilitan la formación del biofilm. (35) *P. aeruginosa* posee la molécula 2-amino acetofenona (2-AA), la cual es regulada a través del QS e identificada como un biomarcador para la colonización de *P. aeruginosa* en heridas por quemaduras e infecciones crónicas en pacientes con FQ. La presencia de 2-AA modula la respuesta inmune del hospedador e induce la resistencia a antibióticos (35,36).

❖ Transportadores del antibiótico

En aislamientos clínicos, el principal mecanismo de resistencia a la fosfomicina está relacionado con la alteración de su entrada en la bacteria. *P. aeruginosa* utiliza la molécula GlpT como medio de transporte de la fosfomicina, por lo que, mutaciones en *glpT* inducen la resistencia a este antibiótico (37).

Al igual que en el caso de la fosfomicina, la entrada de aminoglucósidos también puede verse alterada por mutaciones que inactiven la expresión de la oxidorreductasa *nuoG* (38).

❖ Sistemas de dos componentes (TCS)

Tal y como se describió anteriormente, las polimixinas interaccionan con los grupos fosfato del lípido A del lipopolisacárido, añadiendo 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa (L-Ara4N) bajo condiciones limitadas de nutrientes, especialmente magnesio y calcio. Hasta la fecha se han descrito 5 TCS que juegan un papel importante en la resistencia de *P. aeruginosa* a las polimixinas: PmrAB, PhoPQ, ParRS, ColRS y CprRS. En condiciones normales de crecimiento los TCS reprimen el operón *arnBCADTEF* lo que resulta en un fenotipo sensible frente a estos antibióticos (39).

Se han detectado varias alteraciones genéticas en el sistema **PmrAB** que favorecen la modificación del lípido A con L-Ara4N. Aquellas cepas que tienen varias alteraciones genéticas en *pmrB* tienden a tener valores de CMI mayores que aquellas que solo tienen una alteración. Así mismo, se ha visto que aquellas alteraciones cercanas al residuo activo de histidina (H249) aumentan

dicha resistencia. La alteración en *pmrA* del residuo de lisina de la posición 157 podría implicar un aumento en la resistencia a las polimixinas (39).

Por otro lado, mutaciones que alteran el marco de lectura o truncan el gen *phoQ* tienen como consecuencia la activación del sistema **PhoPQ** y por consiguiente del operón *arnBCADTEF*. Así mismo, se ha visto una resistencia mayor a las polimixinas en cepas que presenta mutaciones tanto en *pmrB* como en *phoQ*, en comparación con aquellas que solo tienen uno de los genes mutados (39).

Las mutaciones en **ColRS** y **CprRS** en aquellas cepas que a su vez tienen mutaciones en *phoQ* contribuyen a una mayor resistencia a las polimixinas. Finalmente, mutaciones en el sistema **ParRS** causan la activación del operón *arnBCADTEF* independientemente de PmrAB y PhoPQ (39).

❖ Porinas

P. aeruginosa presenta en su membrana externa diversas porinas, que forman canales acuosos que permiten el paso y difusión de solutos a través de la membrana externa. Estas porinas actúan como la vía de entrada de antibióticos betalactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas y algunas fluoroquinolonas (40). Pueden ser específicas o no específicas. Las porinas no específicas permiten la difusión de moléculas hidrofílicas en general con un tamaño determinado, mientras que las porinas específicas tienen afinidad por sustratos específicos. La porina OprF es la porina no específica y mayoritaria presente en *P. aeruginosa*. Así mismo, están presentes las porinas OprB, OprP y OprO y OprD, específicas de glucosa, fosfato, polifosfato y aminoácidos básicos, respectivamente (41).

Además de actuar como un canal específico de aminoácidos básicos y pequeños péptidos, OprD es la principal vía de entrada de imipenem en la bacteria (41–43). Su estructura consta de 16 láminas β antiparalelas que forman una estructura cilíndrica, conectadas entre sí por 8 *loops* (L1 – L8) en la superficie externa (42,44–46). Los *loops* L2 y L3 (Figura 6) contienen los puntos de acceso o puntos de unión con el antibiótico, por tanto, las mutaciones en estos *loops* impiden esta unión, induciéndose así la resistencia a imipenem (42,46). Además, se ha demostrado que el acortamiento del *loop* L7 (Figura 6), por la pérdida de dos aminoácidos, abren el canal y permiten el paso de meropenem, incrementando su actividad. Sin embargo, este hecho no produce cambios en la

resistencia a imipenem (47). La inactivación de OprD es la principal causa de resistencia frente a imipenem. Esta inactivación es el resultado de inserciones y deleciones de nucleótidos en la secuencia de *oprD*, que dan lugar a alteraciones en el marco de lectura, la presencia de secuencias de inserción que interrumpen la secuencia nucleotídica de *oprD*, y mutaciones puntuales que originan cambios en los aminoácidos y codones de parada prematuros (34,42,43,48).

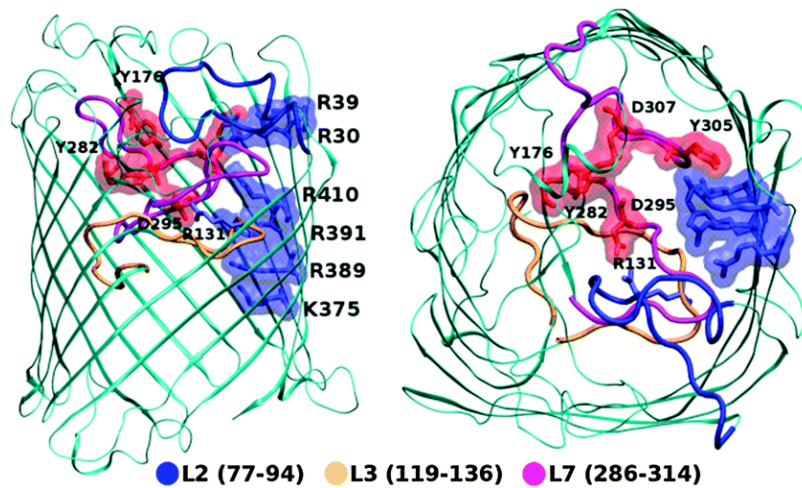


Figura 6. Estructura de la porina OprD. Representación de los *loops* principales (49).

En el caso de meropenem y doripenem, estas alteraciones, por lo general, no son suficientes para cambiar el fenotipo de cepa sensible a resistente, y requiere de otros mecanismos adicionales como mutaciones en los genes reguladores *ampR*, *ampD* o *dacB* que conlleven a la hiperproducción de AmpC, o la sobreexpresión de la bomba de eflujo MexAB-OprM (40). Estos mecanismos se explican con más detalle en los apartados siguientes.

A diferencia de los carbapenémicos, los aminoglucósidos y colistina no llegan al espacio periplásmico a través de porinas. En lugar de ello, se unen al lipopolisacárido de la membrana externa, alteran la permeabilidad de esta y penetran hasta la membrana citoplasmática donde se difunden hasta sus sitios diana. Aunque no se ha visto en casos clínicos, en ensayos de laboratorio se ha demostrado que la sobreexpresión de la proteína de membrana OprH impide la unión de los antibióticos al lipopolisacárido, induciendo así la resistencia (33). Se ha demostrado que mutaciones que inactivan la expresión de *galU* se traducen en la expresión del lipopolisacárido con el core truncado lo que impide la entrada de aminoglucósidos (50).

❖ Sistemas de expulsión activa

P. aeruginosa tiene la capacidad de disminuir la acumulación de antibiótico expulsándolo mediante bombas de eflujo (6,35,40). Estas están clasificadas en 5 familias según la identidad de su secuencia de aminoácidos: MFS (*Major facilitator family*), ABC (*ATP-binding cassette*), RND (*Resistance-nodulation-division*), SMR (*Small multidrug resistance*) y MATE (*Multidrug and toxic compound extrusion*), siendo las de la familia RND las predominantes en *P. aeruginosa* (40,51).

Dentro de la familia RND, se han detectado 12 bombas en *P. aeruginosa*, de las cuales MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY las más relevantes clínicamente. Estos sistemas están formados por tres componentes proteicos que incluyen: una bomba dependiente de energía ubicada en la membrana citoplasmática (MexB, MexD, MexF, MexY), una porina de membrana externa (OprJ, OprM, OprN) y un tercer componente proteico (proteína acopladora), ubicado en el espacio periplásmico, que une los dos anteriores (MexA, MexC, MexE, MexX) (Figura 7) (33,40,52–54).

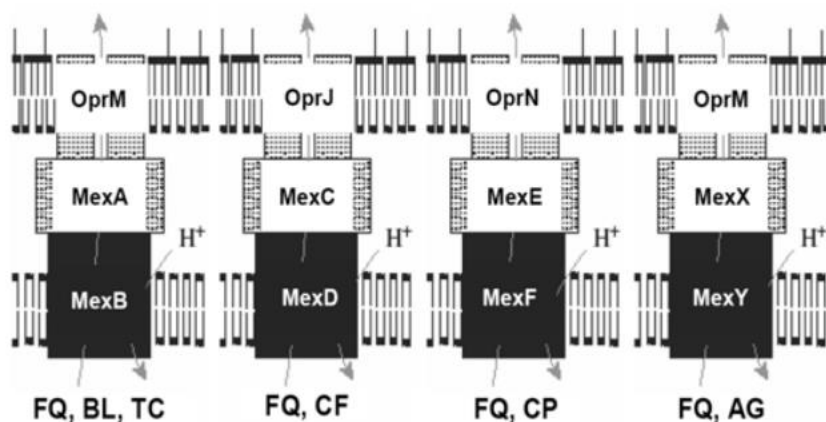


Figura 7. Modelos estructurales y funcionales de las bombas de expulsión de *P. aeruginosa* (52).

FQ: Fluoroquinolonas; BL: Betalactámicos; TC: Tetraciclina; CF: Cefalosporinas; CP: Carbapenémicos; AG: Aminoglucósidos.

Dentro de los sistemas RND, **MexAB-OprM** protege a *P. aeruginosa* de múltiples amenazas en distintos ambientes. Además, tiene el mayor rango de acción frente a los betalactámicos, a excepción de imipenem, y actúa sobre otras clases de antibióticos como fluoroquinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, inhibidores de betalactamasas, macrólidos, trimetoprim

y sulfonamidas, así como desinfectantes, detergentes y homoserín lactonas. Estudios en cepas de referencia han revelado que mutaciones puntuales que inactiven los genes reguladores *mexR*, *nalC*, o *nalD*, afectando así al funcionamiento de sus productos MexR, NalC y NalD, implican la sobreexpresión de MexAB-OprM (40,51).

El sistema **MexCD-OprJ** tiene una elevada homología con MexAB-OprM. Tiene la capacidad de expulsar fluoroquinolonas, cloranfenicol, tetraciclinas, trimetoprim y macrólidos, pero a diferencia de MexAB-OprJ, este sistema no muestra tanta afinidad por los betalactámicos, pero sí por las cefalosporinas de cuarta generación. En cepas salvajes esta bomba no se expresa, lo que indica que no contribuye a la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa*. Sin embargo, su expresión se induce en presencia de agentes que dañan la estructura de la membrana. El gen *nfxB* codifica el regulador transcripcional NfxB, que actúa como represor del sistema MexCD-OprJ. Por tanto, mutaciones en *nfxB* se traducen en la sobreexpresión de MexCD-OprJ, y, por consiguiente, en el incremento de la resistencia de *P. aeruginosa* (40,51,55,56).

Al igual que MexCD-OprJ, la bomba de eflujo **MexEF-OprN** tampoco contribuye a la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa*. Esta bomba presenta afinidad por fluoroquinolonas, cloranfenicol y trimetoprim. Su expresión está regulada por MexT, MexS y MvaT. La sobreexpresión de MexEF-OprN resulta tanto de la unión del activador transcripcional MexT con la región promotora del operón *mexEF-oprN*, como de mutaciones en *mexS* que originan un represor MexS no funcional. Además, MexT reprime OprD, induciendo resistencia a imipenem. MvaT es un regulador global de genes implicados en la virulencia y formación de biofilm y su delección incrementa la expresión de MexEF-OprN independientemente de MexT y MexS (40,51,57–60).

A diferencia de las otras bombas, el operón *mexXY* carece del gen codificante de una proteína de membrana. Sin embargo, MexXY tiene la capacidad de asociarse con OprM y formar el sistema funcional **MexXY-OprM**, así como con otras proteínas de membrana como OpmC, OpmG, OpmH y Opml. La cepa *P. aeruginosa* PA7 posee un gen único, *oprA*, al final del operón *mexXY* que codifica un canal de membrana externa y está ausente en la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa*. En esta cepa, MexXY utiliza como porina tanto OprA como OprM. Fluoroquinolonas, betalactámicos, aminoglucósidos, tetraciclina, cloranfenicol y eritromicina son sustratos para MexXY. La regulación de esta bomba está mediada por el represor MexZ, con lo que mutaciones en *mexZ* se asocian con la sobreexpresión de MexXY. Por otro lado, se ha revelado que ArmZ actúa como anti-represor de

MexZ, y actúa por tanto como un activador transcripcional de MexXY. Finalmente, se ha descrito que alteraciones en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los componentes del sensor ParRS aumentan la expresión de MexXY (40,51,61,62).

3.2.2. Modificación de los antibióticos

P. aeruginosa presenta resistencia a antibióticos betalactámicos gracias a la presencia de betalactamasas, unas enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico, inhibiendo su función. De la misma forma, mediante la acción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, cambian la estructura de estos, generando un compuesto nuevo incapaz de inhibir al microorganismo (23). Finalmente, se ha descrito la resistencia a fosfomicina gracias su inactivación por metaloenzimas (37).

❖ Betalactamasas

Las betalactamasas son enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico de los antibióticos, destruyendo su sitio activo e impidiendo su actividad. Estas enzimas pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano o en plásmidos, y se pueden producir de forma constitutiva o inducible. Algunas de ellas tienen un espectro corto de actividad, mientras que otras hidrolizan prácticamente la totalidad de betalactámicos. Así mismo, estas enzimas son susceptibles a ser inhibidas por compuestos como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, sin embargo, no todas son susceptibles ni responden igual a la inhibición. Según la clasificación de Ambler, las betalactamasas están agrupadas en cuatro clases según la homología de sus aminoácidos: A, B, C y D (Tabla 3) (6,23,32,63).

Tabla 3. Betalactamasas según la clasificación de Ambler

Clase de Ambler	Enzimas	
Clase A	Betalactamasas de espectro extendido	TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, TLA, SFO
	Carbapenemasas	SME, IMI, NMC, KPC, GES
Clase B	Metalobetalactamasas	IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, AIM, DIM, KHM
Clase C	AmpC	
Clase D	Betalactamasa	PoxB
	Carbapenemasas	OXA

Las **betalactamasas de espectro extendido (BLEE)** tienen la capacidad de inducir resistencia a penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos, pero son inhibidas por el ácido clavulánico y tazobactam. (33) Pertenecen a la clase A de Ambler y entre ellas se encuentran las de tipo TEM, SHV y CTX-M. Así mismo, otras menos prevalentes son las de tipo PER, VEB, GES, TLA y SFO. Los genes que codifican las BLEE se transfieren horizontalmente entre especies a través de plásmidos (6,63,64).

Las betalactamasas de tipo **AmpC** pertenecen a la clase C de Ambler. Están codificadas en el cromosoma de algunas bacterias y su expresión puede inducirse en presencia de betalactámicos. Las bacterias que poseen el gen *ampC*, como *P. aeruginosa*, tienen un sistema molecular, relacionado con el reciclaje del peptidoglicano, que regula la expresión de *ampC* (6,40,65).

En cepas salvajes *ampC* se expresa a nivel basal durante el proceso de reciclaje de pared celular. Este proceso inicia cuando los productos de degradación de la pared, 1,6 anhidromuropéptidos (1,6 amp), ingresan al citoplasma bacteriano a través de la permeasa transmembrana AmpG. Los 1,6 amp actúan como promotores del activador transcripcional AmpR. Cuando estos se unen, se induce la expresión de *ampC*, y se produce la enzima AmpC. Los niveles de expresión de AmpC son bajos gracias al sistema represor. Este sistema consiste en la transformación de los 1,6 amp en ácido 1,6 anhidromurámico y péptidos, por AmpD. Los péptidos son procesados hasta formar tripéptidos, que más adelante formarán el precursor de la pared celular UDP-N-acetilmuramilpentapéptido, que al unirse con el regulador transcripcional AmpR lo bloquea, reprimiendo la transcripción del gen *ampC* (40,65).

En presencia de betalactámicos e inhibidores de betalactamasas, una vez que estos atraviesan la membrana externa y llegan al periplasma e interactúan con las PBP, aumenta la concentración de 1,6 amp en el citoplasma. AmpD no es capaz de procesar tanta cantidad de 1,6 amp, por lo que estos sustituyen a los pentapéptidos, que, al unirse con AmpR, lo convierten en un activador transcripcional. Esto da como resultado la sobreexpresión de *ampC* (40,65).

Uno de los principales problemas en *P. aeruginosa* es la creciente diseminación de **carbapenemasas** transferibles. Las carbapenemasas pertenecen a las clases A, B y D de Ambler (66):

- Dentro de la clase A se encuentran SME, IMI, NMC, KPC y GES. Los grupos SME, IMI y NMC son de codificación cromosómica y nunca se han detectado en *Pseudomonas*. Las carbapenemasas KPC y GES son plasmídicas y en *P. aeruginosa* se han detectado las variantes KPC-2, KPC-5, GES-2 y GES-5 (66).
- Las carbapenemasas de clase B, también conocidas como metalobetalactamasas (MBL), son el grupo más relevante de carbapenemasas. Todas ellas son inhibidas por agentes quelantes metálicos como el EDTA, y dentro de este grupo se distinguen IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, AIM, DIM y KHM, de las cuales GIM y KHM no se han detectado en *P. aeruginosa*, y las de los grupos IMP y VIM destacan como las más extendidas y habitualmente detectadas. Hasta hoy se han detectado 26 variantes del grupo IMP y 23 del grupo VIM. En *P. aeruginosa* se han detectado las variantes VIM-1, -2, -4 y -6 y todas casi todas las variantes del grupo IMP, a excepción de IMP-3, -5, -17, -23 y -24. Los genes IMP se encuentran en forma de casetes en integrones de clase 1, y, en algunos casos en integrones de clase 3. A pesar de que se han hallado casos de codificación cromosómica de los genes VIM, es más común encontrarlos en forma de casetes en integrones de clase 1 (66).
- Las carbapenemasas de clase D, agrupan las enzimas del grupo OXA. En *P. aeruginosa* se han detectado OXA-40, OXA-48, OXA-181 y OXA-198 (66,67). Las betalactamasas PoxB se caracterizaron como oxacilinasas cromosómicas presentes de forma natural en el cromosoma de *P. aeruginosa*, que en condiciones normales no se expresan (66,68).

❖ Enzimas modificadoras de aminoglucósidos

Los aminoglucósidos, como tobramicina, gentamicina y amikacina, son frecuentemente utilizados en el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa*, sobre todo en pacientes con FQ. La resistencia a estos compuestos está mediada por la adquisición de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME), metilasas que modifican su sitio de acción (mecanismo explicado más adelante), así como por los sistemas de expulsión activa mencionados anteriormente (69).

Las **AME** modifican los grupos -OH y -NH₂ de los aminoglucósidos y se agrupan en tres clases: nucleotidiltransferasas, fosfotransferasas y acetiltransferasas (70). Las **acetiltransferasas (AAC)** catalizan la acetilación de los grupos -NH₂ del aminoglucósido, utilizando como sustrato una molécula de acetil-CoA, y, en función de la posición que acetilan, se pueden distinguir cuatro grupos de esta enzima: AAC(1), AAC(3), AAC(2') y AAC(6') (69,70). Las **nucleotidiltransferasas (ANT)** inactivan los aminoglucósidos mediante la transferencia de un AMP al grupo -OH, utilizando como sustrato ATP, y, en función de la posición que adenilan, se distinguen los grupos ANT(6), ANT(9), ANT(4'), ANT(2'') y ANT(3'') (69,70). Finalmente, las **fosfotransferasas (APH)** catalizan la transferencia de un grupo fosfato a la molécula de aminoglucósido. Se distinguen los grupos APH(4), APH(6), APH(9), APH(3'), APH(2''), APH(3'') y APH(7'') (69,70).

Las enzimas codificadas por los genes *aac(6')-I*, *aac(6')-II*, *ant(2'')-I* y *aph(3')-VI*, son particularmente significantes, pues son las enzimas más comúnmente presentes en *P. aeruginosa*, y sus sustratos confieren resistencia a los aminoglucósidos antipseudomonales más importantes. De esta manera, *aac(6')-I* confiere resistencia a tobramicina y amikacina, *aac(6)-II* y *ant(2'')-I* inactivan tobramicina y gentamicina, y *aph(3')-VI* inactiva amikacina (69,71,72).

❖ Metaloenzimas

El mecanismo de resistencia a la fosfomicina de mayor relevancia epidemiológica es su inactivación mediante las metaloenzimas FosA, FosB y FosX, que bloquean su acción inhibitoria sobre MurA (37).

❖ Resistencia mediada por plásmidos

Uno de los mecanismos de resistencia a quinolonas es la resistencia adquirida por plásmidos. Dentro de este grupo se encuentran la proteína Qnr que impide la unión del antibiótico con su diana, y el sistema de eflujo QepA que aumenta la resistencia a CIP y norfloxacino (NOR). La AAC(6')-Ib-cr aumenta la resistencia a CIP y NOR y es una variante de la acetiltransferasa AAC(6')-Ib que confiere resistencia a aminoglucósidos (73).

pUM505 es un plásmido de 123 Kbp que contiene genes adaptativos involucrados en la virulencia de *P. aeruginosa*. Dentro de este plásmido se identificó el gen *crpP* que comparte el 40% de identidad con una región de 42 aminoácidos de la fosfotransferasa de *Mycobacterium smegmatis* y codifica una proteína que disminuye la sensibilidad a CIP (73).

3.2.3. Modificación de las dianas

Mediante la alteración de las dianas de los antibióticos, *P. aeruginosa* adquiere resistencia a fluoroquinolonas, aminoglucósidos y betalactámicos (33).

Las quinolonas actúan sobre las subunidades GyrA y GyrB del complejo ADN girasa, y ParC y ParE del complejo ADN topoisomerasa IV. Mutaciones en los genes que codifican estas subunidades reducen la unión del antibiótico con su sitio diana (74).

Los aminoglucósidos se fijan a la unidad 30S del ribosoma bacteriano a través del sitio A del ARNr 16S. *P. aeruginosa* adopta un “mecanismo de protección ribosomal”, por el cual enzimas **metilasas** como RmtA, RmtB, RmtD y ArmA, modifican el sitio de unión por metilación. Esta modificación impide la unión con el antibiótico, induciéndose así la resistencia (69,75). Las alteraciones en *rplY* constituyen un mecanismo no enzimático por el cual *P. aeruginosa* adquiere resistencia a aminoglucósidos (38).

4. Distribución clonal global de cepas de *P. aeruginosa* en FQ

Por muchos años se tuvo la creencia de que los pacientes con FQ se infectaban con cepas de *P. aeruginosa* ambientales. Sin embargo, en los últimos 15 años han surgido las llamadas cepas

transmisibles, en algunos casos, asociadas con una alta mortalidad y resistencia antimicrobiana. Entre estas cepas se encuentran las Australian Epidemic Strains (AES) (ST649, ST775, ST242), Clon C (ST17), DK-1 (ST387), DK-2 (ST386), Liverpool Epidemic Strains (LES) (ST146, ST683), Manchester Epidemic Strain (MES) (ST217), Midlands-1 (ST148), PA14 (ST253), Prairie Epidemic Strain (ST192), CC274 (ST274), Strain B (ST439) y Dutch Epidemic Strain (ST406) (76).

A lo largo de la última década, numerosos estudios han adversito acerca de la diseminación epidémica de cepas de XDR/MDR de *P. aeruginosa* en hospitales. Aún más preocupante son los estudios que revelan la existencia de clones MDR/XDR diseminados a nivel mundial, denominados clones de alto riesgo. Entre ellos, los más extendidos son los ST111, ST175 y ST235 (77).

5. Factores de virulencia de *P. aeruginosa*

La versatilidad metabólica, resistencia a antibióticos, formación de biofilm y producción de factores de virulencia hacen que *P. aeruginosa* sea un patógeno importante a nivel clínico. La capacidad que tiene *P. aeruginosa* para causar infecciones radica en la variedad de factores de virulencia que posee. Estos factores de virulencia pueden estar asociados a la célula bacteriana, como flagelos, pili y lipopolisacárido, o, ser secretados por la bacteria, como enzimas, toxinas o pigmentos (Tabla 4) (78).

Tabla 4. Factores de virulencia de *P. aeruginosa* (79)

Factores de virulencia	Función	
Adherencia	Flagelo	Movilidad, formación de biofilm y adaptación patogénica
	Lipopolisacárido	Mediación de procesos biológicos, resistencia
	Pili IV	Adherencia a células hospedadoras, movilidad
Antifagocitosis	Alginato	Formación de biofilm, persistencia bacteriana
Biosurfactantes	Ramnolípidos	Solubilización de surfactantes
Captación de hierro y pigmentos	Piochelina	Captación de hierro, formación de radicales libres que provocan daño tisular, facilita la unión con otros metales
	Pioverdina	Captación de hierro de transferrina y lactoferrina,

Factores de virulencia	Función
	citotoxicidad
Piocianina	Citotoxicidad
Enzimas	Inhibición del funcionamiento del sistema inmune, degradación de elastina, daño tisular
Quorum sensing	Regulación de la producción de factores de virulencia, formación de biofilm
Sistemas de secreción	Secreción de toxinas y enzimas en el medio celular
Toxinas	Inhibición de la síntesis de proteínas de la célula hospedadora, lisis de la membrana de la célula hospedadora, citotoxicidad, antifagocitosis, degradación de surfactantes

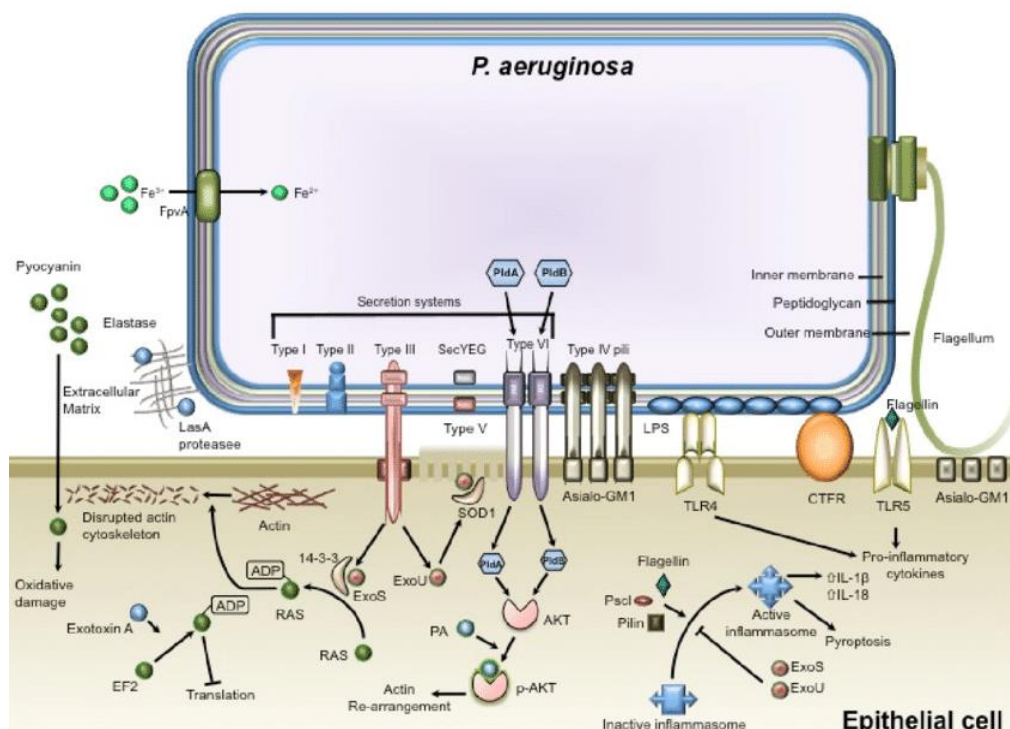


Figura 8. Patogenicidad y factores de virulencia de *P. aeruginosa* (80).

5.1. Adhesinas y proteínas de membrana

La adhesión bacteriana es un paso crítico durante las infecciones e implica complejas interacciones entre las adhesinas bacterianas y los receptores de la célula hospedadora. El flagelo y pili son dos adhesinas identificadas en *P. aeruginosa*, las cuales permiten el movimiento de la bacteria. *P. aeruginosa* posee un único **flagelo** polar compuesto principalmente de flagelina. Mediante un movimiento rotatorio, el flagelo permite la movilidad *swimming* de la bacteria a través de medios acuosos. En el momento de la infección, *P. aeruginosa* se adhiere a su célula diana uniendo su flagelo con el glicolípido GM1 de esta, lo cual activa la respuesta del sistema inmune. Los receptores Toll-like 5 (TLR5) reconocen la flagelina y se inicia la respuesta inflamatoria que comienza con la expresión de IL-18 e IL-1B y termina con la muerte celular. Para evitar la inducción de la respuesta inflamatoria, *P. aeruginosa* reprime la expresión del gen que codifica la flagelina, induce la producción de alginato y cambia su fenotipo a uno mucoide (7,81).

Además del flagelo, *P. aeruginosa* posee varios filamentos cortos denominados pili. Los **pili tipo IV** se localizan en los extremos de la bacteria y son la adhesina más importante de *P. aeruginosa*, ya que su movimiento contráctil permite que la bacteria se mueva tanto por superficies sólidas, mediante un movimiento *twitching*, como por superficies semisólidas, mediante un movimiento *swarming*. Además, el movimiento *swarming* contribuye a la formación de agregados bacterianos que protegen a la bacteria de la respuesta inmune y de la acción de los antibióticos (7,81).

P. aeruginosa secreta **proteasas** las cuales tienen una importancia clínica en infecciones oculares y sepsis. Aunque su contribución a las infecciones pulmonares no está del todo clara, se ha visto su implicación en el daño tisular durante infecciones respiratorias. Las **proteasas alcalinas** interfieren con los monómeros de flagelina, degradándolos e impidiendo su reconocimiento por los TLR5 (7). *P. aeruginosa* produce las elastasas **LasA** y **LasB**, secretadas por el sistema de secreción tipo II y cuya expresión está regulada por el sistema quorum sensing. La proteasa LasA hidroliza los enlaces peptídicos de la pentaglicina que estabiliza la pared del peptidoglicano. Además, juega un papel importante en las infecciones ya que interviene en los procesos de competición bacteriana. La elastasa LasB tiene la capacidad de degradar la elastina en péptidos pequeños y aminoácidos libres y promueve la formación de biofilm (7,81).

5.2. Biofilm

El biofilm se define como una comunidad de microorganismos que crece en una matriz de exopolisacáridos adheriéndose a una superficie inerte (82). Su componente mayoritario es el agua, representando hasta un 97% del contenido total. La matriz exopolimérica actúa como un filtro molecular, reteniendo iones, componentes apolares y partículas en la fase acuosa. Además de agregados de células bacterianas, la matriz del biofilm está compuesta por los polisacáridos Pel, Psl y alginato, cuya función está asociada a la adhesión a superficies y mantenimiento de la estructura del biofilm. Las proteínas presentes permiten el acceso a nutrientes y la regulación de la integridad y estabilidad del biofilm. La matriz del biofilm contiene hidrolasas y liasas, implicadas en la degradación de exopolisacáridos estructurales, permitiendo la dispersión de células sésiles para la formación de nuevos biofilms. Las proteínas no enzimáticas, como las asociadas a las paredes celulares y lectinas, están implicadas en la formación y estabilización de la red de polisacáridos de la matriz y sirven de enlace entre la superficie bacteriana y los exopolisacáridos extracelulares. Finalmente, los apéndices proteicos como pili, fimbrias y flagelos, actúan como elementos estructurales interaccionando con otros exopolisacáridos de la matriz del biofilm. Estudios realizados utilizando microscopía confocal han revelado que la matriz del biofilm contiene canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno (78,82,83).

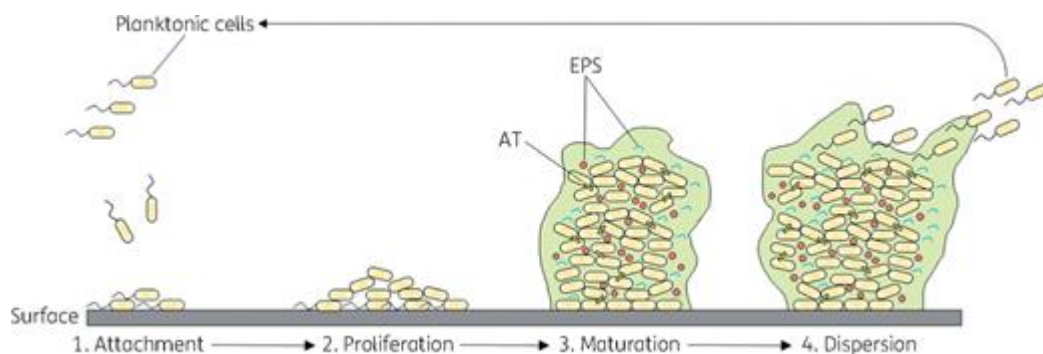


Figura 9. Proceso de formación de biofilm. En la etapa inicial *P. aeruginosa* utiliza sus flagelos, fimbrias y pili para adherirse a la superficie. Una vez adherida, comienza a dividirse y sus células hijas se extienden alrededor del sitio de unión formando una microcolonia. A continuación, la bacteria secreta el exopolisacárido que constituye la matriz del biofilm formando estructuras tridimensionales similares a setas. Finalmente, algunas bacterias de la matriz se liberan para poder colonizar nuevas superficies (84).

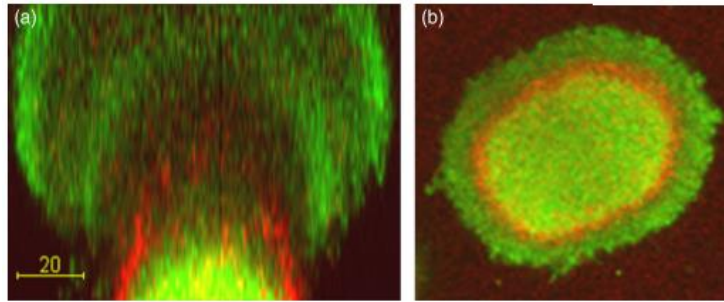


Figura 10. Estructura en forma de seta del biofilm formado por *P. aeruginosa* PAO1. a) Sección vertical. b) Sección horizontal. Bacterias en verde y ADN extracelular en rojo (85).

5.2.1. Mecanismos implicados en la regulación del biofilm

La adhesión, síntesis de polisacáridos, movilidad, síntesis de ramnolípidos y ADN extracelular (ADNe) son factores importantes en la producción de biofilm. El diguanilato cíclico (c-di-GMP) regula los cambios en la movilidad bacteriana, la adhesión a superficies y la síntesis de polisacáridos. El QS interviene en la liberación de ADNe, síntesis de polisacáridos y ramnolípidos y regula el metabolismo interno de *P. aeruginosa*. Finalmente, el sistema de dos componentes, GacS-GacA y los reguladores RetS y LadS juegan un papel importante en la síntesis de polisacáridos, regulada por los ARN de pequeño tamaño (ARNs) (Figura 11) (86).

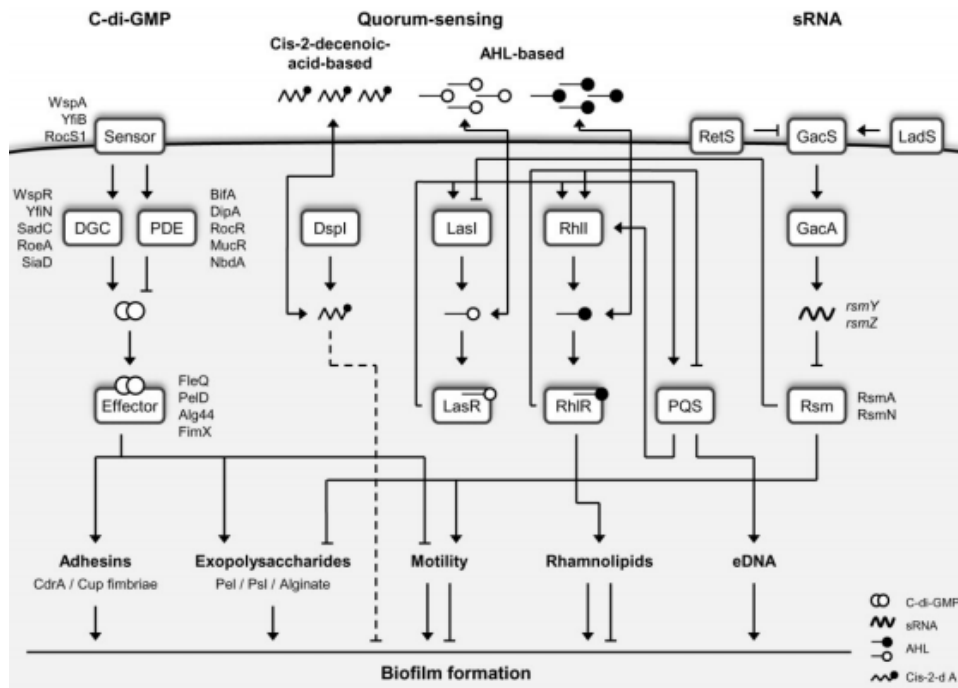


Figura 11. Mecanismos implicados en la regulación de la producción de biofilm (86).

Altos niveles de **c-di-GMP** están relacionados con la activación de rutas celulares que promueven la transición de un estado planctónico y móvil a uno sésil y colectivo, e inducen la producción de adhesinas y componentes extracelulares que favorecen la formación de biofilm (87).

La molécula de c-di-GMP es sintetizada intracelularmente a partir de dos moléculas de GTP por diguanilato ciclasas (DGC) que albergan un dominio de GGDEF conservado y es hidrolizada por fosfodiesterasas (PDE) específicas de c-di-GMP con dominios de EAL o HD-GYP conservados, que degradan c-di-GMP a fosfatidilglicerol fosfoglicerol (pGpG), seguido de la posterior división en dos moléculas de GMP a través de la oligoribonucleasa Orn (88). Las PDE se activan ante señales ambientales de estrés, como la falta de nutrientes e hipoxia, causando así la dispersión o prevención del biofilm (86).

Mediante análisis de los genomas de *P. aeruginosa* se predijo la posible participación de 41 genes en la síntesis y degradación de c-di-GMP, de los cuales 17 codifican diferentes proteínas con un dominio GGDEF, 5 con un dominio EAL o HD-GYP y 16 con ambos tipos de dominios. Las funciones de varios de estos genes han sido investigadas, incluidos aquellos que codifican DGC como PA0169 (*siaD*), PA1120 (*yfjN*), PA3702 (*wspR*), PA4332 (*sadC*) y PA4843 (*adca*) y genes de PDE como PA2133,

PA3947 (*rocR*), PA4367 (*bifA*) y PA5017 (*pch*) (88). Se han identificado además 4 proteínas efectoras de c-di-GMP: Alg44, FimX, PelD y FleQ (86).

La proteína Alg44 interviene en la síntesis del polisacárido alginato. La sobreproducción de alginato conlleva a un fenotipo mucoso, característico de las bacterias aisladas de los pacientes con FQ. En presencia de altos niveles de c-di-GMP se produce una sobreexpresión de la proteína Alg44. Los biofilms formados por una sobreproducción de alginato adquieren la estructura final en forma de seta (86).

La **síntesis de exopolisacáridos** está regulada a la vez por los tres mecanismos de regulación. En *P. aeruginosa* un aumento en los niveles de **c-di-GMP** disminuye la movilidad bacteriana, aumenta la expresión de los genes de síntesis de los polisacáridos Pel y Psl y genera una morfología colonial rugosa (85). FleQ es un regulador flagelar y, en ausencia de c-di-GMP, actúa como regulador negativo de los operones *pel* y *psl*, que codifican la síntesis de los polisacáridos Pel y Psl. FleQ se une a la proteína FleN, y en presencia de ATP forman un complejo de alto peso molecular. En presencia de altos niveles de c-di-GMP, se impide la unión del complejo FleQ/FleN al promotor *pelA* (89,90).

El operón *pel* está regulado por RetS y LadS, los cuales reprimen y activan su expresión, respectivamente. En *P. aeruginosa* el regulador RsmA activa la formación de pili, favoreciendo la movilidad bacteriana y reprimiendo el QS. Bajo condiciones de densidad bacteriana elevada y crecimiento lento los **ARNs**, RsmZ y RsmY, controlados por el sistema de dos componentes GacS-GacA, se sobreexpresan e inactivan la expresión de RsmA. La inactivación de RsmA disminuye el número de pili en la superficie bacteriana, favorece la formación de colonias rugosas e incrementa la expresión de los genes *pel* (91).

La **adhesión y movilidad** bacteriana están reguladas positivamente por la molécula **c-di-GMP**. Altos niveles de c-di-GMP sobreexpresan el complejo CdrAB formado por la adhesina CdrA y su transportador CdrB. La sobreexpresión de las proteínas de fimbrias CupABCD implica una disminución en la movilidad bacteriana, favoreciendo así la formación de biofilm. La expresión de CupA es dependiente de proteínas con dominios DGC de unión a c-di-GMP, como WspR, MorA y PA1120 (*YfiN*), la expresión de CupB y CupC depende de la PDE RocR y la expresión de CupD está regulada por la PDE PvrR. (85). La proteína FimX regula la movilidad de tipo twitching en respuesta a las alteraciones en los niveles de c-di-GMP (86).

El **QS** de *P. aeruginosa* regula de manera positiva la síntesis de polisacáridos y juega un papel importante en la formación de las estructuras en forma de setas del biofilm maduro. Esta estructura le confiere al biofilm cierta resistencia a antibióticos. Por tanto, mutaciones en los genes *lasI*, *rhlI* y la inhibición del sistema PQS afectan a la transcripción del operón *pel* e impiden que el biofilm adquiera la estructura en forma de seta (85). Además, el QS regula también la síntesis de **ramnolípidos** que protegen al biofilm frente a la respuesta inmune de la célula hospedadora, síntesis de **ADNe** e interviene en el metabolismo central de la bacteria. El ADNe compone gran parte de la matriz del biofilm de *P. aeruginosa*. Es necesario en las primeras etapas de su formación e interviene en la formación de un biofilm maduro con estructura en forma de seta. El sistema PQS provoca la lisis bacteriana de pequeñas subpoblaciones en la matriz del biofilm. A su vez, favorece la formación de vesículas de membrana con efecto bacteriolítico. Tras la lisis bacteriana, el ADNe es liberado a través de las vesículas de membrana. *P. aeruginosa* forma biofilm en un ambiente anaerobio en presencia de nitrato, y el sistema Rhl actúa previniendo la acumulación de óxido nítrico tóxico durante el proceso (85).

Concentraciones subinhibitorias de antibióticos como aminoglucósidos, quinolonas y tetraciclinas inducen la formación de biofilm en *P. aeruginosa*. Sin embargo, se ha visto que otros antibióticos como polimixina B, cloranfenicol y carbenicilina no tienen efecto sobre la formación de biofilm. La inducción de biofilm en presencia de concentraciones subinhibitorias de aminoglucósidos depende del gen *arr*, una fosfodiesterasa involucrada en la degradación de c-di-GMP. Esto sugiere que la formación de biofilm es una respuesta específica y que estos antibióticos pueden ser usados como moléculas de señalización más que como compuestos tóxicos (92).

5.3. Quorum sensing (QS)

El quorum sensing (QS) es un mecanismo basado en la comunicación intercelular que permite la adaptación bacteriana a los cambios medioambientales, incluyendo la adaptación al ambiente pulmonar, controlando la densidad de su población y coordinando la expresión de sus genes. El QS de *P. aeruginosa* interviene en la regulación de más de 300 genes, incluyendo genes de virulencia, resistencia y formación de biofilm (7,93–95).

El QS de *P. aeruginosa* está formado por cuatro sistemas, Las, Rhl, Pqs e Iqs. El sistema Las está constituido por el regulador transcripcional **LasR** y su señal N-(3-oxododecanoyl)-homoserin

lactona (**OddHL**), sintetizada por la proteína **LasI**. De manera similar, el sistema Rhl está formado por el regulador transcripcional **RhIR** y su señal actil homoserina N-butirilhomoserin lactona (**BHL**), sintetizada por la proteína **RhII**. El sistema **Pqs** se conforma de una proteína de síntesis, **PsqABCDH**, que produce una tercera señal denominada **PQS** (*Pseudomonas* Quinolone Signal), un regulador transcripcional **PqsR** y un efector **PqsE**. Los genes involucrados en el sistema **Iqs** son péptidos no ribosomales agrupados en el cluster **ambBCDE** (7,93–95).

Los cuatro sistemas de QS en *P. aeruginosa* están organizados de forma jerárquica (Figura 12). En lo alto de la jerarquía está el sistema Las. Cuando OdhDHL activa este sistema el complejo LasR-OddHL se multimeriza y activa la transcripción de *rhIR*, *rhII* y *lasI*. El complejo RhIR-BHL se dimeriza y activa la expresión de su propio regulón y de *rhII* formando así un loop de retroalimentación. LasR-OddHL regula positivamente al regulador del operón *pqsABCD*, PqsR. El sistema PQS induce la transcripción de *rhII* y con ello la producción de BHL y por consiguiente la expresión total del sistema Rhl. Sin embargo, la expresión de *pqsR* y *pqsABCD* depende del ratio de concentraciones entre RhIR y BHL, lo que sugiere que las concentraciones de OddHL y BHL son claves en el dominio del control del sistema PQS. Finalmente, el sistema Iqs está controlado por el sistema Las. Por tanto, alteraciones en *lasR* o *lasI* afectan a la expresión de *ambBCDE* y por tanto a la expresión del sistema IQS (96).

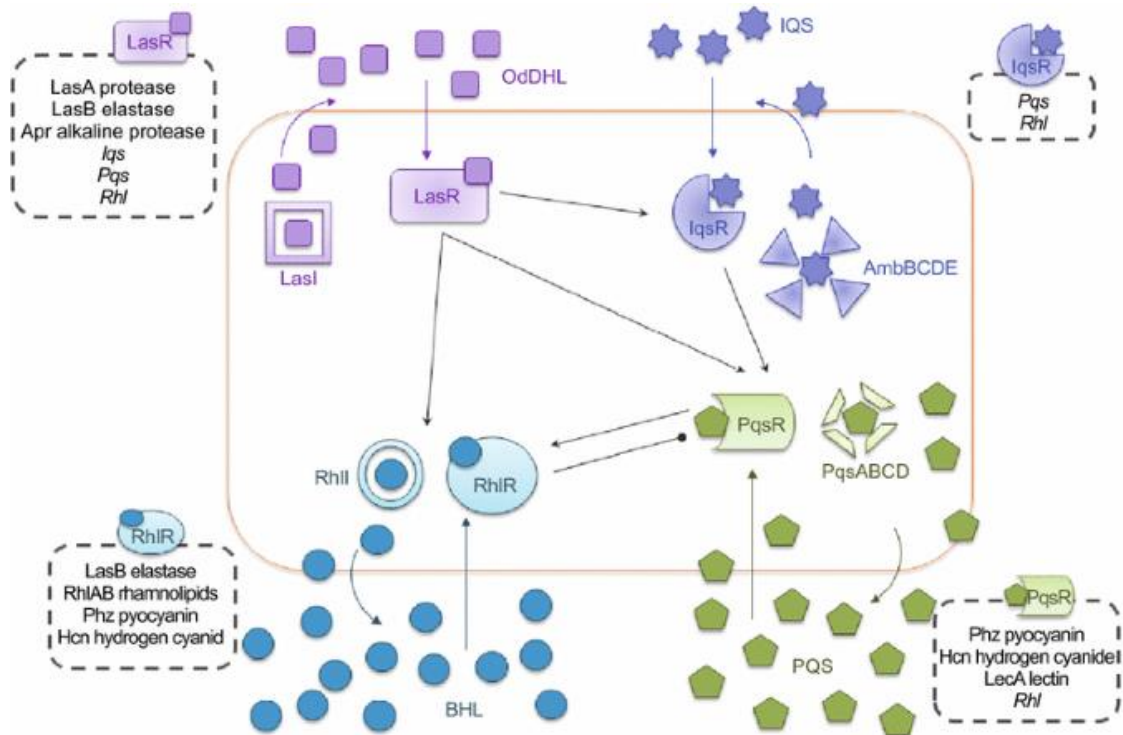


Figura 12. Cascada jerárquica del QS de *P. aeruginosa* (96).

En condiciones de baja densidad celular o en condiciones de crecimiento favorable la expresión de *lasI* y *rhlI* se reprime por acción de los reguladores transcripcionales **DksA**, **AlgR2**, **RsaL**, **MvaT**, **RpoS**, **RsmA** y **RpoN**, asegurando así que el sistema QS esté “apagado”. Cuando la densidad celular aumenta los reguladores transcripcionales **GacA**, **Vfr** y **PrpB** activan la expresión de *lasR* y *rhlR*, lo que resulta en una rápida activación de la respuesta del sistema QS (95).

A pesar de que la activación del QS se produce en presencia de una señal autoinductora, la antiactivación del QS por la presencia de ciertos componentes puede retrasar la respuesta del QS. La antiactivación consiste en la unión de una proteína antiactivadora al receptor del sistema, suprimiendo la transcripción de los genes diana de las moléculas receptoras. En *P. aeruginosa* se han identificado tres proteínas antiactivadoras: **QteE**, **QscR** y **QsIA**. **QscR** forma complejos heteromultiméricos con **LasR** y **RhlR**, suprime la biosíntesis de cianuro de hidrógeno y fenazina. Así mismo, puede actuar como un receptor – regulador “huérfano” que se homodimeriza una vez unido a la señal **OdDHL** y autorregula su regulón de QS. **QteE** forma heterodímeros con los receptores **LasR** y **RhlR**, desestabilizándolos y evitando así su unión con la señal. **QsIA** forma heterotrímeros con **LasR**

en un ratio 2:1 escondiendo la interfaz de dimerización y, por ende, previniendo la activación del sistema Las. Así mismo, puede disociar los complejos LasR-ADN (95,97).

5.3.1. Oxilipinas como autoinductores de QS en *P. aeruginosa*

La oxigenación de ácidos grasos insaturados es una de las principales reacciones bioquímicas durante la síntesis de intermediarios lipídicos, lo cual constituye el punto de partida para la síntesis de una gran variedad de metabolitos biológicamente significativos conocidos como oxilipinas (98). La síntesis de oxilipinas es catalizada principalmente por monooxigenasas y dioxigenasas de ácidos grasos, estas últimas incluyen lipoxigenasas, ciclooxigenasas, α -dioxigenasas y diol-sintasas. *P. aeruginosa* posee actividad diol-sintasa que cataliza la dioxigenación de varios ácidos grasos monoinsaturados, generando derivados mono y dihidroxilados. Cuando el ácido oleico exógeno es usado como sustrato, se genera las oxilipinas 10-HOME (ácido (10S)-hidroxi-(8E)-octadecenoico) y 7,10-DiHOME (ácido 7S,10S-dihidroxi-(8E)-octadecenoico) (98,99).

Se ha visto que las oxilipinas derivadas de la actividad diol-sintasa juegan un papel en la virulencia de *P. aeruginosa*, afectando a la movilidad y formación de biofilm, así como interviniendo en la comunicación intercelular (98,99). *P. aeruginosa* produce oxilipinas en función de la densidad celular a través de un sistema QS denominado **ODS** (*oxylipin-dependent quorum sensing system*) (Figura 13). Este sistema opera de manera independiente a los otros cuatro sistemas QS presentes en *P. aeruginosa* y se diferencia de estos en que utiliza un regulador transcripcional (**OdsR**) que controla el nivel de producción de oxilipinas y, al menos, otro receptor para reconocer el nivel de oxilipinas producidas, y, por consiguiente, inducir la expresión de los genes efectores. Además, ODS es un sistema específicamente ambiental, pues requiere de ácido oleico exógeno para la biosíntesis de los autoinductores. De esta manera, *P. aeruginosa* activa la respuesta de este sistema en un nicho específico (99).

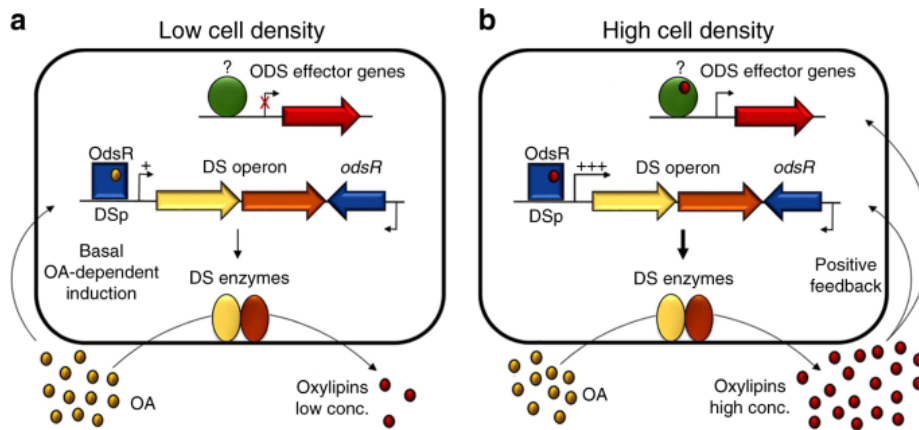


Figura 13. Modelo del ODS (99).

5.4. Sistemas de secreción

Las bacterias utilizan los sistemas de secreción como un mecanismo de supervivencia, a través del cual se comunican con otras especies, se defienden de agentes biológicos y químicos, captan nutrientes mediante la liberación de proteasas y lipasas que transforman macromoléculas complejas en nutrientes aprovechables, y liberan factores de virulencia que modifican la respuesta inmune de las células hospedadoras para utilizarlas como nicho de replicación. Existen diferentes sistemas de secreción y su estructura varía en función del tipo de sustrato que secretan y el número de membranas que este tiene que atravesar. Hasta la fecha se han descrito 9 sistemas de secreción (T1SS – T9SS) (Figura 14) (100–103).

Las proteínas pueden ser secretadas directamente desde el citoplasma hasta la superficie celular, a través de la envoltura celular, o bien, pueden no utilizar el propio sistema de secreción para llegar al periplasma (Figura 14). En su lugar utilizan rutas alternativas conocidas como rutas Sec (*General secretory pathway*) y Tat (*Twin arginine translocation pathway*). Aquellos sustratos que no presentan una estructura plegada llegan al periplasma a través de la ruta Sec, mientras que aquellos que sí la presentan lo hacen a través de la ruta Tat. En términos generales, el sistema Sec consta de una proteína motora ensamblada a un canal de translocación que solo se abre en el momento en que inicia la translocación. El canal de translocación es un poro muy angosto por el que los sustratos pasan de manera gradual. El sistema Tat consta de subunidades segregadas que forman un poro oligomérico una vez iniciada la translocación, a través del cual pasan las proteínas (100,103,104).

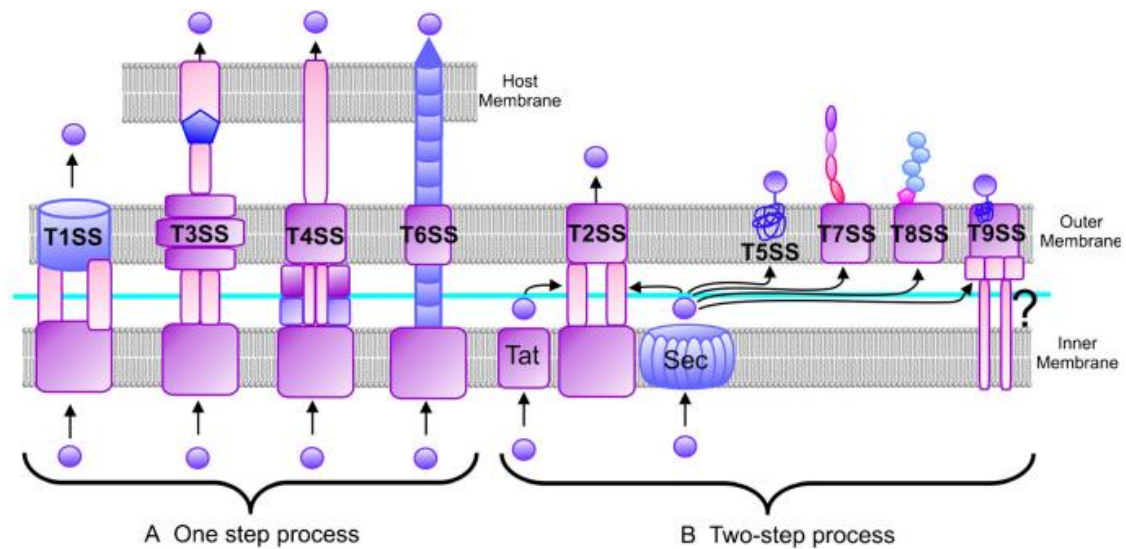


Figura 14. Sistemas de secreción bacteriana (103).

5.4.1. Sistemas de secreción de *P. aeruginosa*

Por lo general, en bacterias gramnegativas están presentes los sistemas de secreción 1 – 6 y 8. Comúnmente, en *P. aeruginosa* se encuentran T1SS, T2SS, T3SS, T5SS y T6SS (100,105).

❖ Sistema de secreción tipo I (T1SS)

Mediante el T1SS las bacterias transportan los sustratos a través de las membranas interna y externa. Estos sustratos incluyen enzimas digestivas, como lipasas y proteasas, adhesinas, hemoproteínas y toxinas (101).

El T1SS consta de tres componentes estructurales: un **transportador ABC** (*ATP binding cassette*), las proteínas de fusión membranales (**MFP**) y los factores de membrana externa (**OMF**). Una vez que la secuencia del sustrato que se va a secretar es reconocida por la secuencia señal del extremo carboxilo terminal del transportador ABC en la membrana interna, este transportador interactúa con las MFP formando el complejo proteína-ABC-MFP. Este complejo se conecta con las proteínas de los OMF y se forma un poro de salida en la membrana externa, a través del cual pasan los sustratos secretados (101,102).

El T1SS de *P. aeruginosa* consta de dos sistemas: Apr y Has: (100)



Figura 15. Sistemas Apr y Has. Modificado de (100).

El sistema Apr está codificado por los genes *apr* que secretan la proteasa alcalina AprA, la cual interviene en la degradación tisular y favorece el proceso de infección, y la proteína AprX (100). En cuanto a su estructura AprD actúa como transportador ABC, AprF como componente de membrana externa, y AprE como proteína adaptadora que une AprD y AprF.

El sistema Has permite la captación de hierro por parte de *P. aeruginosa*. Se compone de HasD que actúa como transportador ABC, la proteína de membrana externa HasF y la proteína adaptadora HasE (100).

❖ Sistema de secreción tipo II (T2SS)

El T2SS se conoce también como ruta GSP (*General secretory pathway*). Secreta una gran variedad de enzimas digestivas y toxinas, y en este caso, la secreción es gradual. En un primer paso las proteínas son translocadas por el mecanismo Sec a través de la membrana interna hasta el periplasma. Una vez en el periplasma son transportadas a través de la membrana externa mediante las proteínas GSP (106).

Las proteínas que conforman este sistema se dividen en 4 bloques: aquellas que forman el complejo de membrana externa, las proteínas de membrana interna, aquellas que intervienen en la secreción de ATPasa y las que forman el pseudopili. El complejo de membrana externa actúa como un canal a través del cual los substratos son translocados. Este canal está compuesto principalmente por secretina, la cual tiene un extremo amino tan largo que atraviesa el periplasma y le permite conectarse con las proteínas de la membrana interna. Las proteínas de membrana interna actúan como un nexo entre los otros tres bloques, utilizando los cambios en la ATPasa, debidos a la hidrólisis

de ATP, como una extensión del pseudopili, el cual podría actuar como un pistón que expulse las toxinas a través del canal de la membrana externa (106,107).

El T2SS de *P. aeruginosa* está formado por los sistemas Xcp y Hxc (100):

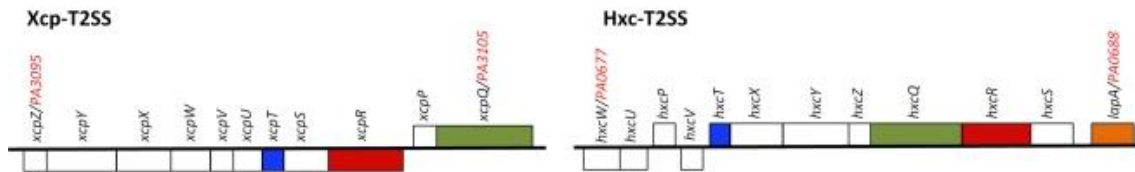


Figura 16. Sistemas Xcp y Hxc. Modificado de (100).

El sistema Xcp está codificado en un sistema de 12 genes (*xcpA*, *xcpP-Z*). Mutaciones en los genes *xcpP-Z* ocasionan la acumulación de elastasas (LasB), lipasas (LipA), fosfatasa alcalinas (PhoA) y fosfolipasa C (PlcH). El gen *xcpA* codifica la proteínas XcpA o PilD, clave en el funcionamiento del sistema, y que a su vez interviene en la formación del pili tipo IV. Los 14 sustratos secretados por este sistema son CbpD, LasA, LasB, LipA, LipC, LoxA, PaAP, PhoA, PlcB, PlcH, PlcN, PmpA, PrpL y ToxA. Las fosfolipasas PlcH y PlcN llegan al periplasma de la célula hospedadora siguiendo la ruta Tat, mientras que el resto de proteínas secretadas lo hacen a través de la ruta Sec (100).

Los genes pertenecientes al sistema Hxc son homólogos a los del sistema Xcp (*hxcP-Z*) a pesar de tener un orden distinto (Figura 16). Al igual que Xcp, en Hxc el funcionamiento de PilD es necesario. Sin embargo, a diferencia de Xcp, este sistema solo secreta la fosfatasa alcalina LapA y llega al periplasma de la célula hospedadora siguiendo la ruta Sec (100).

❖ Sistema de secreción tipo III (T3SS)

El T3SS es un máquina macromolecular compleja a la que pertenecen 5 familias diferentes: las familias Ysc, Inv-Mxi-Spa y Ssa-Esc, correspondientes a patógenos animales, y dos familias Hrp correspondientes a patógenos vegetales. La similitud entre estos sistemas no se basa en los resultados obtenidos tras estudios de secuenciación, sino en su funcionamiento, el cual revela la habilidad patogénica de las bacterias para adaptarse al medio en el que crecen (108).

El T3SS de *P. aeruginosa* pertenece a la familia Ysc, junto a los sistemas Yop de *Yersinia* spp. y Asc de *Aeromonas salmonicida*. Se descubrió en 1996, pero no fue hasta el 2005 cuando fue posible ver su estructura. Consta de un conjunto de proteínas que forman un complejo macromolecular que atraviesa la membrana interna bacteriana, el espacio periplásmico, la capa de peptidoglicano, la membrana externa bacteriana, el espacio extracelular y finalmente la membrana de la célula hospedadora para inyectar toxinas a la vez que modifica la respuesta inmune de la misma (108).

Estructuralmente está formado por un aparato de secreción, un aparato de traslocación y toxinas efectoras que son translocadas directamente desde la bacteria hasta el citosol de la célula hospedadora (Figura 17). Este proceso está mediado, a su vez, por proteínas chaperonas y reguladoras (108).

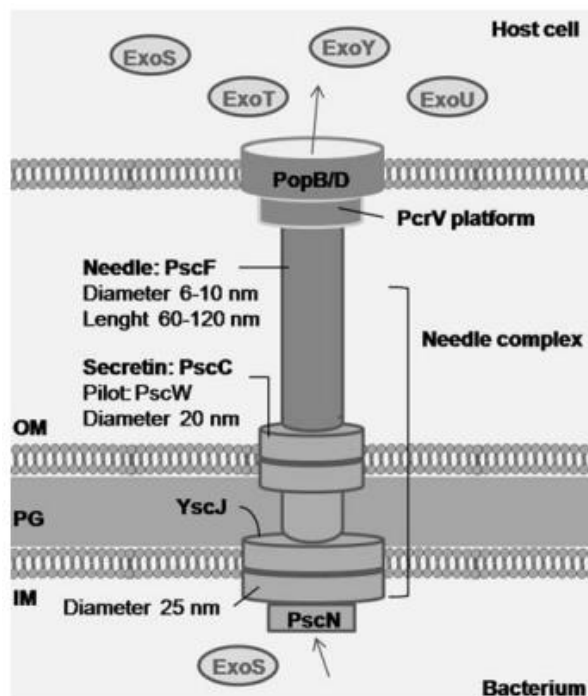


Figura 17. Estructura del T3SS de *P. aeruginosa* (108).

El aparato de secreción de *P. aeruginosa* está formado por un cuerpo basal con una estructura en forma de aguja, o inyectisoma, anclada a él (108). El cuerpo basal está formado por un componente de membrana interna, que contiene la proteína de secreción PscJ, y un componente de membrana externa, que contiene PscC. PscC se oligomeriza y junto con la lipoproteína PscW forma un canal en la membrana externa de la bacteria (108). El inyectisoma se ensambla por la

polimerización de las proteínas PscF y capta las toxinas efectoras del cuerpo basal al aparato de translocación que las transporta a través de la membrana plasmática hasta el citosol de la célula hospedadora (108). El aparato de translocación de *P. aeruginosa* está formado por las proteínas PopB, PopD y PcrV, las cuales son autosecretadas y necesarias para la formación del poro de translocación (100,108,109).

La citotoxicidad de *P. aeruginosa* está asociada con la secreción de proteínas efectoras ExoS, ExoT, ExoY y ExoU. No es habitual encontrarlas todas en una misma cepa, además ExoU y ExoS suelen ser mutuamente excluyentes. Sin embargo, se han visto cepas en las que ambas toxinas están presentes (110). La función de un sistema de secreción depende de la naturaleza de los efectores. Por ejemplo, los mecanismos de patogenicidad de PAO1 y PA14 son diferentes. PAO1 secreta ExoS y es una cepa invasiva, mientras que PA14 secreta ExoU y es citotóxica. Ambas cepas tienen un T3SS funcional, pero la presencia de ExoU en PA14 contribuye a un cambio en el estilo de vida de la bacteria (111). La expresión de las toxinas se relaciona con el pronóstico clínico de la infección, así como con el fenotipo de la bacteria. Mientras que ExoS provoca la muerte celular por apoptosis, ExoU lo hace por lisis bacteriana (108).

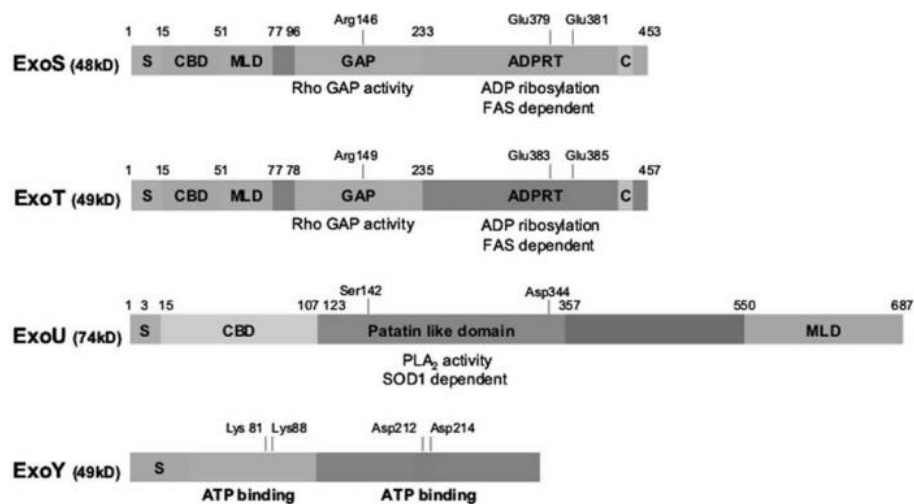


Figura 18. Estructura de ExoS, ExoT, ExoU y ExoY de *P. aeruginosa* (108).

ExoS está formada por 453 aminoácidos y consta de 5 dominios (Figura 18). Los 15 primeros aminoácidos conforman el dominio de secreción (S) que dirige las toxinas efectoras hacia el aparato del T3SS. El dominio CBD (*Chaperone Binding Domain*), ubicado entre los aminoácidos 15 – 51 se une a la proteína chaperona SpsC, necesario para la secreción de ExoS. Entre los aminoácidos 51 y 72 se

encuentra el dominio MLD (*Membrane Localization Domain*), el cual dirige las toxinas efectoras a la membrana plasmática de la célula hospedadora. Finalmente, los dominios GAP y ADP, responsables de las actividades GTPasa y ADP-ribosiltransferasa, respectivamente, se ubican entre los aminoácidos 96 – 233 y 233 – 453, respectivamente. Dentro del dominio GAP, la arginina (Arg) situada en la posición 146 es necesaria para su actividad GTPasa, y, dentro del dominio ADP, el ácido glutámico (Glu) situado en las posiciones 369 y 381 junto con el sitio de unión del cofactor FAS (C) entre las posiciones 418 – 429 son cruciales para la actividad ADPRT (108).

ExoT está formada por 457 aminoácidos y tiene un 76% de homología con ExoS. (Figura 18). Los dominios S, CBD y MLD se ubican en los primeros 77 aminoácidos. Los dominios GAP y ADP se sitúan en 78 – 325 y 235 – 457, respectivamente. El residuo de Arg, necesario para la actividad GTPasa se sitúa en la posición 149, y, los dos residuos de Glu y el sitio de unión C, necesarios para la actividad ADPRT, ocupan las posiciones 383, 385 y 422 – 433, respectivamente (108).

La fosfolipasa **ExoU** está formada por 687 aminoácidos (Figura 18). El dominio S se sitúa entre los primeros 15 aminoácidos y el dominio CBD, unido a la proteína chaperona SpcU, entre los aminoácidos 3 – 123. El dominio *patatin-like* situado en las posiciones 107 – 357 contiene los residuos de serina (Ser) y ácido aspártico (Asp) en las posiciones 142 y 344, respectivamente, necesarios para la actividad fosfolipasa A2. Finalmente, entre los aminoácidos 550 – 687 se localiza el dominio MLD (108).

ExoY es una adenil ciclasa formada por 378 aminoácidos (Figura 18). Contiene dos dominios de unión de ATP cuya actividad se determina por dos residuos de lisina (Lys) en las posiciones 81 y 88 y dos residuos de Asp en las posiciones 212 y 214 (108).

La biogénesis del inyectisoma del T3SS y la translocación de las toxinas efectoras están controladas por 36 genes codificados en 5 operones dentro del cromosoma del *P. aeruginosa* (Figura 19). La secreción y transcripción de las toxinas del T3SS dependen del activador transcripcional ExsA y de las proteínas ExsC, ExsD y ExsE. En condiciones basales la transcripción de ExsA está inhibida por su unión con ExsD y ExsC permanece unido a ExsE. Una vez que se activa el proceso de secreción por contacto con la célula hospedadora, ExsE es exportada al citosol de la célula hospedadora, lo que permite que ExsC se una a ExsD e inactive su actividad inhibitoria, lo que, finalmente, permite que ExsA se una a la región promotora del T3SS (108).

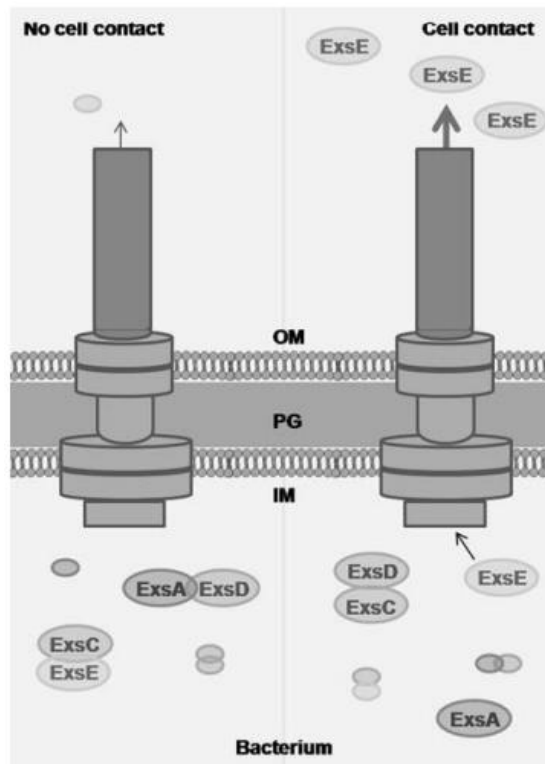


Figura 19. Regulación del T3SS de *P. aeruginosa* (108).

- El T3SS como principal determinante de virulencia de *P. aeruginosa*

A pesar de que el T3SS no es necesario para que *P. aeruginosa* infecte, su importancia en la virulencia de esta bacteria ha sido demostrada en modelos animales de infecciones crónicas e infecciones pulmonares agudas, asociando su presencia con un mal pronóstico y tasas de mortalidad elevadas. Estudios clínicos revelaron que en infecciones del tracto respiratorio inferior asociadas con la expresión de las toxinas ExoU, ExoS, ExoT o PcrV, el riesgo relativo de mortalidad era seis veces mayor (108).

El T3SS facilita el daño tisular y la invasión por el patógeno a través de diversos mecanismos. ExoS, ExoT, ExoY y ExoU inducen la muerte de las células epiteliales. A su vez, ExoT inhibe la cicatrización de heridas y ExoU la producción de surfactantes. Estas toxinas facilitan la entrada de la bacteria al torrente sanguíneo y activan los mediadores pro inflamatorios en el sistema circulatorio, derivando en un shock séptico (108).

El T3SS induce la respuesta proinflamatoria mediante la formación de IL-1 β , lo que provoca daño pulmonar. En la fase temprana de la respuesta inflamatoria, ExoU, ExoS, ExoT y ExoY inducen la muerte de neutrófilos y macrófagos, lo que impide la erradicación de *P. aeruginosa* de las vías aéreas. La no erradicación de la bacteria favorece la inyección de más toxinas por parte del T3SS, incrementando el daño pulmonar. Por todos estos factores, la patogenicidad del T3SS es un ciclo de autoinducción (108).

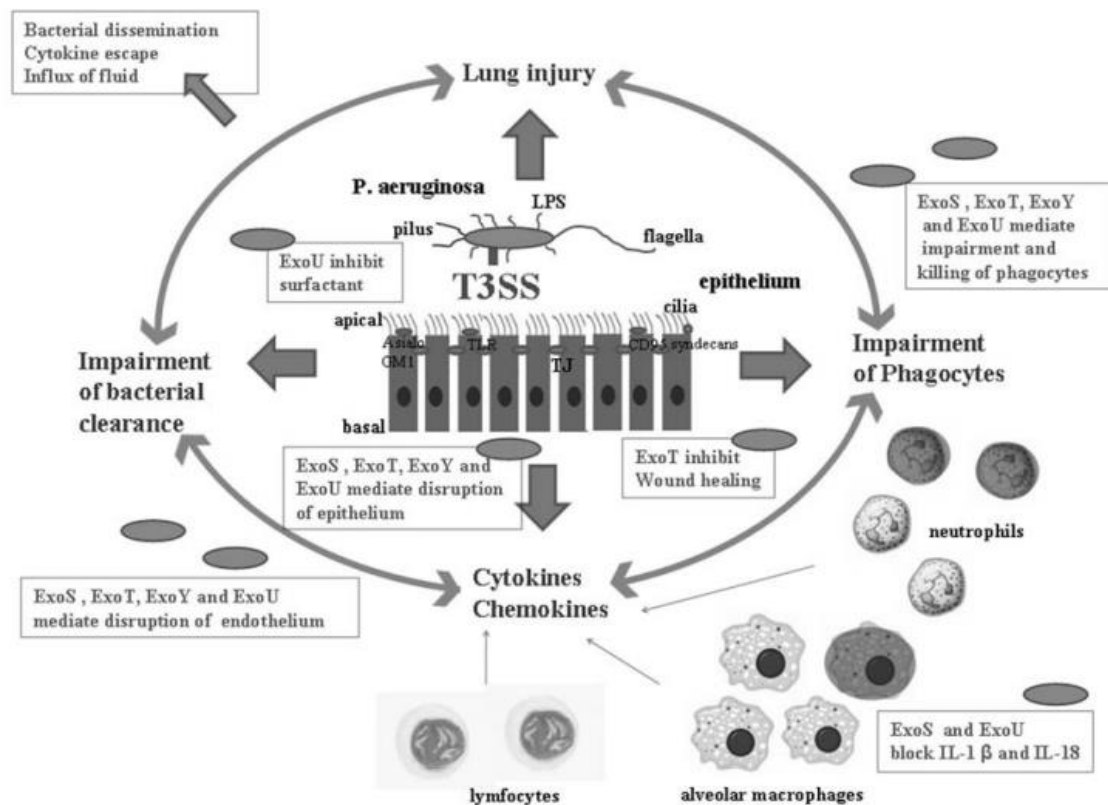


Figura 20. T3SS como principal determinante de virulencia en *P. aeruginosa* (108).

❖ Sistema de secreción tipo V (T5SS)

El T5SS es considerado como la ruta de secreción más simple. Mediante esta ruta se secretan proteínas asociadas a la adhesión microbiana y a la virulencia. El T5SS se divide en dos categorías, los mecanismos de autotransporte y los mecanismos de secreción TPS (*Two-partner secretion*) (112).

Los sustratos que son secretados mediante el mecanismo de autotransporte contienen en su extremo amino un péptido señal que permite su paso a través de la membrana interna, y en su extremo carboxilo un dominio beta formado por 12 láminas beta. Entre ambos extremos se encuentra un dominio denominado “pasajero” o dominio proteasa, el cual alberga el sitio catalítico del sustrato. Una vez que el sustrato llega al periplasma siguiendo la ruta Sec, inserta su extremo carboxilo en la membrana externa, formando un barril beta, con lo que el dominio pasajero queda expuesto en la superficie de la bacteria y se libera al medio extracelular por autoproteólisis o a través de alguna proteasa. En *P. aeruginosa* la esterasa EstA actúa como autotransportador (Figura 21) y en el genoma de PAO1 se han predicho la aminopeptidasa putativa PA0328 y la serina proteasa PA3535 (100,112).

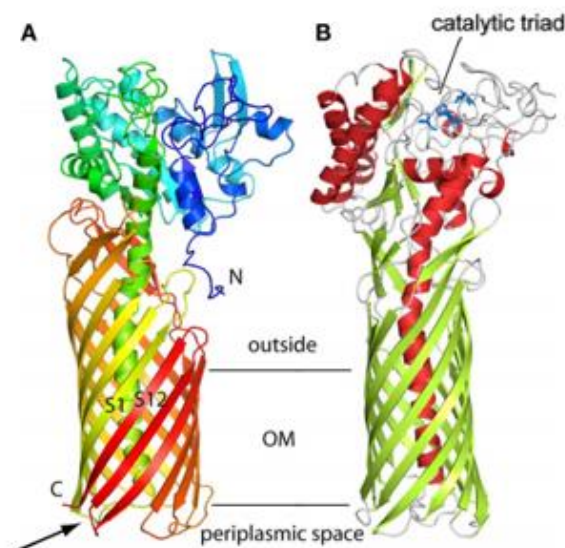


Figura 21. a) Estructura del autotransportador EstA. b) Vista rotada 90°. Las hélices α que conectan el dominio pasajero con el extremo del barril que está en contacto con el espacio periplásmico, están representadas en rojo y las láminas β que conforman la estructura en forma de barril, en verde. Modificado de (100).

Por otro lado, la secreción TPS se diferencia de la de autotransporte en que el dominio pasajero y el dominio beta son dos proteínas independientes, TpsA y TpsB, respectivamente. La proteína TpsB está precedida por un dominio POTRA (Polypeptide transport-associated). Una vez que el sustrato llega al periplasma a través de la ruta Sec, TpsB atraviesa la membrana externa y recluta TpsA formando así un barril beta de 16 láminas beta, quedando así TpsA expuesto en la superficie

bacteriana. Al igual que en el mecanismo de autotransporte, el sustrato se libera al medio extracelular mediante autolisis o alguna proteasa. En el genoma de PAO1 hay anotados 6 clusters (TPS1 – TPS6) los cuales agrupan los genes *lep* y *cupB* (100,112).

6. Sistema de secreción tipo VI (T6SS)

El género *Pseudomonas* presenta una gran diversidad ecológica y metabólica. Mediante estudios filogenéticos se reveló que el T6SS de *Pseudomonas* está distribuido en 5 sistemas o grupos filogenéticos (1 – 5). El grupo 1 a su vez se divide en dos subsistemas, donde el subsistema 1.2 es específico de *P. putida*, mientras que el 1.1 está presente en otras especies de *Pseudomonas*. El grupo 2 solo se ha encontrado en la cepa W619 de *P. putida* y en una cepa relacionada con *Pseudomonas* a la que se denominó “uncultured proteobacterium Q1”. Finalmente, el grupo 4 se divide en los subsistemas 4A, codificado en *P. aeruginosa* y algunas cepas de *P. fluorescens*, y 4B, encontrado en *P. putida* y *P. syringae* (Figura 22) (113–115).

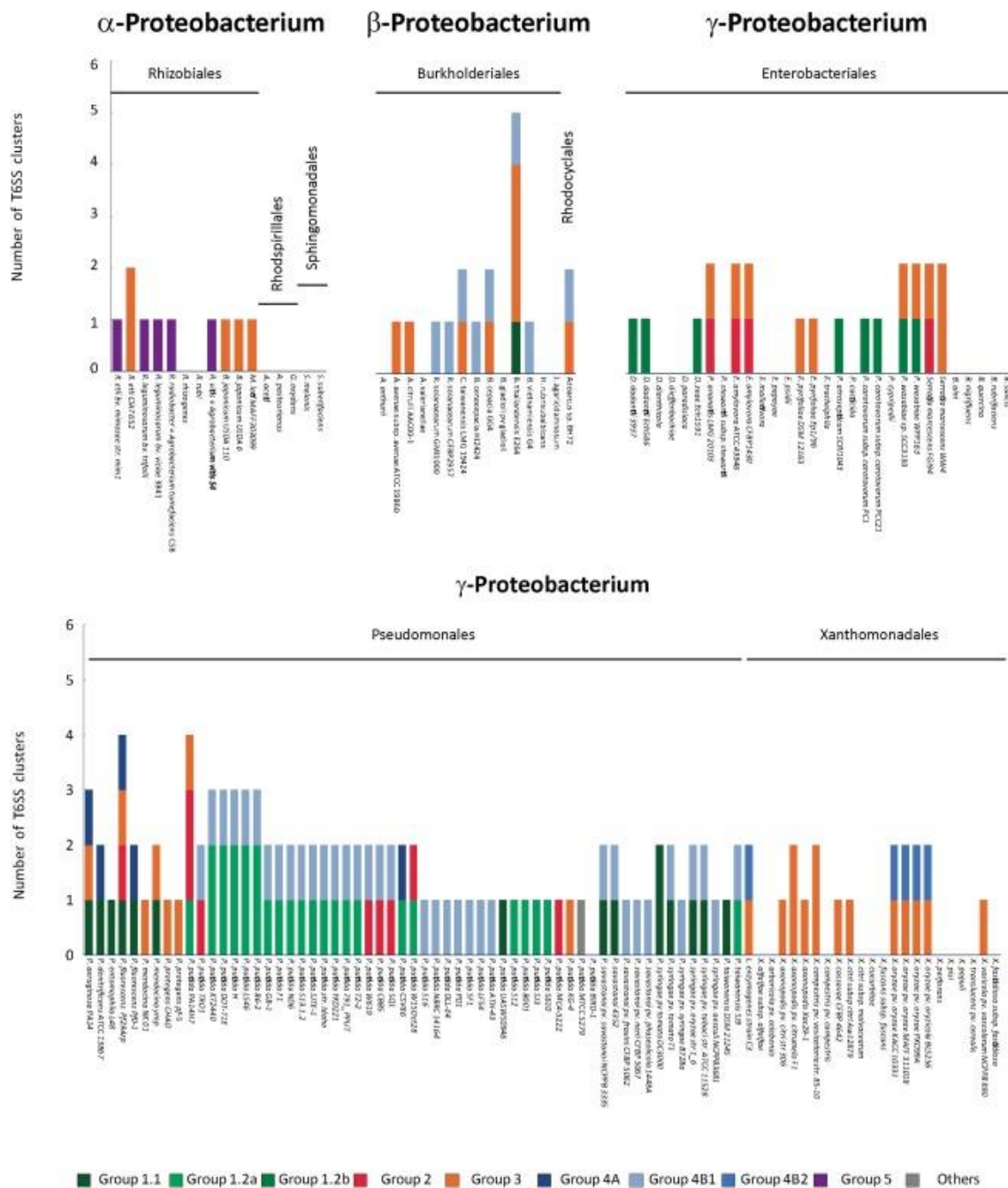


Figura 22. Distribución de los sistemas del T6SS entre Proteobacterias (114).

Se cree que las bacterias han adquirido el T6SS mediante transferencia horizontal de sus genes ya que frecuentemente se han encontrado loci dentro de islas genómicas. Algunas proteínas como Hcp y VgrG presentan homología con componentes estructurales de la cola de un bacteriófago, lo que sugiere un origen común, a la vez que se cree que la transmisión de sus genes se realiza a través de bacteriófagos (114).

6.1. Estructura y homología con el bacteriófago T4

La maquinaria del T6SS está compuesta por dos subunidades principales. La primera de ellas tiene homología con la cola del bacteriófago T4 (Figura 23) y la otra consiste en un complejo de peptidoglucanos que abarca la membrana y forma un complejo de anclaje (45,116).

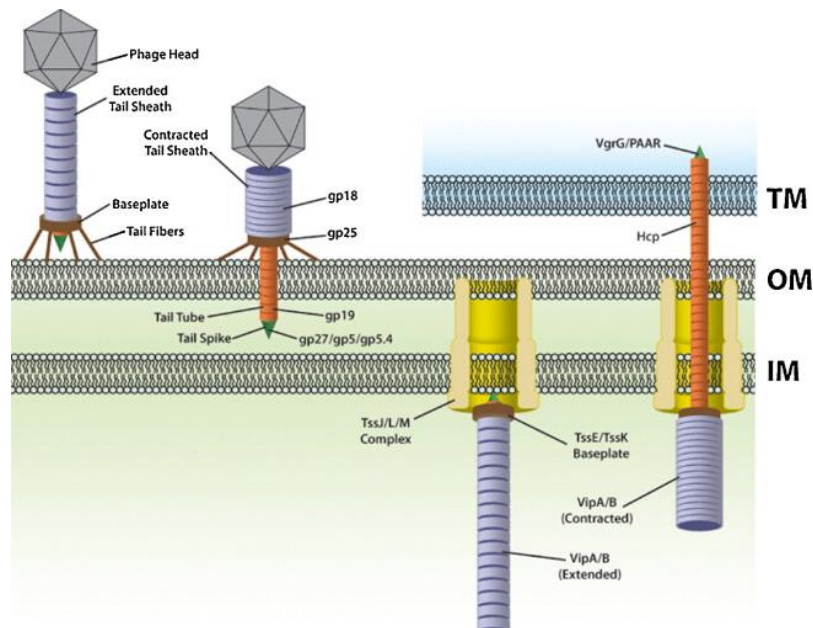


Figura 23. Bacteriófago T4 y su homología con la estructura del T6SS (115).

La presencia de dos proteínas conservadas es clave en el funcionamiento del T6SS. Estas proteínas son la proteína corregulada con hemolisina, **Hcp**, y la proteína con repeticiones valina-glicina, **VgrG** que forman la “jeringa” del mecanismo de inyección (Figura 24) (45).

La proteína Hcp forma una estructura anular hexamérica que va desde la cabeza hasta el final de la cola del bacteriófago. Tiene unos diámetros interno y externo de 4 y 8,5 nm, respectivamente. Se cree que Hcp en lugar de ser una proteína efectora como tal, actúa como un conducto a través del cual se liberan otras proteínas efectoras. A nivel de secuencia, Hcp presenta homología con la proteína gp19 del bacteriófago T4 (45,115,117).

La proteína VgrG se localiza en la punta distal del tubo formado por Hcp y tiene como función perforar la pared bacteriana (45). Además, VgrG presenta homología con la estructura del complejo

formado por las proteínas gp27 y gp5 del bacteriófago T4 (115,117). A su vez, esta proteína tiene asociada la proteína **PAAR**, la cual se pliega formando una estructura cónica, de punta afilada y base triangular, posada sobre VgrG. Su función varía según sus dominios terminales y extensión, pudiendo actuar como peptidasa, lipasa o nucleasa (45).

Una vez identificadas las proteínas que conforman la “jeringa” del mecanismo de inyección, se definen aquellas que actúan como recubrimiento de dicho mecanismo. Las proteínas **TssB** y **TssC** forman un complejo tubular, con una estructura similar a la de una rueda dentada, de 10 nm de diámetro interno, lo suficientemente grande para albergar el tubo formado por Hcp. El complejo TssB/C se contrae para promover la energía necesaria para la inyección de las proteínas efectoras en la célula diana. A su vez, este complejo tiene una estructura similar a la de la proteína gp18 del bacteriófago T4 (115).

En el caso de un bacteriófago, el mecanismo de inyección es utilizado una sola vez para inyectar el DNA en la célula hospedadora. Sin embargo, en el T6SS este mecanismo se reutiliza. Es en este proceso donde interviene la proteína **ClpV**, una ATPasa del tipo AAA+, responsable de reciclar las subunidades TssB y TssC para que estas puedan volver a ensamblarse, reiniciando así el sistema y preparándolo para una próxima inyección (118).

Para completar el mecanismo de inyección es necesario un nexo que conecte la estructura formada por Hcp y VgrG con la estructura de anclaje a la membrana. Este nexo es la proteína TssE, ubicada en la placa basal del bacteriófago. A su vez, esta proteína comparte el 40% de su secuencia con la proteína gp25 del bacteriófago T4, sin embargo, se diferencia de la misma en que no actúa como lisozima (45).

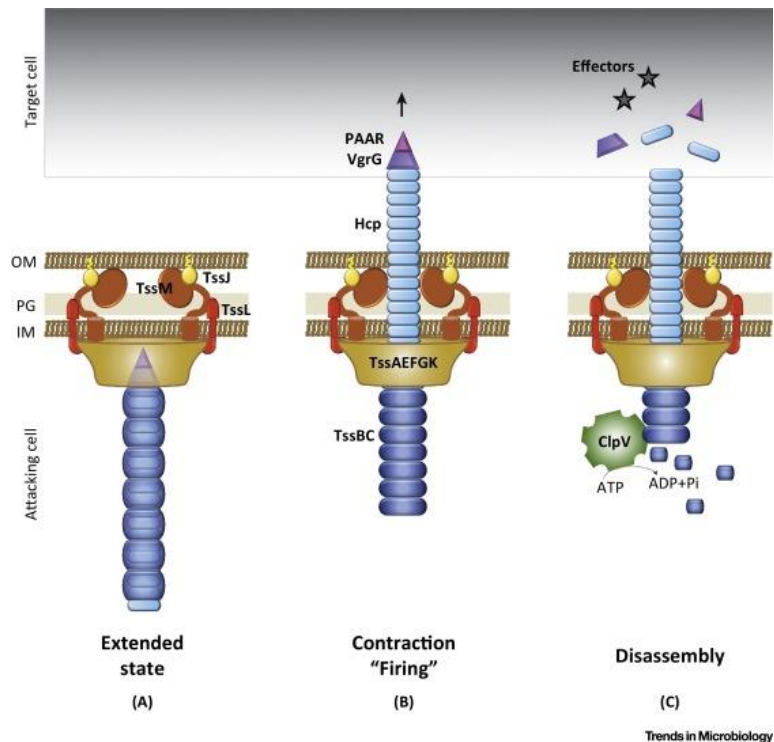


Figura 24. Mecanismo de inyección del T6SS (119).

6.2. El T6SS de *P. aeruginosa*

En *P. aeruginosa* el T6SS consta de 3 clústeres, denominados **H1-T6SS**, **H2-T6SS** y **H3-T6SS** (Figura 25-A), los cuales tienen codificadas 20 proteínas efectoras y 13 proteínas de inmunidad. Estudios genómicos indican que *hcp* y *vgrG* codifican los componentes del núcleo (core) de la maquinaria del T6SS. Se ha propuesto que los genes localizados aguas abajo del loci *vgrG* codifican efectores potenciales, la mayoría de los cuales actúan como fosfolipasas (111). Si bien, el cómo las proteínas efectoras son reconocidas y secretadas por el T6SS aún es algo que se está investigando, estudios recientes revelaron que los efectores pueden ser translocados por el T6SS mediante dos formas: bien unidos a componentes estructurales (efectores especializados) o bien mediante interacciones no covalentes con uno de los componentes core (efectores cargo). En ambos casos, los efectores están asociados con componentes de la estructura Hcp-VgrG-PAAR (119).

Dentro del T6SS de PAO1 se encuentran 10 genes *vgrG*. De manera interesante, ningún gen *vgrG* se encuentra en las inmediaciones del H2-T6SS. Sin embargo, el H2-T6SS de la cepa PA14 consta de un gen *vgrG* adicional que codifica una proteína de la familia Rhs (Figura 25-B) (111).

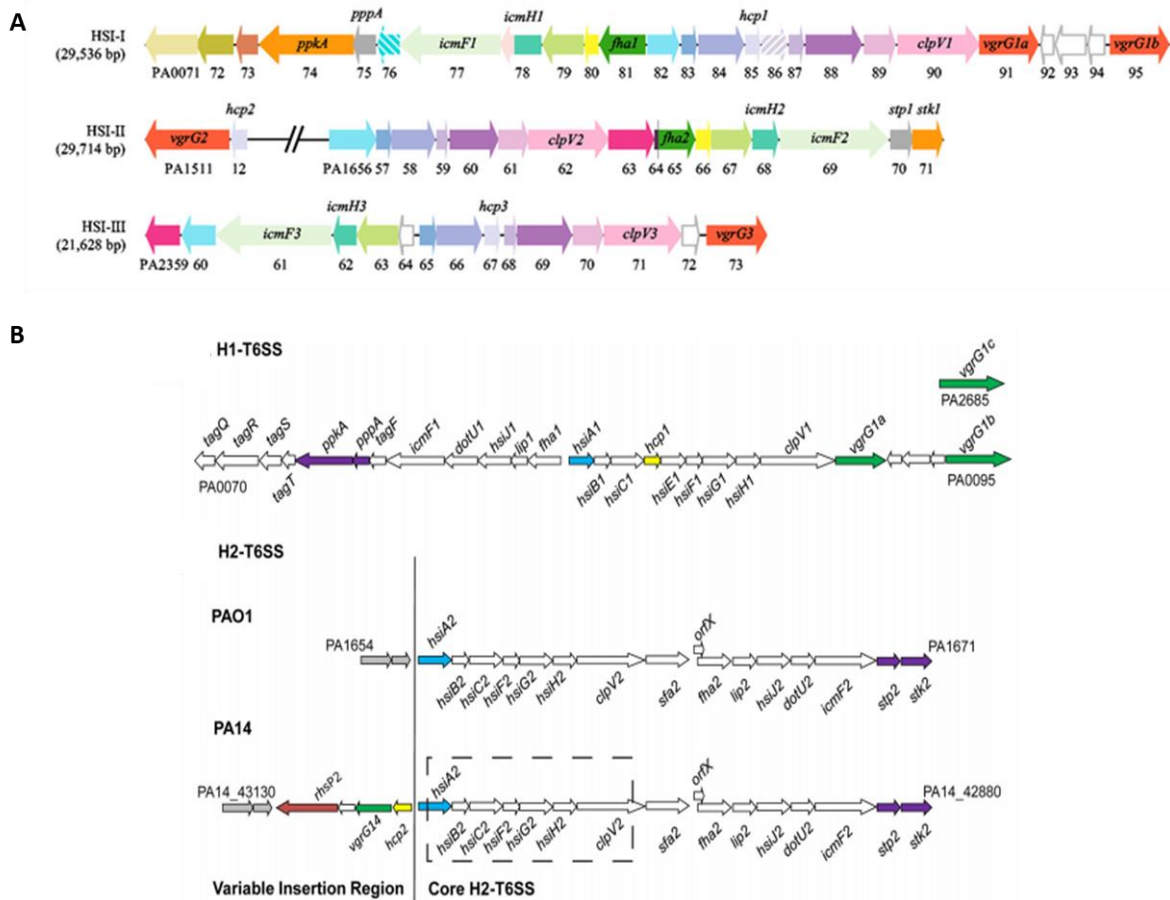


Figura 25. A) Clústeres del T6SS de *P. aeruginosa*. B) Organización de los clústeres H1-T6SS y H2-T6SS de *P. aeruginosa*. Las flechas representan la orientación de los ORF. *hsi* (azul) es un gen conservado en ambos clústeres, así como la mayoría de los componentes core (blanco). Los genes que codifican los componentes estructurales del T6SS se muestran en verde (*vgrG*) y amarillo (*hcp*). En rojo se muestra un gen de la familia Rhs, específico del H2-T6SS de PA14. En morado se marcan los genes que codifican las quinasas/fosfatasa serina-treonina que intervienen en el control post-translacional del H1-T6SS (*ppkA* y *pppA*) y se conservan en el H2-T6SS (*stp2* y *stk2*). El core del H2-T6SS se conserva en PAO1 y PA14, pero hay cuatro genes de este clúster que se encuentran en PA14 y no en PAO1 (111).

H1-T6SS actúa sobre células procariontas, mientras que H2-T6SS actúa frente a ambas, eucariotas y procariontas. Se sabe poco acerca de la función del H3-T6SS, pero se afirma que está relacionado con el H2-T6SS durante el proceso de infección (120).

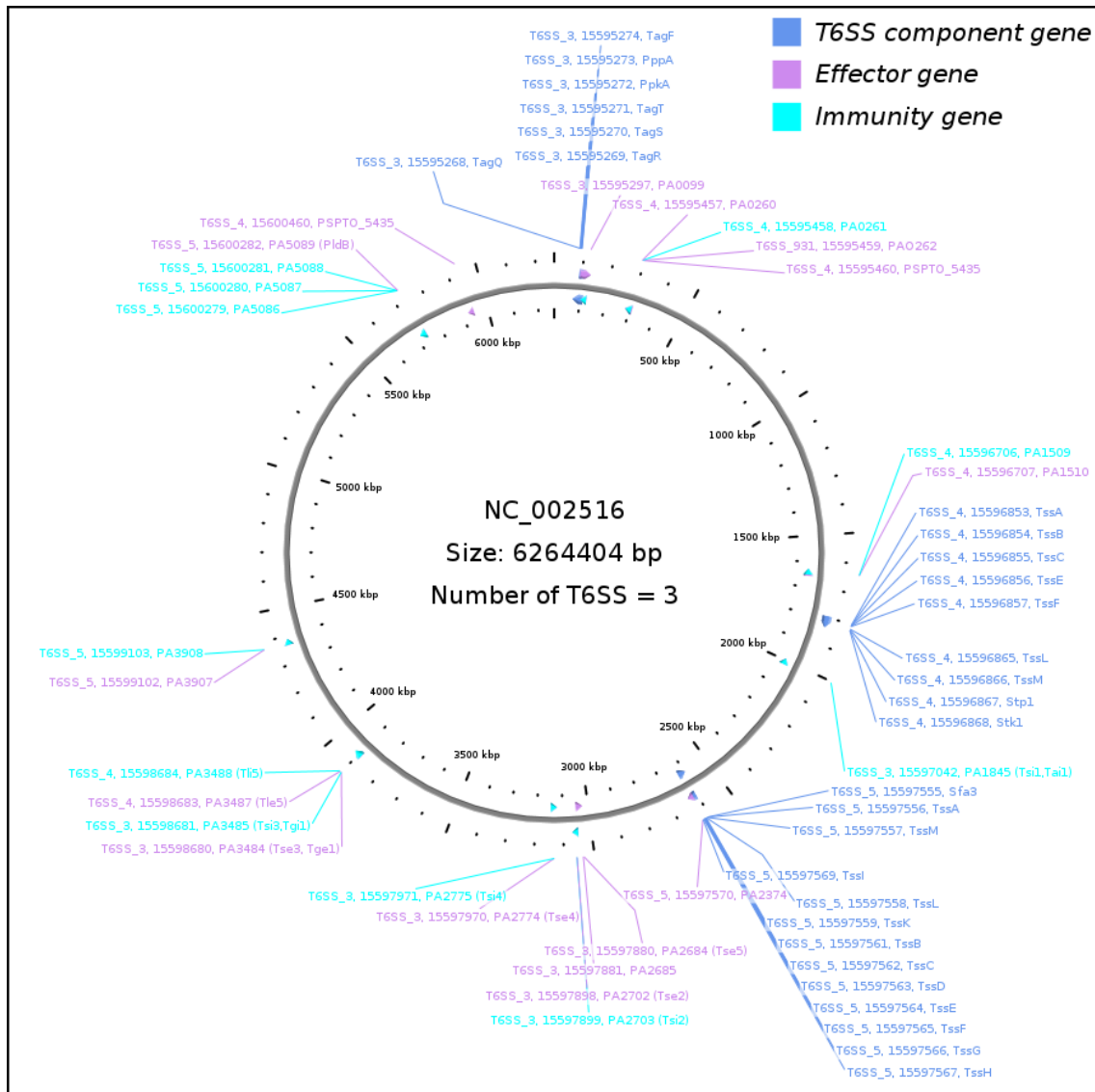


Figura 26. Localización de los componentes del T6SS en el genoma de PAO1 (121).

H1-T6SS fue el primer clúster en el que se descubrió actividad antibacteriana. Este clúster le confiere a *P. aeruginosa* una ventaja de crecimiento para competir contra otros microorganismos portadores del T6SS que coexisten en el mismo nicho. *P. aeruginosa* ataca a otras bacterias mediante la inyección de la proteína efectora **Tse2**, la cual actúa sobre el citoplasma de la célula diana, produciendo un efecto bacteriostático. A su vez, Tse2 tiene actividad ADP-ribosiltransferasa y, una vez secretada, se libera al citoplasma mediante la interacción con el factor de elongación Tu (EF-Tu) (112,122). Estudios previos demostraron que la secreción y estabilidad de Tse2 depende de Hcp1. Se vio que una gran cantidad de residuos conservados de Hcp1 son esenciales para las interacciones con Tse2, y por tanto, mutaciones, en particular, la sustitución de serina por glutamina en la posición 31

(S₃₁Q), disminuyen la concentración intracelular de Tse2 (123). Las proteínas efectoras **Tse1** y **Tse3** son inyectadas en el periplasma de la bacteria diana, hidrolizando el peptidoglucano y, beneficiando así, a *P. aeruginosa* en la competición bacteriana. Tse1 tiene actividad amidasa, y actúa sobre el ácido D-glutamil-meso-diaminopimelico del peptidoglucano, mientras que Tse3 tiene actividad muramidasa, y actúa sobre el punto de unión β -1,4 entre el ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina del péptidoglucano. La proteína efectora **Tse4** actúa sobre la bacteria diana creando un desajuste de iones, cambiando así la permeabilidad y generando poros en la membrana interna. **Tse5** es una proteína del tipo Rhs/YD con actividad antibacteriana que favorece a *P. aeruginosa* en la competición bacteriana. **Tse6** degrada los dinucleótidos NAD⁺ y NADP⁺, con lo que el metabolismo de la bacteria receptora se reduce y se produce un efecto bacteriostático. *P. aeruginosa* libera las proteínas de inmunidad, o antitoxinas, Tsi1 – 6 como defensa ante el efecto de sus propias proteínas efectoras y las de bacterias hermanas vecinas (112,122).

Como ya se mencionó anteriormente, **VgrG** contiene dos dominios homólogos a las proteínas gp27 y gp5 del bacteriófago T4. Las proteínas VgrG forman complejos triméricos que se utilizan como dispositivos punzantes para perforar las membranas y permitir el paso de proteínas o complejos macromoleculares. En algunos casos VgrG tiene dominios C-terminales homólogos a adhesinas, proteasas o proteínas de actina.

En el T6SS los dominios C-terminales de VgrG reconocen las toxinas a secretar. El H1-T6SS de *P. aeruginosa* tiene asociadas tres proteínas VgrG: **VgrG1a**, **VgrG1b** y **VgrG1c** (124). El dominio C-terminal de **VgrG1a** reconoce, a través de PAAR, y secreta la proteína efectora Tse6 (124). Recientemente se descubrió la actividad de una nueva proteína efectora, **Tse8** que es secretada por VgrG1a y tiene actividad amidasa. **Tse8** interactúa con el transamidosoma de la célula diana y altera su metabolismo limitando la capacidad de síntesis de proteínas. La proteína de inmunidad Tsi8 protege a *P. aeruginosa* del efecto tóxico de Tse8 (125). Se han identificado además las tres proteínas efectoras hipotéticas codificadas por los genes **PA0801** (codificante de una peptidasa de la familia M4), **PA2778** (codificante de una proteína con dominio peptidasa C39) y **PA3272** (codificante de una NTPasa), las cuales podrían ser toxinas secretadas por el T6SS, y cuya implicación aún está siendo estudiada (125). **VgrG1b** no pertenece al H1-T6SS como tal, sino a un clúster adyacente al mismo que abarca un rango de proteínas (PA0095 – PA0101) entre las cuales está codificada la proteína efectora **Tse7** (Figura 27). Este efector es el primero del T6SS con actividad nucleasa identificado en *P. aeruginosa*, así como el primer miembro caracterizado de la familia HNH con un dominio Tox-GHH2.

Su expresión detiene el crecimiento de la bacteria receptora degradando su DNA. Al igual que para las otras proteínas efectoras, *P. aeruginosa* libera la antitoxina Tsi7 como defensa ante este efector (126). Finalmente, **VgrG1c** secreta la toxina RhsP1 (Tse5) que, como ya se mencionó anteriormente, inhibe el crecimiento bacteriano (124,127).

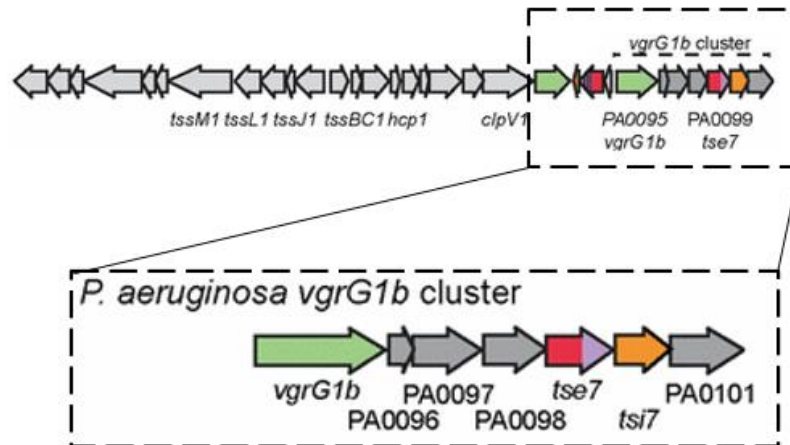


Figura 27. H1-T6SS de *P. aeruginosa* y cluster VgrG1b. Modificada de (126).

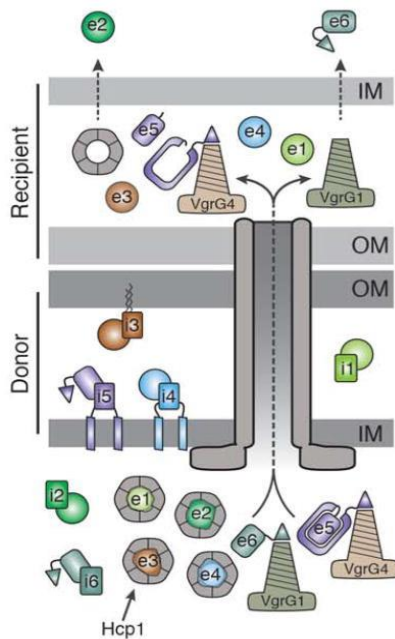


Figura 28. Secreción de proteínas efectoras por el H1-T6SS. Las proteínas efectoras Tse1-4 (representadas como e1 – e4) son sustratos que dependen de Hcp1 para ser exportados a la célula receptora. Tse5 (representada como e5) y Tse7 (no representada) dependen de las proteínas VgrG a través del dominio PAAR. Tse6 (representada como e6) depende de la proteína VgrG a través de la proteína chaperona EagT6. (128)

Los clústeres H2-T6SS y H3-T6SS actúan frente a procariontas y eucariotas. Las proteínas efectoras que se encuentran en estos son aquellas pertenecientes a la familia de lipasas Tle. Mediante el H2-T6SS se translocan las lipasas **Tle1**, **Tle3**, **Tle4** y **Tle5a (PldA)** en el periplasma de la célula procarionta hospedadora, y **Tle5b (PldB)** mediante el H3-T6SS (129). Así mismo, *P. aeruginosa* secreta las antitoxinas Tli1 – 5 como proteínas de inmunidad frente a esos efectores. PldA, PldB y Tle1 son efectores cargo independientes de PAAR, por lo que directamente se unen a VgrG4b, VgrG5 y VgrG1, respectivamente, para ser secretadas (127).

A pesar de que *P. aeruginosa* es considerado como un patógeno extracelular, se ha demostrado su capacidad para invadir células epiteliales. Para ello es necesario que la membrana epitelial tenga unas características basolaterales que permitan la entrada de *P. aeruginosa* (120):

- Mediante la ruta fosfoinositol-3-kinasa (PI3K) se fosforilan los lípidos de la membrana epitelial y se generan productos que activan la proteína Akt. Esta proteína, al fosforilarse, modifica la membrana apical y crea un ambiente basolateral que permite la entrada de *P. aeruginosa* en la célula epitelial.
- La inyección de las proteínas PldA y **VgrG2** por el H2-T6SS y PldB por el H3-T6SS activan la ruta PI3K/Akt. Para activar esta ruta, VgrG2 interacciona con el complejo de tubulina gamma (γ -TuRC) mediante un mecanismo aún desconocido.

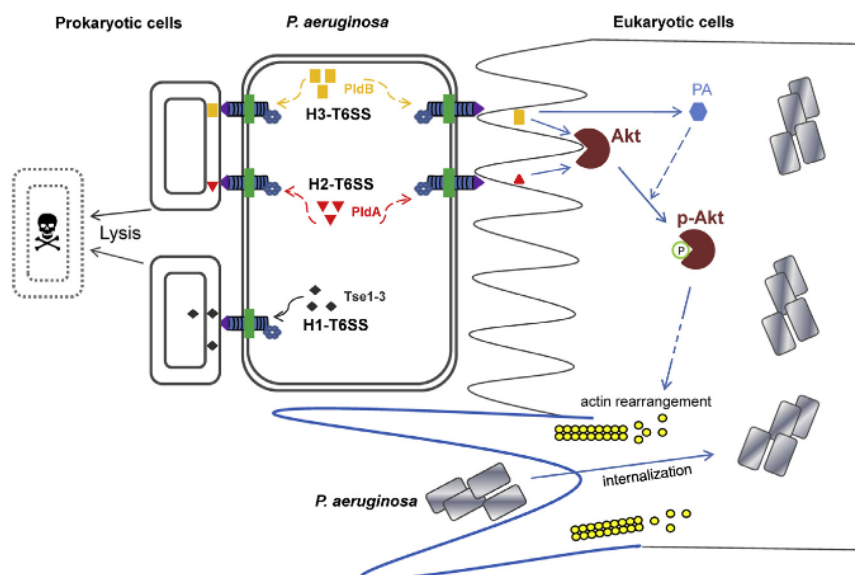


Figura 29. Representación esquemática del funcionamiento de los clusters del T6SS (120).

6.2.1. Regulación del T6SS de *P. aeruginosa*

La regulación del T6SS en *P. aeruginosa* es un mecanismo complejo, controlado a distintos niveles mediante diferentes sistemas de regulación, a través de los cuales destaca la importancia del T6SS como factor de virulencia en el ciclo de vida de este microorganismo.

❖ Regulación transcripcional

Las proteínas tipo histonas asociadas a nucleóide (H-NS) funcionan como reguladores globales que controlan la expresión de un gran número de genes a lo largo del genoma bacteriano. Estas proteínas se unen a las regiones ricas en AT del cromosoma y reprimen la transcripción de los genes que se encuentren a su alrededor. En *P. aeruginosa* la proteína H-NS **MvaT** reprime la expresión de los clústeres H2 y H3-T6SS (130).

Los factores sigma (σ) permiten reconocer las secuencias promotoras de ADN, con ayuda de las proteínas EBP (*Enhancer binding protein*), para iniciar la transcripción. En *P. aeruginosa*, el factor σ^{54} , codificado por el gen *rpoN*, regula la expresión de los genes del T6SS. RpoN activa el operón PA2364-59 del H3-T6SS y reprime la expresión del H2-T6SS y el operón PA2365-74 del H3-T6SS. En los clústeres H2 y H3 se encuentran codificadas las EBP Sfa2 y Sfa3, que actúan como factores de activación del factor sigma. Sfa2 participa, junto con RpoN, en la represión del H2-T6SS, sin embargo, no hay indicios de que Sfa3 participe en la expresión del H3-T6SS (45,131).

El **QS** regula la expresión de los tres clústeres del T6SS de *P. aeruginosa*, mediante los sistemas Rhl, Las y MvfR. H1-T6SS está regulado negativamente por LasR y MvfR, mientras que los sistemas Las, Rhl y MvfR regulan positivamente a H2 y H3-T6SS (45,130,131).

El regulador de captación de hierro **Fur** controla la expresión de los genes involucrados en la captación de hierro y en la resistencia frente al estrés ácido. En presencia de hierro (Fe) se forma el complejo Fe-Fur. La expresión del cluster H2-T6SS se induce bajo condiciones limitadas de hierro mediante la actividad del represor **Fur** (45,131). Así mismo, el locus PA1657-70, así como *hcpC*, *vgrG2a* y *vgrG6* están reprimidos bajo la acción del represor **PsrA**, un factor transcripcional implicado en el metabolismo de ácidos grasos y la biosíntesis del antígeno O (45,130).

❖ Regulación post-transcripcional

El sistema de dos componentes **GacS/GacA** controla la expresión de los genes implicados en el paso de infección aguda a crónica por *P. aeruginosa*. El sistema de regulación post-transcripcional **RsmY/RsmZ/RsmA** controla la expresión de más de 500 genes, incluyendo aquellos del H1-T6SS. Así mismo, la transcripción de RsmY y RsmZ depende del sistema GacS/GacA, el cual es inducido por LadS y reprimido por RetS. La represión por RetS se debe a la formación de heterodímeros inactivos con GacS que previenen la fosforilación como respuesta del regulador GacA. Esto sugiere que RetS/GacS/GacA y RsmY/RsmZ/RsmA forman parte de una única ruta, donde RsmY y RsmZ actúan como intermediarios entre las señales de entrada y las respuesta de salida (45,130,132).

Aunque es un mecanismo aún desconocido, RsmY y RsmZ regulan, de manera conjunta e inversa, la expresión de los genes del T6SS y T3SS mediante cambios en los niveles de c-di-GMP. El incremento en los niveles intracelulares de c-di-GMP, mediado por mutaciones en *retS* o la sobreexpresión de LadS y Wsp, inducen la expresión de los genes del H1-T6SS, a la vez que inhiben la síntesis del T3SS (45).

❖ Regulación post-translacional

La actividad del H1-T6SS depende de la ruta de fosforilación de treonina (**TPP**), conformada por PpkA, PppA, TagR, TagS, TagT, TagQ y Fha1. TagRSTQ forman un complejo de señalización ante ataques externos. En respuesta a esta señal, la quinasa serina-treonina PpkA se dimeriza, autofosforila y fosforila Fha1. Una vez fosforilado, Fha1 recluta los componentes estructurales del H1-T6SS para su montaje y secreción de proteínas efectoras. Esta expresión del H1-T6SS se ve reprimida por la acción de la fosfatasa serina-treonina PppA, que desfosforila Fha1. Se ha demostrado, además, la activación del H1-T6SS, independientemente de la fosforilación de Fha1, mediante la inactivación del represor **TagF** (45,133).

❖ Antibióticos y metales traza como inductores del T6SS

Los antibióticos actúan como moléculas de señalización que inducen nuevos fenotipos de *P. aeruginosa*, sugiriendo que las bacterias pueden detectar productores de antibióticos en el

ambiente. Estos nuevos fenotipos favorecen el crecimiento de *P. aeruginosa* y mejoran su resistencia a condiciones de estrés (92).

Como ya se mencionó con anterioridad, la polimixina B actúa sobre el lipopolisacárido de la membrana, degradando el lípido A. Ho y colaboradores estudiaron que esta degradación actúa como señal activadora de un contrataque por parte del T6SS, concluyendo que en presencia de polimixina B se incrementa la actividad del H1-T6SS (134).

Se ha demostrado que la formación de biofilm y la actividad del H1-T6SS se corregulan bajo concentraciones subinhibitorias de antibióticos, como kanamicina. Esta corregulación depende de la ruta de señalización Lad/Gac/Rsm, la cual debe ser completamente funcional para que se active la respuesta de *P. aeruginosa* ante esta condición (92).

Diversos estudios han demostrado una variedad de señales ambientales que regulan la expresión de los genes del T6SS, incluyendo la concentración extracelular de hierro, fosfato y magnesio. En *P. aeruginosa* se ha visto que la expresión del H2-T6SS se reprime en presencia de hierro (135). Así mismo, la proteína TseF, codificada por el gen *PA2374*, secretado por el H3-T6SS, funciona de manera sinérgica con los sistemas de captación de hierro. TseF se incorpora en las vesículas de membrana externa (OMV) mediante la interacción con PQS. TseF facilita la secreción de hierro mediante la unión del receptor FptA y la porina OprF (136). El H2-T6SS interviene en la secreción de la proteína efectora y captadora de cobre Azu. La adquisición de cobre mediada por el T6SS supone una ventaja en el crecimiento, competición bacteriana y virulencia (137).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Pseudomonas aeruginosa es uno de los principales patógenos oportunistas asociados con infecciones en pacientes que sufren patologías respiratorias crónicas como la fibrosis quística (FQ) y las bronquiectasias no asociadas a la FQ (BNFQ). El estudio de las infecciones pulmonares crónicas asociadas con este patógeno se ha centrado principalmente en las bronquiectasias asociadas a la FQ, en las que los pacientes una vez que son diagnosticados se someten a una rigurosa terapia antibiótica desde una edad muy temprana durante toda su vida. *P. aeruginosa* puede sobrevivir por largos períodos de tiempo en el tracto respiratorio del paciente con FQ, bajo una elevada presión impuesta por el sistema inmunológico y el tratamiento con antibióticos. Todo ello, debido al cambio de vida planctónica a sésil que adopta en el biofilm y a la evolución adaptativa mediada por la variación genética. El fenotipo mucosoide, la hipermutabilidad y adquisición de resistencia a antibióticos por mutaciones cromosómicas, así como la modulación de la expresión de sus factores de virulencia que le permiten evadir al sistema inmunitario, son algunas de las características más relevantes de este patógeno durante la infección pulmonar crónica. Por el contrario, en los pacientes con BNFQ, las infecciones por *P. aeruginosa* suelen ocurrir en edades más avanzadas y los tratamientos de antibioterapia suelen ser más cortos. Por tanto, las cepas de pacientes con BNFQ muestran menos tasas de resistencia a los antibióticos, así como características fenotípicas y genotípicas distintas en comparación con las cepas de pacientes adultos con FQ. En muestras respiratorias de pacientes con FQ y BNFQ se han encontrado niveles elevados de metales traza como hierro, cobre y zinc que contribuyen a la gravedad de la enfermedad. Así mismo se ha visto que la presencia de alguno de estos elementos traza inducen la formación de biofilm y modulan la expresión de determinados factores de virulencia en *P. aeruginosa*, entre los que podrían encontrarse el T6SS. Por otro lado, hay evidencias de que concentraciones subinhibitorias de ciertos antibióticos como los aminoglucósidos afectan la expresión del T6SS. La inducción del T6SS de *P. aeruginosa* por ciertos antibióticos como los aminoglucósidos o betalactámicos podría ayudarnos a comprender como esta bacteria responde a otras especies competidoras productoras de antibióticos en determinados nichos complejos como pulmón del paciente con FQ. Hoy en día los estudios de secuenciación masiva de los genomas de completos han contribuido a la caracterización de la evolución de *P. aeruginosa* durante las infecciones pulmonares crónicas, pudiendo analizar cambios hasta el nivel de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Todo ello nos ha permitido conocer más a fondo las bases genéticas de la resistencia y la virulencia de *P. aeruginosa*, así como que grado de relación genética define la clonalidad entre cepas en determinados estudios epidemiológicos.

En base a lo anterior, el objetivo general de esta tesis fue analizar el resistoma y viruloma de aislados de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con fibrosis quística y bronquiectasias del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla en Santander, Cantabria, para lo que se establecieron 6 objetivos específicos:

- Estudiar mediante un método estandarizado la actividad *in vitro* de antimicrobianos de interés clínico frente a las dos colecciones de aislados.
- Determinar la relación clonal entre los diferentes aislados mediante técnicas de epidemiología molecular.
- Secuenciar los genomas completos de un número representativo de aislados de cada uno de los grupos clonales e identificar los genes relacionados con la resistencia a los antibióticos y los factores de virulencia.
- Identificar la presencia y distribución de los genes efectores de los sistemas de secreción tipo III y tipo VI.
- Estudiar la virulencia de una selección de aislados representativos en modelos *in vivo* e *in vitro*.
- Analizar el efecto de las concentraciones subinhibitorias de antibióticos y elementos traza, como zinc, cobre y hierro, en la expresión del T6SS.

METODOLOGÍA

1. Cepas bacterianas, medio y condiciones de cultivo

Un total de 198 aislados de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos en el período comprendido entre el 1 de enero de 2007 y el 31 de diciembre de 2016 se recuperaron del cepario general del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, donde estaban conservados a -80°C en criotubos (SARSTEDT Inc., Nümbrecht, Alemania) con 1 ml de caldo nutritivo estéril con glicerol al 20%.

Los aislados procedían de diferentes especímenes clínicos de 23 pacientes con fibrosis quística (FQ, n=123 aislados) y de 17 pacientes con bronquiectasias no asociadas a fibrosis quística (BNFQ, n=75 aislados) (Tabla A1, Anexo 1). Los datos de la procedencia de los aislamientos fueron obtenidos a través del Sistema Informático del Servicio de Microbiología. La identificación de los aislados a nivel de especie se realizó mediante el sistema automatizado VITEK® 2 Compact (bioMérieux, S.A, Marcy l'Etoile, Francia), utilizando las tarjetas VITEK® 2 GN, para identificación de bacilos gramnegativos fermentadores y no fermentadores (bioMérieux). La confirmación de la identificación se llevó a cabo mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Desorción/Ionización láser asistida por matriz-Tiempo de vuelo) en el sistema automatizado VITEK®MS ((bioMérieux), utilizando la base de datos SARAMIS MS-IVD, versión 2.0 (Anagnos Tee GMBH, bioMérieux), según las especificaciones del fabricante.

Se utilizaron además las cepas de referencia de *P. aeruginosa* PAO1 (2), PA7 (4), UCBPP-PA14 (3), ATCC® 27853 (138) y la cepa clínica Pae221 (139).

Las bacterias se cultivaron de manera rutinaria en caldo Mueller Hinton II (Becton, Dickinson and Company), Mueller Hinton Agar (Becton, Dickinson and Company) y medio Agar sangre (Oxoid, Thermo Fisher). Los cultivos en Mueller Hinton Agar (MHA) y en Agar Sangre fueron útiles a la hora de estudiar la morfología colonial y ver la presencia de hemólisis.

Los cultivos se llevaron a cabo a 37°C, tanto en condiciones estáticas como en agitación. En el caso del cultivo en agitación la velocidad empleada fueron 175 rpm en un agitador orbital SH MINI (Control Técnica, S.L, España).

2. Determinación de la sensibilidad a los antibióticos

Los datos previos de sensibilidad a los antibióticos de los aislados clínicos de *P. aeruginosa* analizados en este estudio fueron obtenidos mediante el VITEK® 2 Compact, utilizando las tarjetas VITEK® 2 AST-N 389 (bioMérieux), según las indicaciones del fabricante. No obstante, se confirmaron los datos de sensibilidad antibiótica mediante la determinación de las CMI por el método estandarizado de microdilución en caldo, según las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (140).

Para la determinación de las CMI se emplearon 15 antibióticos pertenecientes a diferentes categorías de agentes antimicrobianos antipseudomónicos: aminoglucósidos (gentamicina [GEN], tobramicina [TOB] y amikacina [AK]), carbapenémicos (doripenem [DOR], imipenem [IMP] y meropenem [MER]), cefalosporinas (cefepime [FEP] y ceftazidima [CAZ]), fluoroquinolonas (ciprofloxacino [CIP] y levofloxacino [LEV]), penicilinas + inhibidores de betalactamasas (piperacilina-tazobactam [TZP]), monobactámicos (aztreonam [AZT]), ácidos fosfóricos (fosfomicina [FOS]) y polimixinas (colistina [COL]). (Tabla A2 del Anexo 2).

Este procedimiento se llevó a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo en U (Deltalab, España), distribuidos en 12 columnas (1-12) y 8 filas (A-H). Las soluciones madre de cada antibiótico se prepararon a una concentración de 4096 µg/ml, las cuales se diluyeron posteriormente para obtener las soluciones de trabajo específicas para cada antibiótico que se muestran a continuación:

- AK, FEP, AZT y CAZ: 256 µg/ml
- PIP: 512 µg/ml
- IMP, MER, DOR, GEN, TOB: 128 µg/ml
- LEV, CIP, COL: 64 µg/ml
- FOS: 1024 µg/ml
- Tazobactam: 4 µg/ml

Seguidamente se llenaron todos los pocillos de la placa con 50 µl de caldo Mueller-Hinton (con cationes ajustados), con excepción de los ocho pocillos de la primera columna, los cuales se llenaron con 100 µl del antibiótico a su concentración de trabajo. Posteriormente, se realizaron

diluciones seriadas con una pipeta multicanal hasta la columna número 11, dejando los pocillos de la columna número 12 como control positivo de crecimiento, donde se añade el inóculo bacteriano. Los inóculos de cada uno de los aislados de *P. aeruginosa* se prepararon a partir de cultivos frescos incubados durante toda la noche en placas de MHA, de los cuales se tomó con un asa de siembra desechable una cantidad apropiada de masa bacteriana y se resuspendió en una solución de NaCl al 0,9% (p/v) hasta lograr obtener una suspensión de 10^8 UFC/ml, la cual se ajustó en un densitómetro (Densimat, bioMérieux) con la que corresponde al estándar de 0,5 de la escala de McFarland (equivalente a $1-2 \times 10^8$ UFC/ml). De esta suspensión se realizó una dilución 1:100 en caldo Mueller-Hinton, por lo que se obtiene una concentración de 10^6 UFC/ml. Finalmente se añadieron 50 μ l de esa suspensión en cada pocillo, obteniendo así una concentración final de 5×10^5 UFC/ml. Posteriormente se incubaron las placas a 37°C durante 16-20 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la lectura de los resultados. La CMI se definió como la menor concentración de antibiótico que inhibía completamente el crecimiento bacteriano. Para el control de calidad de la determinación de las CMI se emplearon las cepas de referencia *P. aeruginosa* ATCC® 27853, *Escherichia coli* ATCC® 25922 y *E. coli* ATCC® 35218.

Los puntos de corte utilizados para la interpretación de los resultados fueron los recomendados por el CLSI y/o el European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), según correspondía. De esta forma los aislados se clasificaron en sensibles (S), intermedios (I) o resistentes (R).

2.1. Definición de los fenotipos de resistencia a los antimicrobianos

De acuerdo con los perfiles de sensibilidad antibiótica obtenidos, se definieron los fenotipos de resistencia para *P. aeruginosa*, siguiendo los criterios consensuados por un comité internacional de expertos (25):

- MDR (multirresistente): el aislado bacteriano es resistente al menos a tres antibióticos en tres o más categorías de agentes antimicrobianos antipseudomónicos mencionados anteriormente en esta sección.

- XDR (extremadamente resistente): el aislado bacteriano es resistente al menos a un antibiótico en todas las categorías, excepto en una o dos de ellas (es decir, los aislados bacterianos siguen siendo S o I solo a una o dos categorías)
- PDR (panresistente): el aislado bacteriano es resistente a todos los antibióticos en todas las categorías. Queda establecido que para que un aislado sea definido como PDR, se deben determinar las CMI de todos los antibióticos en todas las categorías de agentes antipseudomónicos utilizando métodos de referencia; de lo contrario, el aislado será definido como MDR, XDR y como potencial PDR hasta que se prueben todos los antibióticos en todas las categorías.

Aquellos aislados no susceptibles al menos a un antibiótico en 1 o 2 categorías de antipseudomónicos, se consideraron modR (moderadamente resistentes) y los que eran sensibles a todos los antibióticos empleados se consideraron multiS (multisensibles), todo ello de acuerdo a lo descrito anteriormente por Cabot y colaboradores (141).

3. Extracción de DNA

Para la extracción rutinaria del ADN de los aislados de *P. aeruginosa*, válido para la amplificación por PCR, se utilizó la resina InstaGene™ Matrix (Bio-Rad Laboratories, Inc, Berkeley CA, EE.UU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para ello, se partió de un cultivo fresco en placa de MHA y se resuspendieron 2-3 colonias en 100 µl de resina en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml (Eppendorf). Se incubó a 56°C durante 20 minutos. Seguidamente, el tubo se agitó en un mezclador de vórtice (vórtex) durante 10 segundos y se incubó a 100°C durante 8 minutos. Transcurrido ese tiempo, se agitó nuevamente en vórtex y se centrifugó 5 minutos a 14 000 rpm. Finalmente, se extrajo el sobrenadante y se conservó a -20°C hasta su utilización.

4. Extracción y cuantificación de ADN genómico

La extracción de ADN genómico de los aislados de *P. aeruginosa* se llevó a cabo utilizando el kit "GeneJet genomic DNA purification kit" (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El primer paso consistió en sembrar una colonia bacteriana en tubos con 3 ml de caldo Mueller Hinton (MHB) que se incubaron a 37°C, con agitación a 175 rpm durante 24 horas.

Al día siguiente, se transfirió 1 ml del cultivo a un tubo de microcentrífuga (eppendorf) de 1,5 ml y se centrifugó a 5000 xg durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en 180 µl de solución de digestión y 200 µl de la solución de proteinasa K, agitando en vórtex hasta su completa homogeneización. Los tubos se incubaron a 56°C durante 30 min.

Transcurrido ese tiempo, se añadieron 20 µl de la solución de RNasa, se agitó en vortex y se incubó, durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 200 µl de la solución de lisis y se agitó en vórtex durante 15 segundos hasta que se obtuvo una mezcla homogénea.

Posteriormente, se añadieron 400 µl de etanol al 50% y se mezcló de nuevo en vórtex. La mezcla se transfirió a la columna de purificación y se centrifugó 1 minuto a 10 000 xg. Se cambió el tubo colector y se añadieron 500 µl del tampón de lavado I, se centrifugó 1 minuto a 8000 xg. Se añadieron 500 µl del tampón de lavado II y se centrifugó por 3 minutos a 12 000 xg.

Finalmente, la columna se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 ml, se añadieron 200 µl del tampón de elución en el centro de la membrana de la columna. Se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos y se centrifugó a 8000 xg durante 1 minuto. El ADN genómico eluido se conservó a -20°C.

La cuantificación del ADN genómico se realizó mediante un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE.UU).

5. Amplificación de genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se empleó para la amplificación de varios genes de resistencia a antibióticos, presencia de integrones y genes de virulencia en los aislados estudiados. Las PCR se llevaron a cabo utilizando el kit "KAPA2G Fast HotStart ReadyMix PCR Kit" (KAPABIOSYSTEMS, Cape Town, Sudáfrica). La reacción de PCR se preparó de manera rutinaria en un volumen final de 25 μ l para cada tubo de reacción, utilizando las cantidades de cada componente que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Reactivos y cantidades empleadas para la reacción de la PCR

Reactivos	Concentración de trabajo	Volumen para 25 μ l	Concentración final
KAPA2G Fast HotStart ReadyMix2	2X	12,5 μ l	1X
Cebador directo	10 μ M	1,25 μ l	0,5 μ M
Cebador inverso	10 μ M	1,25 μ l	0,5 μ M
ADN	-	3 μ l	-
Agua para PCR	-	7 μ l	-

En todas las reacciones de PCR se utilizó un control negativo (agua destilada) y un control positivo (ADN conteniendo en gen de interés). Las reacciones tuvieron lugar en un termociclador (GeneAmp® PCR System 2700, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU) y el protocolo de amplificación, a menos que se indique lo contrario, fue el recomendado por el fabricante:

- Desnaturalización inicial: 95°C durante 3 minutos,
- Desnaturalización a 95°C durante 10-15 segundos + hibridación a 60°C durante 10-15 segundos + extensión a 72°C durante 1-15 segundos/kb (35 ciclos)
- extensión final de 72°C durante 1 minuto/kb

Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis convencional en geles de agarosa (Agarosa D1 baja EEO, Pronadisa, Madrid, España) al 1,5% (p/v), preparada con tampón TBE (Tris-Borato-EDTA) al 0,5X.

Los geles de agarosa se tiñeron con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,5 µg/ml. Para la visualización de los productos de PCR se empleó un transiluminador UV de un sistema de documentación de imágenes (Gel Doc™ EZ, Gel Documentation System, Bio-Rad).

5.1. Purificación y secuenciación de los productos de PCR

Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit "GeneJET PCR Purification Kit" (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para ello se mezcló en proporción 1:1 el producto de PCR con el tampón de unión y se agitó vigorosamente. La mezcla se transfirió a la columna de purificación y se centrifugó durante 1 minuto a 12 000 rpm.

Posteriormente, se añadieron 700 µl de tampón de lavado y se centrifugó de nuevo durante 1 minuto a 12 000 rpm. Este paso se repitió una vez más. A continuación, se centrifugó la columna vacía durante 1 minuto a 12 000 rpm, con el fin de eliminar el tampón residual. Finalmente, se transfirió la columna a un tubo de 1,5 ml y se añadieron 50 µl de agua libre de nucleasas en el centro de la membrana de la columna y, de nuevo, se centrifugó 1 minuto a 12 000 rpm. Los productos de PCR purificados se conservaron a -20°C hasta su posterior uso.

La secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR se llevó a cabo para la determinación de diferentes variantes alélicas de genes de resistencia a antibióticos, genes de virulencia, así como la caracterización de los integrones y en el análisis clonal de los aislados mediante MLST. Los cebadores utilizados para la secuenciación fueron los mismos que se emplearon en las diferentes reacciones de PCR, aunque algunos tuvieron que ser diseñados para secuenciar completamente el fragmento de ADN amplificado. Estos se muestran en las Tablas del Anexo 3. La secuenciación se realizó a través de una empresa externa de secuenciación (MacroGen Europe B.V. Meibergdreef, Amsterdam, Países Bajos).

6. Detección de genes de resistencia

Mediante PCR se estudió la presencia de integrones (clase 1 y 2), y genes de resistencia a antibióticos.

En aquellos aislados resistentes a betalactámicos y carbapenémicos se estudió la presencia de genes codificantes de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas (*bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{GES}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{PSE}*, *bla_{VEB}* y *bla_{PER}*). Por otro lado, se estudió la presencia de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME) más frecuentes en *P. aeruginosa* y metilasas del ARNr 16S en los aislados resistentes a aminoglucósidos. (*aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib*, *aac(6')-IIa*, *ant(2')-Ia*, *aph(3')-VIa*, *armA*, *rmtA* y *rmtD*). Se amplificaron los genes codificantes de las subunidades ADN-girasa (GyrA, GyrB) y topoisomerasa IV (ParC, ParE) en aquellos aislados resistentes a fluoroquinolonas, además de la presencia de genes codificantes de las proteínas Qnr (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA*). En los aislados resistentes a colistina se amplificaron los genes codificantes de los sistemas de dos componentes PhoPQ y PmrAB. Finalmente, se estudió la presencia de los genes involucrados en la regulación de los sistemas de expulsión (*mexR*, *mexZ*, *mexT*, *nalC*, *nalD*, *nfxB*).

En la Tabla A3 del Anexo 3 se detallan los cebadores utilizados para la amplificación de estos genes y los ciclos de PCR.

7. Detección de genes de virulencia

Mediante PCR se amplificaron los genes de virulencia detallados en la tabla a continuación. En la Tabla B3 del Anexo 3 se detallan los cebadores utilizados para la amplificación de estos genes y los ciclos de PCR.

Tabla 6. Genes de virulencia en *P. aeruginosa*

Categoría	Genes
Sistemas de secreción tipo III y VI	<i>exoU</i> , <i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i> , <i>popB</i> , <i>pscS</i> , <i>pscT</i> , <i>pscU</i> , <i>exsE</i> , <i>tse4</i> , <i>tle1</i> , <i>tse1</i> , <i>tse7</i> , <i>tle3</i> , <i>tplE</i> , <i>tse5</i> , <i>tse6</i>
Toxinas, sistema toxina/antitoxina y transporte de toxinas	<i>toxA</i> , <i>higA</i> , <i>higB</i> , <i>cvaB</i>
Formación de biofilm y movilidad bacteriana	<i>algD</i> , <i>algL</i> , <i>algX</i> , <i>lapA</i> , <i>cupB5</i> , <i>mucA</i> , <i>fliC</i>
Estructura del hemoporo	<i>hasAP</i>
Quorum Sensing	<i>lasR</i>
Biosíntesis de fenazinas y pioverdina	<i>phzH</i> , <i>phzB1</i> , <i>pvdO</i>

Categoría	Genes
Enzimas (Elastasas, proteasas, fosfolipasas, lipasas, esterasas, neuraminidasas)	<i>lasB, lasA, piv, aprA, aprF, clpC, mep72, plcB, plcR, plcH, plcN, lipA, lipC, nan1, nan2, estA</i>
Lectinas	<i>lecB</i>
Ramnolípidos	<i>rhIC, rhII, rhIR</i>

8. Extracción de ARN total

Para extraer el ARN total se utilizó el kit “NucleoSpin RNA” (Macherey-Nagel Inc., Düren, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El primer paso consistió en la homogeneización de la muestra, para lo cual se resuspendió el pellet bacteriano obtenido en 100 µl de tampón TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA; pH 8) con lisozima (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 1 mg/ml, se mezcló por medio de vórtex y se incubó a 37°C durante 10 minutos.

A continuación, se procedió al lisado de las células bacterianas, para lo que se añadieron 3,5 µl de β-mercaptoetanol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y 350 µl del tampón de lisis RA1 proporcionado por el kit. Tras mezclar vigorosamente, se pasó todo a la columna del filtrado (de color violeta), también proporcionada por el kit, y se centrifugó en una microcentrífuga (MiniSpin, Eppendorf) a 11 000 xg durante 1 minuto. En este paso lo que se consiguió fue homogeneizar la muestra mediante la eliminación del material insoluble residual y la reducción de la viscosidad del lisado.

Una vez centrifugado, el producto lisado se mezcló con 300 µl de etanol al 70% (Sigma-Aldrich) y se transfirió a la columna de unión (de color azul), centrifugando de nuevo a 11 000 xg durante 30 segundos.

Se reemplazó el tubo colector y se añadieron 350 µl del tampón de desalado de la membrana MDB y nuevamente se centrifugó a 11000 x g durante 1 minuto. A continuación, se procedió a eliminar el ADN residual por medio del tratamiento con 10 µl de DNasa combinada con 90 µl de un tampón de digestión durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Tras este tiempo, se procedió al lavado y secado de la membrana. Para ello, se añadieron 200 µl de la solución de inactivación de Dnasa, RAW2, y se centrifugó 30 segundos a 11 000 xg. Se retiró

el líquido y se añadieron 600 µl del tampón de lavado RA3, se centrifugó nuevamente durante 30 segundos a 11 000 xg. Se retiró el líquido y se lavó una vez más con 250 µl del tampón RA3, se centrifugó a 11 000 xg durante 2 minutos.

La columna se transfirió a un microtubo de 1,5 ml libre de DNasas y RNasas y se añadieron 60 µl de agua libre de nucleasas. Se centrifugó a 11 000 xg durante 1 minuto para eluir el ARN.

Una vez obtenido el ARN, se procedió a realizar un segundo tratamiento para eliminar posibles restos de ADN utilizando el kit "DNA-free™ Kit DNase Treatment and Removal Reagents" (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se mezclaron 22 µl de ARN con 1 µl de rDNasa, 4,4 µl de solución tampón y 16,6 µl de agua libre de nucleasas, obteniendo un volumen final de reacción de 44 µl. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, la rDNasa se inactivó con 4,4 µl de reactivo de inactivación, dejándolo actuar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 11 000 xg durante 1,5 minutos. El sobrenadante conteniendo el ARN se transfirió a un tubo nuevo y se tomaron 2 µl de este para comprobar que estuviese libre de ADN contaminante, mediante una PCR empleando el gen *mutL* (Tabla C3 del Anexo 3). El resto de la muestra de ARN se conservó a -80°C hasta su posterior utilización.

8.1. Retrotranscripción y PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó utilizando el kit "iScript cDNA Synthesis" (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se mezclaron 10 µl de ARN purificado con 4 µl del cóctel de reacción 5X, 1 µl de enzima retrotranscriptasa y 5 µl de agua libre de nucleasas, obteniendo un volumen final de reacción de 20 µl. La síntesis del ADNc tuvo lugar tras la incubación en 3 fases (25°C durante 5 minutos, 46°C durante 20 minutos y 95°C durante 1 minuto) en un termociclador (GeneAmp PCR System 2700, Applied Biosynthesis). El ADNc resultante se conservó en hielo o a -20°C hasta la realización de la RT-qPCR.

Los estudios de expresión génica se realizaron mediante RT-qPCR. Para ello se mezclaron 10 µl de TB Green Premix Ex Taq (Takara Bio Inc., Shiga, Japón), 0,4 µl de cada cebador (directo y reverso), 7,2 µl de agua libre de nucleasas y 2 µl de ADNc. La reacción se llevó a cabo en un termociclador CFX96 (Bio-Rad) con el siguiente protocolo:

1. 95°C – 10 min
2. 95°C – 15 seg
3. 60°C – 1 min
Plate read
4. GO TO 2. +39 more times
5. Melt curve: 65°C (for 5 sec) to 95°C. Increment 0,5°C.
Plate read
END

La expresión de los genes fue comparada con la expresión de genes endógenos y, posteriormente, cuantificada mediante el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (142).

9. Determinación de la relación clonal de los aislados de *P. aeruginosa*

La relación clonal entre los aislados se evaluó mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE) tipado mediante análisis de secuencias de múltiples loci (MLST).

9.1. Electroforesis de campo pulsado (PFGE)

Para la realización de esta técnica se siguió el protocolo inicialmente descrito por Römmling y colaboradores (143). El procedimiento se desarrolla en varias fases:

- Extracción del ADN: Este debe ser cuidadosamente extraído para evitar su degradación. Para ello, se inmovilizan las células en bloques de agarosa para posteriormente romper la pared celular mediante enzimas y detergentes.
- Restricción enzimática: El ADN extraído se somete a una digestión enzimática utilizando enzimas de baja frecuencia de corte con el fin de generar entre 10 y 20 fragmentos.
- Electroforesis: Los fragmentos generados por la enzima de restricción son separados en un gel de agarosa. Esta separación se logra cambiando periódicamente la dirección del campo eléctrico durante un tiempo determinado, conocido también como pulso. Cada vez que el

campo eléctrico cambia de dirección, las moléculas del ADN se reorientan en el gel, facilitando su penetración a través de la agarosa.

Esta técnica se realizó a todos los aislados procedentes de las 2 colecciones estudiadas: fibrosis quística (FQ) y bronquiectasias (BNFQ). A continuación, se describe el protocolo que se siguió para desarrollar esta técnica:

a) Inoculación de las cepas

Se sembraron las cepas en placas de MHA por agotamiento con el fin de obtener colonias aisladas. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche. Pasado ese tiempo, se inoculó una colonia en tubos que contenían 5 ml de caldo Mueller Hinton (MHB). Los tubos se incubaron a 37°C con agitación a 175 rpm durante toda la noche.

b) Inclusión de las bacterias en bloques de agarosa

Los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos. El pellet resultante se resuspendió en 3 ml de NaCl (0,9%) y se centrifugó nuevamente. Este paso se repitió una vez más. Una vez terminados los lavados, se leyó la densidad óptica (DO_{600}) del cultivo y se ajustó a 0,8 en un volumen final de 1 ml.

Para la preparación de los bloques se utilizó agarosa (Pronadisa) al 2% (p/v) en tampón TE (Tris-HCl 1 M, EDTA 0,5 M, pH 8). Una vez preparada la agarosa, ésta se mantuvo en un baño húmedo a 50°C para evitar que se solidificara hasta su uso. De igual modo, se colocaron en el baño a 50°C durante 2 minutos los tubos conteniendo 500 µl de los correspondientes cultivos bacterianos ajustados. A continuación, se mezclaron 500 µl de los cultivos con 500 µl de agarosa. La mezcla se homogeneizó y se procedió al llenado de los moldes, los cuales se habían sellado previamente por la parte inferior con cinta adhesiva. Una vez solidificados, los bloques de agarosa se extrajeron cuidadosamente de los moldes, retirando la cinta adhesiva y con ayuda de una microespátula de acero inoxidable se transfirieron a tubos eppendorf de 2 ml conteniendo 1 ml del tampón TE.

c) Degradación enzimática

La degradación enzimática comienza con la lisis de la membrana celular de las bacterias y termina con la liberación de ADN genómico mediante la destrucción de proteínas. En la siguiente tabla se detalla la preparación del tampón de lisis y de la solución de Proteinasa K, necesarios para esta degradación.

Tabla 7. Preparación del tampón de lisis y solución de Proteinasa K

Reactivo	Volumen
Tampón de lisis	
Tris-HCl (1 M, pH 8)	6 µl
NaCl (5M)	200 µl
EDTA (0,5 M, pH 8)	200 µl
Desoxicolato de sodio (10%)	20 µl
Sarcosil (20%)	25 µl
Brij-58 (5%)	100 µl
Lisozima (50 mg/ml)	10 µl
Agua MilliQ	439 µl
Solución de Proteinasa K	
Proteinasa K (20 mg/ml)	25 µl
ES (EDTA 0,5 M, pH 9 + Sarcosil 1%)	975 µl

Se retiró el tampón TE de los bloques y se añadió 1 ml de tampón de lisis a cada tubo. Los tubos se incubaron en posición horizontal a 37°C y con agitación a 175 rpm, durante 5 horas. Pasado este tiempo se retiró el tampón de lisis y se lavaron los bloques con TE durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se retiró el tampón TE y se añadió 1 ml de la solución de Proteinasa K. Los tubos se incubaron a 56°C durante toda la noche.

d) Lavado de los bloques y restricción enzimática del ADN

Se retiró la solución de Proteinasa K y se realizaron 6 lavados de los bloques con tampón TE, durante 30 minutos cada uno en un baño húmedo a 50°C con agitación .

El ADN confinado en los bloques de agarosa fue digerido con la enzima de restricción *SpeI* (Takara). En la tabla a continuación se detalla la preparación del tampón de estabilización y de la mezcla de restricción.

Tabla 8. Tampón de estabilización y de mezcla de restricción empleados para la digestión del ADN embebido en los bloques de agarosa.

Reactivo	Volumen
Tampón de estabilización	
Tampón de <i>SpeI</i> 10X	12,5 µl
Agua destilada	112,5 µl
	125 µl
Mezcla de restricción	
Tampón para <i>SpeI</i> 10X	12,5 µl
Agua destilada	112,5 µl
<i>SpeI</i> (10 U/µl)	2 µl
	127 µl

Para la digestión del ADN, se cortó 1/3 de cada bloque y se transfirió a un tubo de 2 ml conteniendo 125 µl del buffer de estabilización. Los tubos se mantuvieron en nevera durante 15-30 minutos. Seguidamente, se retiró el tampón de estabilización y se añadieron 127 µl del tampón de restricción. Los tubos se incubaron a 37°C en un baño húmedo durante toda la noche.

e) Electroforesis, tinción y visualización

Transcurrido este tiempo, se retiraron los bloques de la mezcla de restricción y se transfirieron a un tubo de 2 ml con 1 ml de TBE 0,5X y se estabilizaron en la nevera durante 30 minutos.

Se preparó agarosa al 1% (p/v) en TBE al 0,5X, se vertió sobre el molde con el peine correspondiente para hacer el gel y se dejó a temperatura ambiente hasta que solidificara. Una vez solidificada, se retiró el peine y se introdujeron los bloques, dejando los pocillos de ambos extremos

para colocar el marcador de peso molecular (Lambda Ladder PFG, New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU) y los pocillos se sellaron con la misma agarosa con la que se preparó el gel.

La electroforesis se llevó a cabo en la cubeta de un equipo CHEF-DR III (Bio-Rad), con 2 litros de TBE 0,5X, a una temperatura constante de 14°C, un ángulo de 120° y se realizó en dos bloques:

- Bloque 1: Rango de pulsos de 1 a 15 segundos a 6 V/cm durante 7 horas.
- Bloque 2: Rango de pulsos de 15 a 35 segundos a 6 V/cm durante 16 horas.

Una vez finalizada la electroforesis, se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio (1 µg/ml) durante 30 minutos y a continuación se visualizó en un transiluminador UV y se fotografió en un sistema de documentación de imágenes (Gel Doc™ EZ, Gel Documentation System, Bio-Rad).

Las imágenes con los de los patrones de macrorrestricción de cada aislado obtenidos con *SpeI* se analizaron y se compararon con el software GelCompar II, versión 2.0 (Unimed Healthcare Inc., Houston, TX) y se construyó un dendrograma de similitud genética con el índice de diversidad de Dice y el análisis de agrupamientos con el algoritmo UPGMA, Se asignaron los patrones genéticos correspondientes (pulsotipos) siguiendo los criterios de Tenover y colaboradores (144), los cuales permiten clasificar a los aislados en: indistinguibles (no hay diferencias en el patrón de bandas), clonalmente relacionados (de 1-3 bandas de diferencia), posiblemente relacionados clonalmente (4-6 bandas de diferencia) y no relacionados (más de 7 bandas de diferencias).

9.2. Tipificación de secuencias de múltiples loci (MLST)

Una vez analizados los resultados del PFGE, se seleccionó una cepa de cada patrón genético para realizar el MLST mediante PCR. Para ello se utilizaron cebadores que amplificaban los fragmentos internos de 7 genes endógenos (*mutL*, *aroE*, *nuoD*, *acsA*, *ppsA*, *guaA*, *trpE*).

La secuenciación de los genes *housekeeping* los realizó la empresa MacroGen Europe. Para ello, se enviaron 2 tubos de 1,5 ml por cepa y gen. Cada tubo contenía 5 µl del producto de PCR purificado y 5 µl del primer (un tubo contenía la cadena directa y el otro contenía la cadena complementaria).

Una vez obtenidas las secuencias, estas se analizaron según los protocolos disponibles en la base de datos (<http://pubmlst.org/paeruginosa>) y se asignó un tipo de secuencia o secuenciotipo (ST) a cada aislado.

En la Tabla C3 del Anexo 3 se describen las secuencias de los cebadores que amplifican los genes housekeeping y el ciclo de PCR utilizado para su amplificación.

10. Secuenciación masiva (WGS)

Para la secuenciación de los genomas completos de *P. aeruginosa*, se seleccionaron en total 79 aislados de las dos colecciones estudiadas (FQ, n=54 y BNFQ, n=25), en base a los patrones obtenidos mediante los análisis de los pulsotipos obtenidos por PFGE y los ST mediante MLST. Para la extracción de ADN se partió de un cultivo axénico de cada uno de los aislados mediante el kit "Qiagen DNA blood&tissue kit" (QIAGEN, Hindel, Alemania) y se cuantificó su concentración en un fluorímetro-Qubit® (Life Technologies).

a) Preparación y normalización de librerías

Estas se prepararon a partir de 1 ng total de ADN utilizando el kit Nextera® XT DNA Library Preparation (Illumina, San Diego, CA, EE.UU). Se prepararon "pools" equimoleculares de las librerías de cada aislado a analizar a 4 nM.

b) Secuenciación

El pool de librerías junto con la librería control de secuenciación del genoma del fago PhiX (comúnmente conocida como PhiX, FC-110-3001) se cargaron desnaturalizadas con una solución de NaOH 0,2 N en un cartucho de secuenciación (MiSeq® Reagent Kit v3 600 cycle) para realizar la secuenciación por síntesis en un equipo MiSeq (Illumina) para secuenciación *paired-end* x300 bp.

c) Análisis de datos

Tras aproximadamente 72 horas de secuenciación en el equipo Miseq (Illumina) se obtuvieron los datos crudos en formato .fastq, que son ficheros que contienen la secuencias junto

con su calidad (o phred score). Se obtuvieron aproximadamente de 10 Gigabytes (Gb) de información por carrera (~150 Kilobytes por genoma), a los que aplicamos un filtrado para un phred score ≥ 30 , lo que equivale a un 99,9% de exactitud (solo 1 base erróneamente secuenciada de cada 1000).

Antes de proceder con los análisis, se evaluó la calidad de las lecturas (reads) con el software libre FastQC que permite visualizar en una interfaz gráfica parámetros como la calidad, la longitud, el contenido en GC, la presencia de k-mers, primers, barcodes, etc.

El ensamblaje de los genomas, anotación y análisis se llevó a cabo siguiendo el *pipeline* TORMES (145). Este *pipeline* utilizó una serie de aplicaciones y bases de datos para obtener diversos datos genómicos. Para ello, realiza un borrador de genoma a partir de las secuencias cortas con SPAdes (146), que utilizará en un siguiente paso para mejorar el producido por Flye. Además, Unicycler también usa miniasm sobre las secuencias largas para obtener información de trimado para los contigs. Finalmente, se hicieron múltiples rondas de pulido/corrección del genoma utilizando secuencias cortas con Pilon (147). Se realizó un análisis con GTDB-Tk (148) ya que permite clasificar taxonómicamente los genomas, lo que supone un control adicional de calidad (identificación de contaminación de las muestras). El borrador del genoma se anotó con Prokka (149) y los ficheros .gbk producidos se usaron para la comparación pangénomica de todos los aislados basada en la presencia y ausencia de los genes predichos usando Roary (150). Los árboles de distancias (dendrogramas) y un resumen de los datos pangénomicos se construyeron con FastTree (151) y roary2svg (152), respectivamente. Se obtuvieron los secuenciotipos (ST) con el programa mlst y la base de datos PubMLST (153). Se buscaron los genes de resistencia a antibióticos usando ABRicate (154) contra dos bases de datos, ResFinder (155) y CARD (156). Se buscaron los genes de virulencia de la misma forma, pero usando la base de datos Virulence Factors Database (VFDB) (79). Por último, también se hizo una búsqueda de replicones plasmídicos usando la bases de datos PlasmidFinder (157). Mediante el software PAST (158) se determinó in silico los serotipos de los 79 aislados secuenciados.

11. Ensayos de biofilm

El ensayo de producción de biofilm se realizó en los 198 aislados pertenecientes a ambas colecciones clínicas (FQ y BNFAQ), los cuales se inocularon en medio Mueller Hinton y se incubaron a 37°C con agitación a 175 rpm, durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se determinó la DO_{600} de los cultivos y se ajustaron a una $DO_{600} = 0,1$.

El ensayo de biofilm se llevó a cabo en placas de 24 pocillos de fondo plano (Sarstedt). Los ensayos se realizaron por duplicado, inoculando cada pocillo con 1 ml de la suspensión bacteriana previamente ajustada. Las placas se incubaron a 37°C, sin agitación, durante 24 horas. Transcurrido el periodo de incubación, se retiró el sobrenadante de los pocillos y estos se lavaron dos veces con agua destilada, con cuidado de no levantar el biofilm adherido al plástico. Una vez que los pocillos estuvieron secos, se procedió a la tinción del biofilm con 1 ml de cristal violeta al 0,7% (Sigma Aldrich). Tras 20 minutos de tinción, se retiró el cristal violeta y los pocillos se lavaron dos veces con agua destilada. Una vez secos, se procedió a la lectura del biofilm. Para ello el cristal violeta se disolvió con 1 ml de ácido acético al 33% (Sigma Aldrich) y se midió la DO_{600} en un fotómetro (Biophotometer, Eppendorf).

Las cepas se clasificaron en 3 grupos según la cantidad de biofilm formada, de acuerdo con lo descrito por Azimi y colaboradores (159). Aquellas cepas cuya $DOC < DO \leq 2$ se clasificaron como cepas productoras de biofilm débil. Aquellas cuya $2 \times DOC < DO \leq 4 \times DOC$ se clasificaron como productoras de biofilm moderado, y aquellas cuya $DO > 4 \times DOC$ se consideraron como cepas formadoras de biofilm fuerte, siendo $DOC = 3\sigma$ control.

Con el sobrenadante que se retiró de los pocillos tras las 24 horas de incubación se hicieron diluciones seriadas que se sembraron en placas de MHA. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se realizó el conteo de UFC/ml. La cuantificación del biofilm se representó como un valor normalizado, calculado como $\text{Log}_{10} \text{UFC} / \text{DO}_{600}$.

11.1. Oxilipinas

Se estudió el efecto de las oxilipinas en la formación de biofilm en una selección de aislados con actividad diolsintasa. Partiendo de la colección de 198 aislados de *P. aeruginosa*, se determinó la actividad diolsintasa de los aislados, así como la actividad lipasa y proteasa, ya que su presencia en *P. aeruginosa* indica que el sistema de secreción tipo II funciona correctamente, y se ha visto que las enzimas diolsintasas que sintetizan las oxilipinas se exportan a través de ese sistema.

Para determinar las actividades diolsintasa, lipasa y proteasa de los aislados, estos se inocularon en placas de LB agar con ácido oleico (0,8 mg/ml), tributyrin agar (Sigma-Aldrich) y agar

bacteriológico con leche descremada al 10%, respectivamente, y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, se observaron las placas, y, aquellas que producían un halo de 2-3 mm alrededor de las colonias eran positivas para dicha actividad. Una vez seleccionados los aislados, se estudió la capacidad de formación de biofilm en medio M9 y M9 suplementado con ácido oleico, siguiendo el protocolo descrito con anterioridad.

Según los resultados obtenidos de la producción de biofilm, se hizo una selección de aislados para estudiar la expresión de PA2077 (familia de di-hemo-citocromo C peroxidasas), uno de los genes codificantes de la actividad diolsintasa en *P. aeruginosa*. Para ello, se inoculó una colonia de cada uno en caldo MHB y se incubaron a 37°C, con agitación 175 rpm durante toda la noche. Al día siguiente los cultivos se ajustaron a una $DO_{600}=0,2$ y se volvieron a incubar a 37°C, con agitación 175 hasta que alcanzaron una $DO_{600}=0,8$. Los cultivos se centrifugaron a 12 000 xg y a 4°C durante 15 minutos y se recogió el pellet correspondiente. Se procedió a la extracción de ARN y obtención de ADNc y se estudió la expresión de PA2077 mediante RT-qPCR.

12. Ensayos de movilidad

Se estudió la movilidad tipo “swimming” y “swarming” en medios de cultivo apropiados. La diferencia de estos medios reside en el porcentaje de agar con el que se preparan las placas. En el caso del medio “swimming”, las placas se preparan con un 0,25% de agar, y en el caso del medio “swarming” se preparan con un 0,5% de agar. En la siguiente tabla se detallan los reactivos utilizados para preparar estos medios y las cantidades necesarias para su preparación.

Tabla 9. Composición de medios swim y swarm

Reactivo	g/l
Peptona (Sigma Aldrich)	10
Cloruro de sodio (Sigma Aldrich)	5
Extracto de carne (Sigma Aldrich)	3
2,4,6-Tris-s-triazine (TPTZ) (Sigma Aldrich)	0,05
Agar (Sigma Aldrich)	2,5 (Medio swim) 5 (Medio swarm)

Se partió de cultivos bacterianos crecidos en caldo Mueller Hinton durante toda la noche a 37°C. Los cultivos se ajustaron a una $DO_{600} = 0,2$ y las placas se inocularon verticalmente con 2 μ l de la suspensión bacteriana. En el caso del medio swim, la punta conteniendo el inóculo se introducía hasta aproximadamente la mitad del grosor del agar, mientras que en el caso del medio swarm la inoculación se hizo sobre el agar. La movilidad se observó por la formación de un halo de crecimiento alrededor de la zona de inoculación.

Al día siguiente se realizó el conteo de UFC y se generó una gráfica que enfrentaba la DO_{600} y las UFC. De esta gráfica se obtuvo una ecuación que relacionaba la densidad óptica del cultivo y las UFC a dicha densidad óptica.

13. Ensayos de supervivencia/mortalidad en modelo de *Galleria mellonella*

Para la realización de estos experimentos se utilizaron larvas de *G. mellonella* según el protocolo descrito por Kavanagh y Reeves (160), con algunas modificaciones. Se emplearon larvas de *G. mellonella* (La grillería, Animal Center S.L, Valencia) en la última fase larvaria, con un peso de aproximadamente 250 mg y una longitud de 2-3 cm.

❖ Curvas de crecimiento

Previamente a la inoculación de las larvas de *G. mellonella*, se realizaron las curvas de crecimiento de una cepa representativa de cada patrón genético. Para ello, se partió de un cultivo bacteriano crecido en caldo Mueller Hinton durante toda la noche a 37°C. Se inocularon 100 μ l del cultivo en 10 ml de caldo Mueller Hinton y se incubaron a 37°C con agitación (175 rpm). Se tomaron muestras del cultivo cada hora, durante 5 horas, se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en placas de MHA. Las placas se incubaron a 37°C.

Cada larva de *G. mellonella* fue inyectada con 10 μ l del inóculo bacteriano en el hemocele a través de la propata izquierda, previamente desinfectada con etanol al 70% (v/v). Para ello se empleó una jeringa hipodérmica desechable (estéril) de 0,5 ml, graduada en microlitros con aguja de 29G x 12,7 mm (BD Micro-Fine, Beckton Dickinson, NJ, Franklin Lakes, EE.UU).

Previamente se determinó la dosis de infección utilizando las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y Pae221. Para ello, se partió de suspensiones bacterianas de un cultivo crecido durante toda la noche, el cual se ajustó a 10 , 10^2 , 10^3 y 10^4 UFC/ml, respectivamente. Finalmente, se decidió emplear el inóculo que contenía 10^3 UFC/ml como dosis de inyección.

Se emplearon 79 aislados de *P. aeruginosa* que fueron secuenciados, seleccionados en base a sus pulsotipos y secuenciotipos (ST). Como control de infección se utilizaron las cepas de referencia *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* PA7. A cada larva se le inyectó un volumen de $10\ \mu\text{l}$. Se inyectaron 10 larvas por aislado. Como controles, se utilizaron 10 larvas a las cuales se les inyectó solución salina al 0.9 % (p/v) como control del trauma físico y 10 larvas más sin inocular.

Una vez inyectadas, cada grupo de 10 larvas se colocó en placas de Petri y se incubaron a 37°C en oscuridad, realizando controles individuales cada 2 horas hasta las 72 horas. Se consideró que la larva estaba muerta cuando presentó el cuerpo melanizado y ausencia de movimiento como respuesta a la estimulación. Los experimentos se realizaron por triplicado.

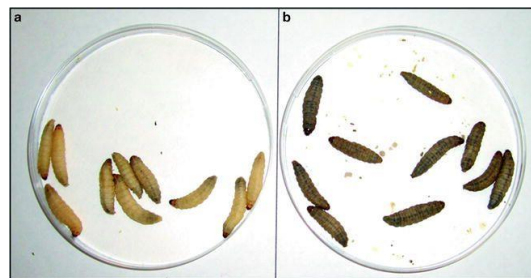


Figura 30. Larvas de *G. mellonella*. a) Larvas vivas. b) Larvas muertas.

14. Adhesión e internalización de *P. aeruginosa* en células A549

Para la realización de estos experimentos se seleccionaron 24 aislados (Tabla 10) de los 79 secuenciados, en función de los genes de virulencia que presentaban.

❖ Línea celular A549. Descongelación, cultivo y mantenimiento

La línea celular que se utilizó para realizar estos experimentos fue la A549 (ATCC® CCL-185). Esta línea fue desarrollada por primera vez en 1972 a través de la remoción y cultivo de tejido canceroso de pulmón en un tumor extirpado de un hombre de 58 años. Las células A549 son células

humanas de epitelio alveolar basal. Son de naturaleza escamosa y responsables de la difusión de sustancias a través de los alveolos del pulmón e in vitro crecen adherentemente como una monocapa (161).

Se partió de células congeladas en crioviales a -80°C . El medio de congelación consta de una parte de dimetilsulfóxido (DMSO) 1x + DMEM/F-12 (Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher) 2x y dos partes de suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher). Los crioviales se descongelaron a 37°C e inmediatamente después se centrifugaron a 1000 rpm durante 3 minutos. Se retiró el sobrenadante y se añadió el pellet a la placa de cultivo previamente preparada con medio de cultivo celular y se incubó a una temperatura de 37°C en una atmósfera con 5% de CO_2 .

Las células A549 se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) (Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (v/v) (Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher), y gentamicina (Sigma Aldrich) a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Cuando la confluencia fue igual o superior al 90% se procedió a realizar un subcultivo celular. Para ello se retiró el medio de cultivo y se hizo un lavado con PBS estéril a temperatura ambiente. Una vez retirado el PBS se añadieron 3 ml de tripsina 0,05%-EDTA 1x (Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher) y se dejó incubando a 37°C hasta que las células estuvieron despegadas. Se recogieron las células y se repartieron en las placas de cultivo celular previamente preparadas, conteniendo medio de cultivo y antibiótico.

Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO_2 . Los pases de mantenimiento se realizaron cada 2-3 días, aproximadamente.

Las células A549 se sembraron en placas de 24 pocillos el día anterior a la infección a una densidad celular de 2×10^6 células/pocillo en medio sin antibiótico. Antes de realizar las infecciones se verificó el estado y confluencia de las células.

Las bacterias se cultivaron en 3 ml de caldo Mueller Hinton a 37°C en agitación a 175 rpm durante toda la noche. Las células A549 se infectaron a una multiplicidad de infección (MOI) o ratio de bacterias por célula de 10:1, con lo que, siguiendo la recta patrón obtenida con la curva de

crecimiento, los cultivos se ajustaron y se plantaron 4×10^7 bacterias. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ durante 30 minutos en el caso de adhesión y 1 y 3 horas en el caso de internalización.

Para los experimentos de adhesión, una vez alcanzado el tiempo de incubación (30 minutos), se retiró el sobrenadante y se hicieron diluciones seriadas en PBS 1x (10^{-5} - 10^{-8}). Se añadieron 3 gotas de 10 µl en placas de MHA y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se realizó el conteo de UFC/ml.

Para los experimentos de internalización, una vez transcurrido el tiempo de infección, se retiró el sobrenadante y los pocillos se lavaron con 500 µl de PBS 1x con el fin de eliminar las bacterias no adheridas. A continuación, se añadieron 500 µl de medio de cultivo con antibiótico (gentamicina o tobramicina, según la resistencia de los aislados a 50 µg/ml) durante 45 minutos.

Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio y se hizo otro lavado con PBS 1X. Después, se añadieron 100 µl de Tritón X-100 al 1% en PBS 1X, con lo que la membrana celular se disgregó y aquellas bacterias que se habían internalizado se liberaron. Tras 5 minutos, se recogieron los 100 µl y se hicieron diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-4}). Se añadieron 3 gotas de 10 µl en placas de MHA y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se realizó el conteo de UFC.

14.1. Ensayos de inmunofluorescencia

Para este experimento se utilizaron los mismos aislados empleados en los experimentos de adhesión e internalización. Las células A549 se sembraron en placas de 24 pocillos, con cubreobjetos circulares colocados en el fondo, el día anterior a la infección a una densidad celular de 2×10^6 células/pocillo en medio sin antibiótico. Antes de realizar las infecciones se verificó el estado y confluencia de las células. Algunos de los aislados no se marcaban correctamente con el anticuerpo α -*Pseudomonas*, por lo que en esos casos fue necesario transformar las bacterias con el plásmido pCdrA::gfp (Tabla 10, señalados en negrita). El anticuerpo policlonal contra *P. aeruginosa* (α -*Pseudomonas*) utilizado en este trabajo fue obtenido en la Unidad de Reproducción de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria siguiendo un protocolo estandarizado descrito previamente (162).

Tabla 10. Aislados seleccionados para los experimentos de adhesión e internalización en la línea celular A549

Aislado	Pulsotipo	Perfil de susceptibilidad a gentamicina
11-4059	AA2	S
12-1371	AA3	S
12-5709	C	S
13-3150	EE	S
12-2600	GG1	S
12-5422	GG2	S
14-0652	H1	S
14-3223	H2	S
14-0421	H3	S
14-0294	H5	S
13-4215	HH	S
14-2184	K1	R
14-2378	K3	R
14-0919	M	S
12-6547	N	S
13-0950	P	S
14-0035	PP	S
13-2772	Q	S
15-4983	T1	S
14-2563	T2	S
13-5486	U1	S
12-0805	V	S
12-5984	X	S
12-6353	Z	S

S: Sensible, R: Resistente

❖ Transformación de *P. aeruginosa* con el plásmido pCdrA::*gfp*

De los 24 aislados seleccionados para este experimento, los 22 sensibles a gentamicina fueron transformados mediante electroporación con el plásmido pCdrA::*gfp* (163), que contiene el gen que codifica la proteína de fluorescencia verde (GFP) y el gen *aac(3)-Ia* que confiere resistencia a gentamicina.

Se siguió el protocolo descrito por Dower y colaboradores (164), con algunas modificaciones. Se inoculó una colonia bacteriana en 10 ml de caldo Mueller Hinton y se incubó a 37°C con agitación a 175 rpm durante toda la noche. Al día siguiente, los cultivos se colocaron en hielo durante al menos 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, se centrifugaron a 5000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Se desechó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 10 ml de glicerol al 10% (v/v) y se volvió a centrifugar a 5000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Este paso se repitió una vez más. A continuación se desechó parte del sobrenadante dejando aproximadamente 1 ml para resuspender el pellet de células bacterianas. Esta suspensión bacteriana concentrada se distribuyó en alícuotas de 100 µl en viales de 1,5 ml, se congelaron en hielo seco y se conservaron a -80°C hasta su posterior uso.

Las alícuotas de células concentradas se descongelaron en hielo y se añadieron 2 µl del ADN plasmídico a una concentración aproximada de 50 ng/ml y se mezcló la suspensión moviendo el tubo suavemente con el dedo para tratar de evitar burbujas de aire. A continuación, la mezcla de células/ADN se colocó en una cubeta estéril de electroporación Gene Pulser®/MicroPulser™ con separación de 0,2 cm (Bio-Rad) previamente enfriada en hielo que fue colocada en la abertura de inserción de la cubeta de un electroporador (Eporator, eppendorf) y se le aplicó un pulso apropiado a 2,5 kV, 25 µF y 200 ohmios. Después del pulso, las células fueron inmediatamente retiradas de la cubeta de electroforesis y se pasaron a tubos de 10 ml conteniendo 1 ml de MHB. Los tubos se incubaron a 37°C, en posición horizontal y con agitación a 175 rpm durante 1 hora. Al final de este período de expresión, las células se diluyeron apropiadamente en MHB y se sembraron en placas de MHA con gentamicina a 25 µg/ml e incubaron a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente se extrajo ADN total de una colonia aislada mediante la resina InstaGene (Bio-Rad) y se comprobó la presencia del plásmido pCdrA::*gfp* mediante PCR. Como control positivo se utilizó ADN de la cepa PAO1 que contenía el plásmido pCdrA::*gfp* y se utilizaron los cebadores que

amplificaban el gen de la proteína GFP (GFP-F: 5'CTGCTGCCCCGACAACCAC3' y GFP-R: 3'TCACGAACTCCAGCAGGAC5').

Las bacterias se inocularon en 3 ml de caldo Mueller Hinton. En el caso de las cepas que contenían el plásmido pCdrA::*gfp*, el medio fue suplementado con gentamicina (25 µg/ml. El protocolo seguido fue el mismo que se llevó a cabo para los experimentos de adhesión e internalización, a diferencia de los tiempos de infección, que en cuyo caso, fueron de 1 y 2 horas. Pasados estos tiempos, se retiró el sobrenadante de los pocillos y los cultivos se lavaron con PBS 1x para eliminar las células y bacterias no adheridas a la superficie del cristal. Una vez lavados, se fijaron con 200 µl de paraformaldehído (PFA) al 3,2% durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se permeabilizó la membrana celular con 50 µl de Tritón X-100 (PBS + Tritón 0,1%) durante 10 minutos, se realizó un lavado con PBS 1X y se bloqueó con 100 µl de BSA 1% durante 15 minutos.

Se realizaron dos marcajes diferentes:

- Por un lado, en los aislados conteniendo el plásmido pCdrA::*gfp*, se utilizó el anticuerpo Faloidina-Atto 488 (Sigma Aldrich) (preparado en una dilución 1:200 en BSA 1%) para teñir la actina de las células y se dejó actuar durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- Los aislados que no fueron transformados se marcaron con un anticuerpo primario y secundario. Para ello, se añadió el anticuerpo primario α -*Pseudomonas* (preparado en una dilución 1:1000 en BSA 1%) durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras lavar con PBS 1x, se añadió el anticuerpo secundario α -rabbit A549 (preparado en una dilución 1:1000 en BSA 1%) durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras lavar de nuevo con PBS 1x, se marcó la actina de las células añadiendo el anticuerpo Faloidina-Atto 488 (preparado en una dilución 1:200 en BSA 1%) durante 20 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.

Finalmente, los cubreobjetos se lavaron con PBS 1X y se montaron en portaobjetos con 2 µl de medio de montaje Fluoroshield (Sigma Aldrich) que contiene DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Los cubreobjetos se observaron en un microscopio confocal Nikon A1R. Las imágenes se obtuvieron

con los objetivos Plan-Apo $\times 20$ con una apertura numérica de 0,75 N/A, Plan-Fluor $\times 40$ con una apertura numérica de 1,3 N/A o Apo-TIRF $\times 100$ con una apertura numérica de 1,49 N/A y fueron procesadas con el software NIS-Elements 3.2 (Nikon Instruments Inc).

15. Expresión del sistema de secreción tipo VI (T6SS)

15.1. Determinación del tiempo de infección

Para este experimento se sembraron las células A549 en placas de 6 pocillos dos días antes de la infección a una densidad celular de aproximadamente $1,3 \times 10^5$ células/pocillo en medio sin antibiótico. Antes de realizar las infecciones se verificó el estado y confluencia de las células.

Se utilizaron las cepas de referencia *P. aeruginosa* PAO1, Pae221, PA14 y PA7, las cuales se cultivaron en 3 ml de caldo Mueller Hinton a 37°C en agitación a 175 rpm durante toda la noche. Al día siguiente los cultivos se ajustaron a 10^8 UFC y se infectaron las células A459 con 200 μ l de la suspensión bacteriana. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ durante 30 minutos, 1 hora, 3 horas, 5 horas, 7 horas y 10 horas. Finalizados los tiempos de infección se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 15 000 rpm durante 45 minutos, a 4°C. El pellet resultante se conservó a -80°C.

Finalmente, se llevó a cabo la extracción de ARN y obtención del ADNc para el posterior análisis de la expresión genética mediante RT-qPCR. Obtenidos estos resultados se decidió utilizar un tiempo de infección de 5 horas, puesto que a tiempos menores el pellet bacteriano resultante no era suficiente para obtener una concentración óptima de ARN para el posterior análisis de expresión.

15.2. Experimentos de competitividad bacteriana

Para los ensayos de competitividad bacteriana se utilizaron las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y Pae221, la cepa *Burkholderia cenocepacia* J2315, inicialmente aislada en el año 1989 de un paciente con fibrosis quística e identificada como *Pseudomonas cenocepacia* CF5610 (165), de aquí en adelante BcJ2315, y una cepa clínica de *Achromobacter xylosoxidans* (Ax1203), aislada de un paciente con fibrosis quística en el Hospital Marqués de Valdecilla.

Las bacterias se cultivaron en 3 ml de caldo Mueller Hinton, a 37°C y con agitación a 175 rpm durante toda la noche. Al día siguiente los cultivos se ajustaron a 10⁸ UFC. Los experimentos de competitividad se realizaron tanto en caldo Mueller Hinton como en células A549. En ambos casos se partió de cultivos mixtos, mezclando las diferentes combinaciones de bacterias en una proporción 1:1, de la siguiente manera: PAO1+BcJ2315, Pae221+BcJ2315, PAO1+Ax1203, Pae221+Ax1203.

- Mueller Hinton: En vasos con rosca de 100 ml de capacidad (Sarstedt), se añadieron 200 µl de cada cultivo ajustado en 10 ml de medio Mueller Hinton. Los botes se incubaron a 37°C con agitación (175 rpm) durante 5 horas y durante toda la noche.

Transcurridos los tiempos, se recogió el cultivo y se hicieron diluciones seriadas que posteriormente se sembraron tanto en placas de MHA como en placas selectivas de MHA (con colistina (16 µg/ml), para separar las colonias de BcJ2315, y ceftazidima (256 µg/ml) para separar las de Ax1203) que se incubaron a 37°C durante toda la noche.

- Células A549: En placas de 6 pocillos que contenían células A549 a alta confluencia se añadieron 200 µl de cada cultivo ajustado. Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera del CO₂ durante 5 horas.

Seguidamente se tomaron 100 µl y se hicieron diluciones seriadas que posteriormente se sembraron tanto en placas de MHA como en placas selectivas de MHA que se incubaron a 37°C durante toda la noche.

El cultivo restante se centrifugó a 17 000 rpm en centrífuga refrigerada a 4°C durante 30 minutos. El pellet resultante se conservó a -80°C hasta que se llevó a cabo la extracción de ARN.

a) Conteo de UFC/ml

Se realizaron los conteos de UFC/ml de las placas selectivas y de las placas de MHA. Las UFC/ml que crecieron en las placas de MHA-COL¹⁶ corresponden a UFC/ml de BcJ2315. Aquellas que crecieron en las placas de MHA-CAZ²⁵⁶ corresponden a UFC/ml de Ax1203. Las UFC/ml resultantes de

las placas de MHA sin antibiótico corresponden a UFC/ml totales del cultivo mixto, es decir, hay UFC/ml tanto de *P. aeruginosa*, como de *B. cenocepacia* y *A. xylosoxidans*.

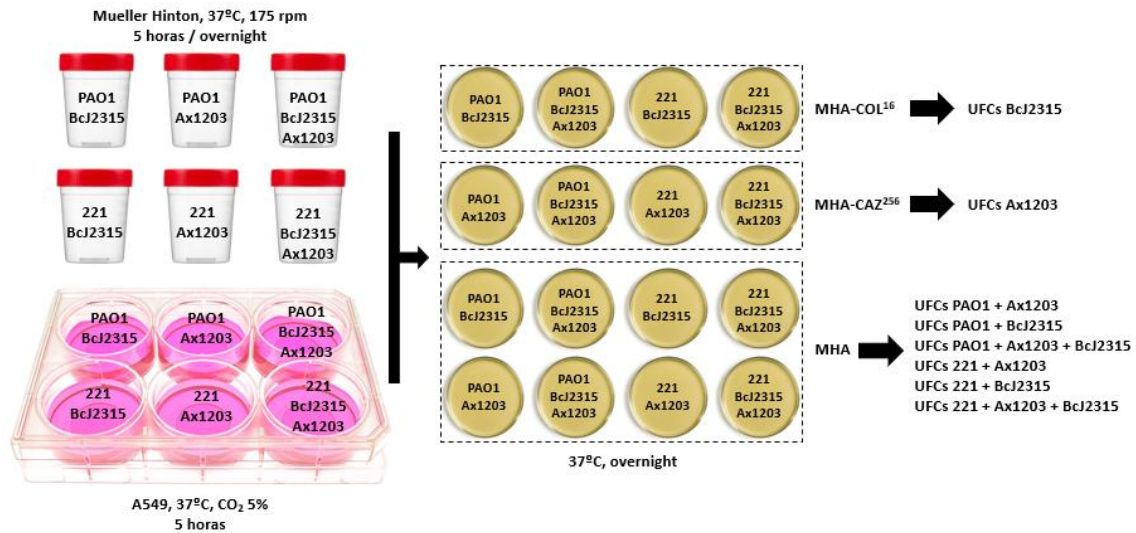


Figura 31. Esquema de los experimento de competitividad bacteriana

Una vez obtenidas las UFC/ml de todas las bacterias en ambas condiciones, se procedió al cálculo del índice de competitividad de *B. cenocepacia* y *A. xylosoxidans* respecto a *P. aeruginosa*. El índice de competitividad está definido como el ratio final de la cepa respecto al inicial, y es un valor comprendido entre 0 y 1. Cuanto menor sea este valor menor será el crecimiento de la cepa. El índice de competitividad se calculó utilizando la siguiente formula:

$$IC = \frac{\frac{UFC \text{ Ax1203}}{UFC \text{ Pae}}_{\text{Final}}}{UFC \text{ Pae}_{\text{Inicial}}}; IC = \frac{\frac{UFC \text{ BcJ2315}}{UFC \text{ Pae}}_{\text{Final}}}{UFC \text{ Pae}_{\text{Inicial}}}$$

b) Extracción de ARN y estudio de la expresión génica

Una vez obtenidos los pellets del ensayo en células A549 se procedió a extraer el ARN y obtener el ADNc para posteriormente estudiar la expresión de los genes del T6SS de las 4 cepas mediante RT-qPCR. Se estudió la expresión de los siguientes genes pertenecientes al sistema de secreción tipo VI en las correspondientes especies:

- *P. aeruginosa*: *hcp1*, *tagQ*, *pppA*, *vgrG1b*, *hcp2*, *vgrG2*, *icmF2*, *hsiC2*, *hcp3*, *dotU3*. Como gen de referencia se utilizó *rpsL*
- *B. cenocepacia*: *tssM1*, *tssF1*, *hcp1*, *tssL1*, *tssK1*, *tssH1*. Como gen de referencia se utilizó *rpsL*
- *A. xylosoxidans*: *vgrG1*, *dotU*, *vgrG2*, *tssG*, *hcp*. Como gen de referencia se utilizó *recA*

15.3. Efecto de la presencia de metales traza y concentraciones subinhibitorias (subCMI) de antibióticos sobre la expresión del T6SS

Para estos experimentos se utilizaron 5 aislados (14-3223, 12-1251, 12-1371, 13-3298 y 12-6563) basándonos en su virulencia y en los resultados obtenidos de los ensayos de supervivencia en modelos de *G. mellonella*, además de las cepas de referencia *P. aeruginosa* PAO1 y Pae221.

Los metales utilizados fueron hierro, cobre y zinc a concentraciones de 1 µg/ml, 0,2 µg/ml y 1,3 µg/ml, respectivamente. Para ello, se partió de soluciones madre de FeCl₃ (10 mg/ml), CuCl₂ (85 mg/ml) y ZnCl₂ (34 mg/ml).

Los antibióticos utilizados fueron imipenem y gentamicina a 1/4 de la CMI, determinada previamente para cada cepa/aislado. Para ello, se partió de soluciones madre de imipenem (4096 µg/ml) y gentamicina (50 mg/ml).

Los experimentos se realizaron en placas de 6 pocillos. Se sembraron, con 48 horas de antelación, 5x10⁶ células/pocillo y las placas se incubaron a 37°C, en atmósfera con 5% de CO₂. El día previo a la infección se inocularon las cepas en 3 ml de caldo Mueller Hinton y los tubos se incubaron a 37°C, con agitación a 175 rpm durante toda la noche.

Al día siguiente, se añadió a las células las soluciones con los metales y los antibióticos. Los cultivos se ajustaron a 10⁸ UFC/ml y las células de infectaron con 200 µl de dicho cultivo. Las placas se incubaron durante 5 horas a 37°C en atmosfera con 5% de CO₂. Tras ese tiempo, se centrifugó el sobrenadante a 4°C; 15 000 rpm durante 45 minutos. El pellet resultante se conservó a -80°C.

Se procedió a la extracción de ARN y obtención del ADNc. Posteriormente, se estudió la expresión de 14 genes del T6SS (*hcp1*, *tagQ*, *pppA*, *vgrG1b*, *tse3*, *icmF2*, *hsiB2*, *pldA*, *vgrG2*, *hcp2*, *hsiA3*, *hsiH3*, *hcp3* y *pldB*), y se utilizó como gen de referencia *rpsL*.

RESULTADOS

1. Características fenotípicas. Morfología colonial, producción de pigmentos y hemólisis

Se estudió un total de 198 aislados de *P. aeruginosa* procedentes de 40 pacientes de fibrosis quística (FQ) y bronquiectasias no asociadas a fibrosis quística (BNFQ). En la Tabla A1 del Anexo 1 se detalla la morfología colonial de estos aislados, así como su fuente.

Observamos una morfología colonial muy heterogénea, observándose aislados con la superficie de colonia rugosa y bordes de colonia rugosos, así como variantes de colonias pequeñas (SCV), las cuales son comúnmente encontradas en aislados procedentes de pacientes de FQ. En ambas colecciones predominó el fenotipo no mucoide: 81 aislados (65,8%) provenientes de pacientes de FQ y 70 (93,3%) de pacientes de BNFQ.

La producción de pigmentos en los aislados de ambas colecciones se pudo apreciar en placas de MHA. Ochenta aislados de pacientes con FQ y 60 de pacientes con BNFQ secretaron pigmentos (Figura 32). En lo referente a la colección de FQ, 7 aislados (5,7%) secretaron piorrubina, 47 (38,2%) secretaron pioverdina y 7 (5,7%) piomelanina. Así mismo, 3 aislados (2,4%) secretaron una mezcla de pioverdina y piorrubina, 2 (1,6%) de pioverdina y piomelanina, y 6 aislados (4,8%) secretaron una mezcla de pioverdina y piocianina. Por el contrario, los aislados procedentes de pacientes con BNFQ no secretaron piocianina. Al igual que en la otra colección, el pigmento mayoritario fue pioverdina, secretado por 29 cepas (38,6%). Así mismo, se observó piorrubina y piomelanina en 1 (1,3%) y 3 (4%) aislados, respectivamente. Finalmente, 2 aislados (2,6%) secretaron una mezcla de pioverdina y piomelanina.

Si bien el fenotipo no mucoide predominó en ninguna colección, es importante mencionar que 17 cepas de FQ y 1 de BNFQ presentaron a la vez un fenotipo mucoide y fueron secretoras de pigmentos.

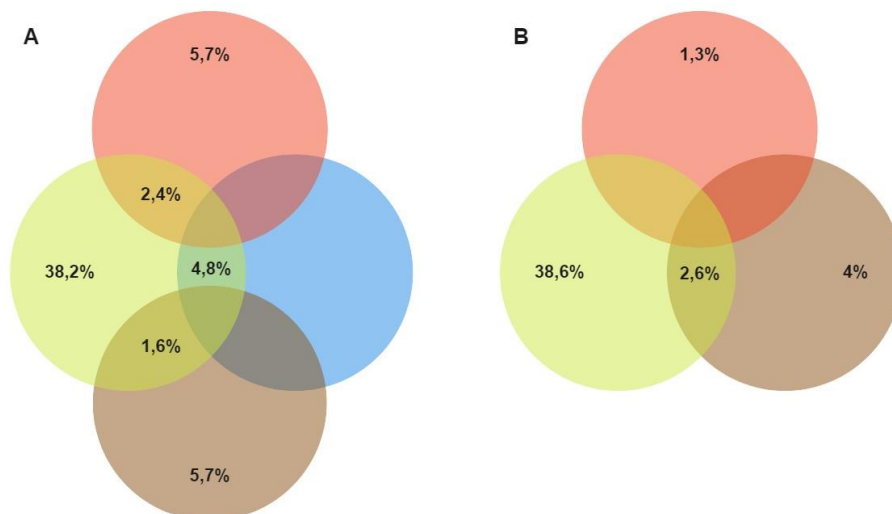


Figura 32. Diagrama de Venn. Secreción de pigmentos: piorrubina (rojo), pioverdina (amarillo), piocianina (azul), piomelanina (marrón). A) Colección de aislados de FQ. B) Colección de aislados de BNFQ

Por otra parte, se determinó cualitativamente la producción de hemólisis de los aislados, basándonos en la presencia de un halo de hemólisis alrededor de las colonias que crecieron en placas de agar sangre. El 100% de los aislados de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con BNFQ presentaron hemólisis, frente al 95,3% de los aislados de pacientes con FQ.

2. Análisis de la sensibilidad a los antibióticos

Los porcentajes de aislados sensibles (S), intermedios (I) y resistentes (R) a los 15 agentes antimicrobianos con actividad antipseudomonas de las dos colecciones estudiadas se muestran en la Figura 33.

Entre los aislados de *P. aeruginosa* de pacientes con FQ, la colistina fue el antimicrobiano más efectivo, con un 72,3% (n=89) de aislados sensibles a este agente. En cuanto a los aminoglucósidos, amikacina mostró una mayor efectividad con un 63,5% (n=78) de aislados sensibles, en comparación con tobramicina y gentamicina que mostraron un 57% (n=70) y 55,3% (n=68) de aislados sensibles, respectivamente. El 48% de los aislados (n=59) fue sensible a la fosfomicina. La efectividad de meropenem destacó entre los carbapenémicos con un 41,5% (n=51) de aislados sensibles, frente al 37,4% (n=46) de doripenem.

En contraste, los resultados obtenidos para los aislados de pacientes con BNFQ mostraron que amikacina tuvo la mayor efectividad, con un 80% (n=60) de aislados sensibles, seguido de colistina con un 68% (n=51) de aislados sensibles. El 37,4% (n=28) de los aislados fueron sensibles a gentamicina y tobramicina y el 45,4% (n=34) lo fueron a fosfomicina. A diferencia de la colección de aislados de FQ, el carbapenémico más efectivo fue doripenem, mostrando un 21,4% (n=16) de aislados sensibles, con respecto al 17,4% (n=13) de cepas sensibles a meropenem.

Todos los aislados de *P. aeruginosa* de ambas colecciones resultaron ser intermedios y resistentes a aztreonam, cefepime, ceftazidima, piperacilina, piperacilina-tazobactam, imipenem, levofloxacin y ciprofloxacino.

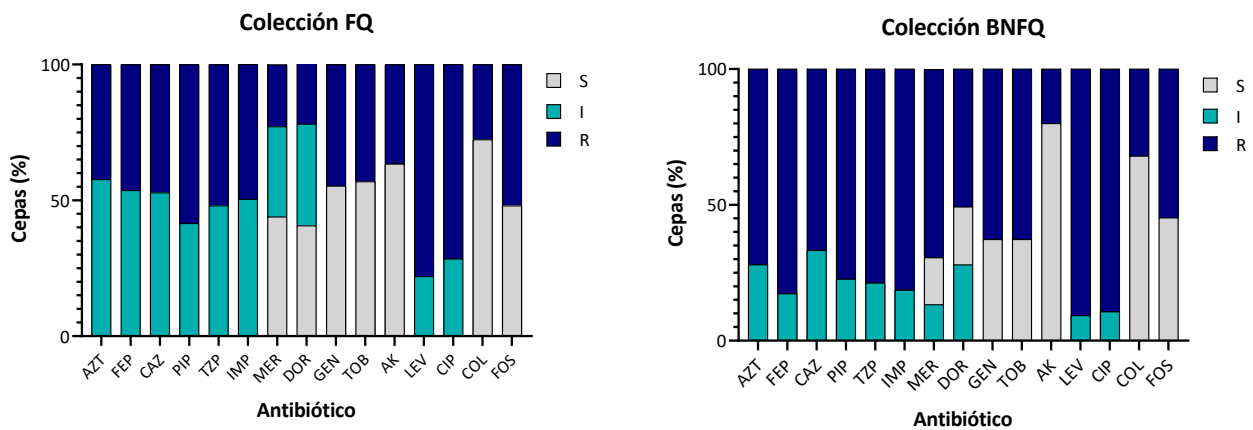


Figura 33. Análisis de sensibilidad a antibióticos

S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente

Una vez analizados los valores de las CMI de los diferentes antibióticos, se determinaron los perfiles de resistencia de los aislados basándonos en los criterios sugeridos anteriormente por un comité de expertos (25) (Figura 34). En la colección derivada de pacientes con FQ, 12 cepas (10%) se catalogaron como multiS, 29 cepas (24%) como modR, 73 cepas (59%) como MDR y 9 cepas (7%) como XDR. Así mismo, para la colección derivada de pacientes con BNFQ, 2 cepas (3%) presentaron un perfil multiS, 9 cepas (12%) fueron modR, 54 cepas (72%) fueron MDR y 10 cepas (13%) se catalogaron como XDR.

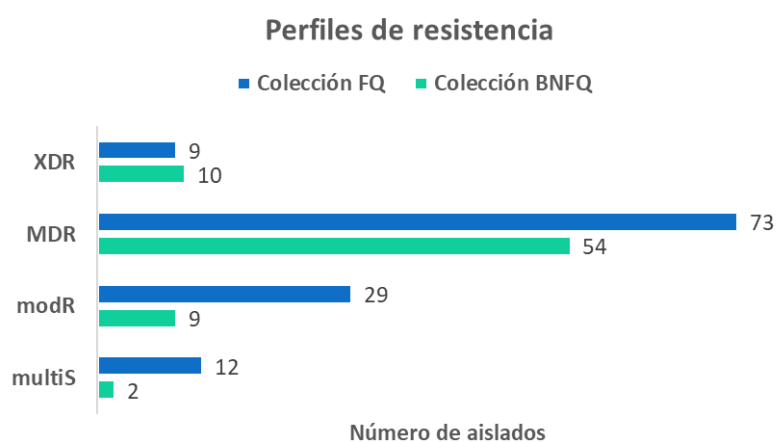


Figura 34. Perfiles de resistencia

3. Tipificación molecular

3.1. Electroforesis en campo pulsado (PFGE)

La relación clonal de los 198 aislados de ambas colecciones fue analizada mediante PFGE. En la colección aislada de pacientes con FQ se detectó un total de 27 patrones genéticos o pulsotipos distintos y 41 subtipos (Tabla 11). Por regla general se observó que los aislados precedentes de un mismo paciente presentaban el mismo pulsotipo y en algunos casos varios subtipos. Con excepción de tres pacientes, P10, P11 y P15, donde se observó que estos presentaron aislados con diferentes pulsotipos. De los 9 aislados procedentes del paciente P10, 8 pertenecían al pulsotipo designado como J (subtipos J1-J5) y uno al pulsotipo S. Por otro lado, del paciente P11 se obtuvieron 6 aislados, de los cuales 1 pertenecía al patrón V, 2 aislados pertenecían al subtipo A4 y los dos restantes pertenecían a los subtipos U1 y U2. Finalmente, del paciente P15 se obtuvieron 3 aislados, los cuales pertenecían a 3 pulsotipos diferentes, P, Q y B.

Tabla 11. Distribución de patrones genéticos entre los aislados de pacientes con FQ

Paciente	Fuente	Pulsotipo	Subtipo	Nº de aislados
P1	Espudo	K	K1	1
			K2	12
			K3	1
P2	Espudo	H	H1	1

Paciente	Fuente	Pulsotipo	Subtipo	Nº de aislados
			H2	1
			H3	2
			H4	1
			H5	1
P3	Frotis faríngeo	O	-	1
P4	Esputo	D	D1	5
			D2	1
P5	Esputo	W	W1	5
			W2	1
			W3	1
			W4	4
			W5	1
			W6	1
			W7	1
			W8	1
			Aspirado traqueal	W5
	P6	Esputo	E	-
P7	Esputo	R	R1	4
			R2	1
P8	Esputo	Z	Z1	3
			Z2	1
			Z3	2
P9	Esputo	A	A1	1
			A2	8
			A3	2
P10	Esputo	J	S	1
			J1	2
			J2	1
			J3	3
			J4	1
			J5	1

Paciente	Fuente	Pulsotipo	Subtipo	Nº de aislados
P11	Esputo	V	-	1
		U	U1	1
			U2	1
	A	A4	2	
	Biopsia pulmonar	U	U1	1
P12	Esputo	I	I1	1
			I2	3
			I3	1
	Biopsia pulmonar		I3	1
P13	Esputo	N	-	1
P14	Frotis faríngeo	Y	-	1
P15	Esputo	P	-	1
		Q	-	1
	Lavado broncoalveolar	B	-	1
P16	Frotis faríngeo	X	-	1
P17	Frotis faríngeo	M	-	3
P18	Esputo	G	-	3
	Aspirado traqueal		-	2
P19	Frotis faríngeo	C	-	1
P20	Esputo	L	-	5
P21	Esputo	T	T1	2
			T2	1
P22	Esputo	F	F1	7
			F2	1
	Líquido pleural		F1	1
	Biopsia pulmonar		F1	1
	Aspirado bronquial		F1	1
	Hemocultivo	F1	1	
P23	Esputo	AA	-	1

En la colección de aislados de pacientes con BNFQ se detectaron 16 pulsotipos y 14 subtipos diferentes (Tabla 12). Al igual que en la colección anterior, se dieron casos en los que aislados de un mismo paciente presentaban patrones genéticos diferentes. Esto ocurrió en los pacientes P31 y P34. Del paciente P31 se obtuvieron 2 aislados pertenecientes a los pulsotipos GG y EE, y, del paciente P34 se obtuvieron 10 aislados, de los cuales 2 pertenecían al pulsotipo FF, otros 2 al pulsotipo NN y 6 aislados al pulsotipo MM. Un hecho interesante fue que, además de encontrar distintos patrones genéticos en un mismo paciente, se encontró un mismo patrón genético en distintos pacientes. El subtipo A4 se encontró en P26, P30 y P40, mientras que los subtipos A5 y A7 se encontraron en P26 y P40.

Cabe destacar que el pulsotipo A que incluye los subtipos A1-A9, que se encontró distribuido en ambas colecciones. Los subtipos A1 y A3 se encontraron solamente en aislados procedentes de pacientes con de FQ, mientras que los subtipos A5-A9 aparecieron solo en aislados de pacientes con BNFQ. Sin embargo, aislados que presentaban los subtipos A2 y A4 fueron encontrados en ambas colecciones. El subtipo A2 estuvo presente en un paciente de cada colección y el subtipo A4 lo estuvo en 3 pacientes de BNFQ y uno de FQ.

Tabla 12. Distribución de patrones genéticos entre las cepas aisladas de pacientes con BNFQ

Paciente	Fuente	Pulsotipo	Subtipo	Nº de aislados
P24	Esputo	CC	CC1	1
			CC2	1
P25	Esputo	LL	LL1	1
			LL2	1
			LL3	1
P26	Esputo	A	A4	11
	Lavado broncoalveolar		A4	2
			A5	2
	Esputo		A6	2
			A7	1
P27	Esputo	A	A9	2
P28	Esputo	PP	-	2

Paciente	Fuente	Pulsotipo	Subtipo	Nº de aislados
P29	Esputo	II	-	1
P30	Esputo	A	A4	1
P31	Esputo	GG	-	1
		EE	-	1
P32	Esputo	A	A2	2
P33	Esputo	HH	-	1
P34	Esputo	FF	FF1	1
			FF2	1
	Lavado broncoalveolar	MM	-	2
			Esputo	-
P35	Esputo	KK	-	5
P36	Esputo	OO	-	6
P37	Esputo	JJ	-	1
P38	Esputo	BB	-	7
P39	Esputo	DD	-	1
P40	Esputo	A	A4	3
			A5	1
			A7	4
			A8	2
	Hemocultivo	A7	1	

3.2. Análisis de MLST

Mediante MLST se identificaron las secuencias tipo (ST) de los aislados de ambas colecciones. En la colección de FQ se identificaron las secuencias tipo ST155, ST179, ST198, ST274, ST293, ST379, ST443, ST446, ST455, ST569, ST1399, ST2238, ST2455, ST3449, ST175, ST253 y ST260, mientras que los ST17, ST111, ST179, ST252, ST308, ST312, ST313, ST447, ST560, ST575, ST1249, ST175 y ST253 se encontraron en la colección de BNFQ.

Como se puede ver en el dendrograma de la Figura 36 y en los diagramas de la Figura 35, los ST253, ST175 y ST274 fueron los predominantes y los clones ST175, ST179 y ST253 fueron comunes a

ambas colecciones. Los clones ST175, ST253, ST260 y ST569 contenían aislados de varios pacientes. El ST175 englobaba aislados de los pacientes P9, P11, P15, P26, P27, P30, P32, P35 y P40. En el ST253 estaban incluidos aislados de los pacientes P3, P5, P7, P15, P16, P31 y P33. Los aislados de los pacientes P14 y P20 pertenecían al ST260 y al ST569 pertenecían los aislados de los pacientes P13 y P21.

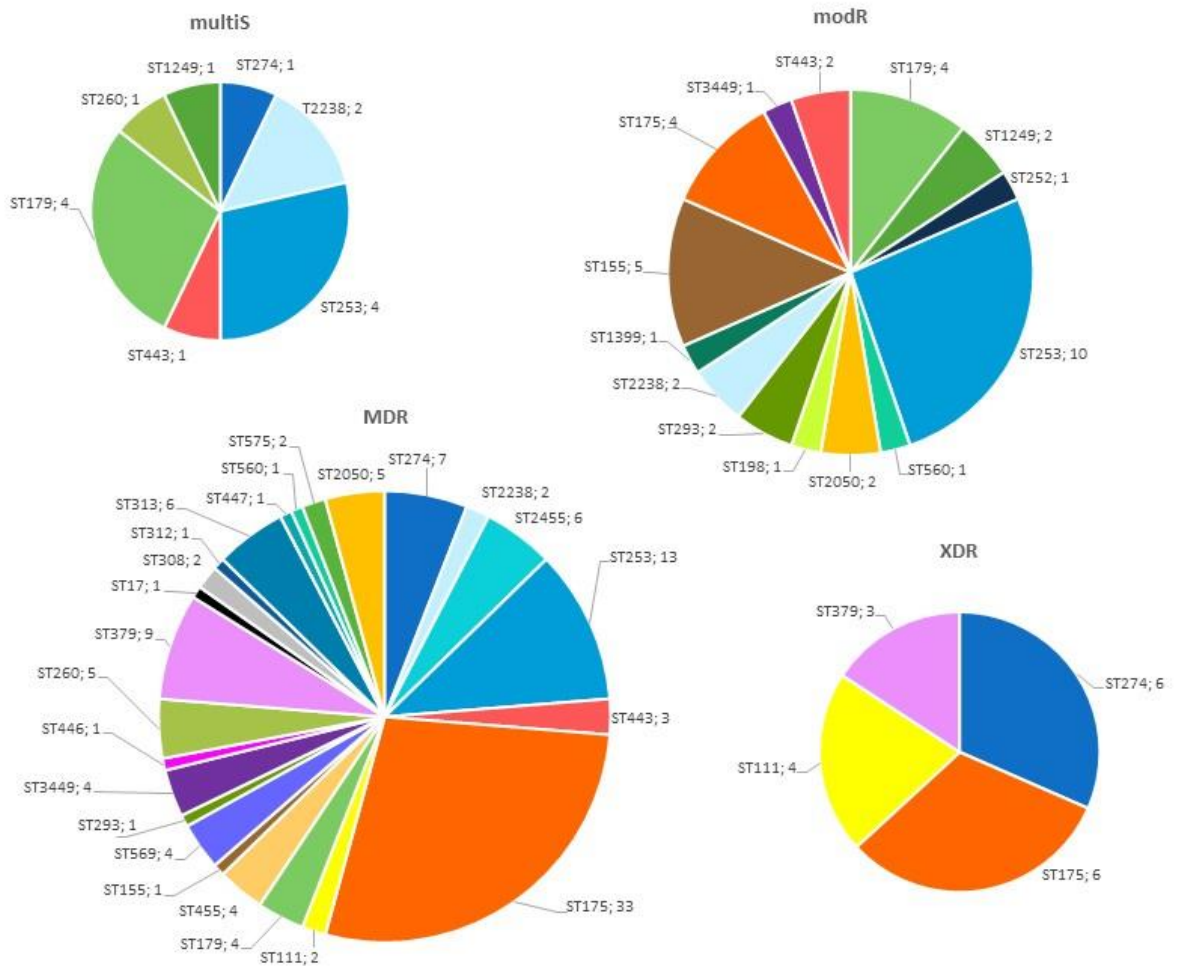


Figura 35. Distribución de ST entre los perfiles de resistencia

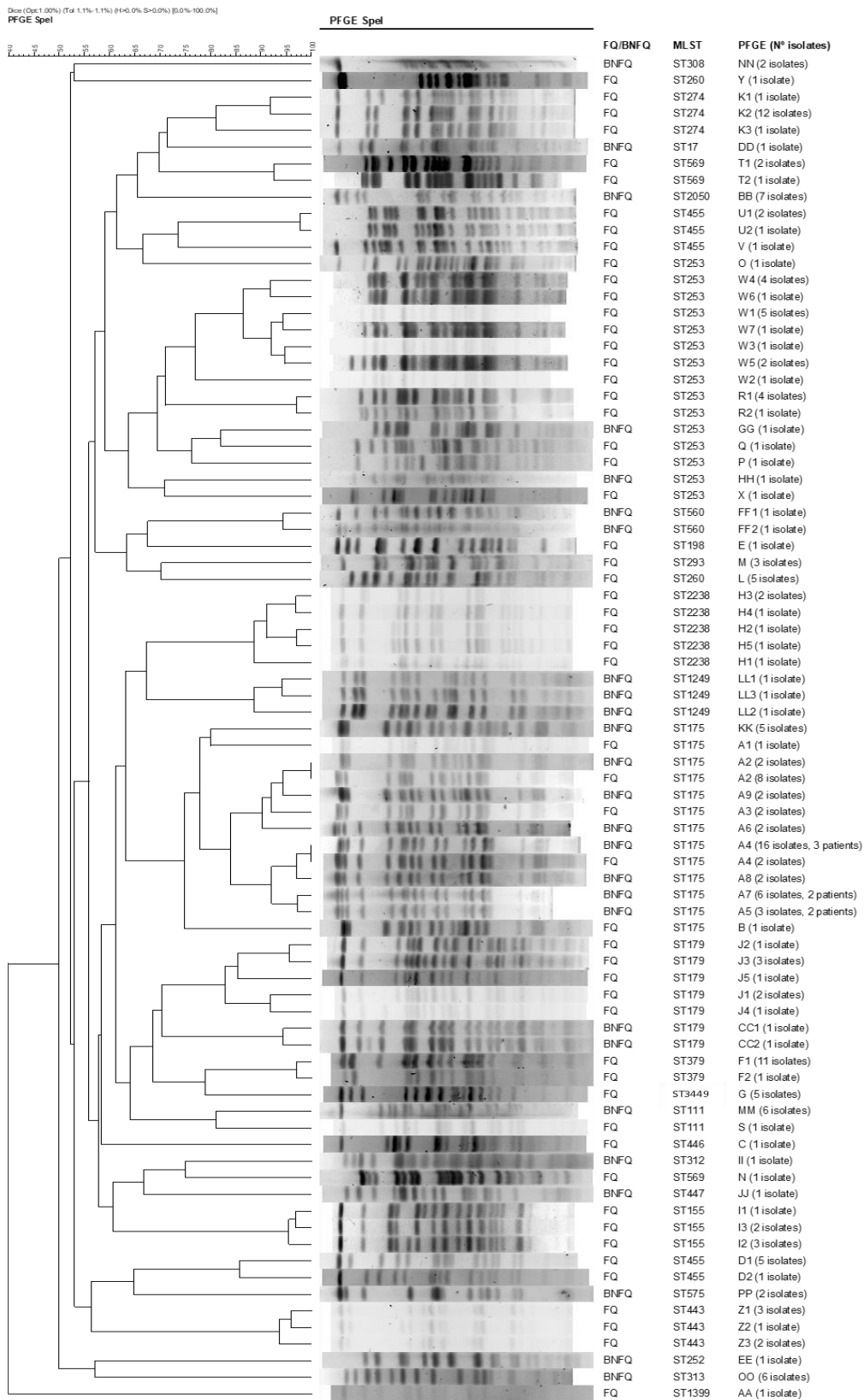


Figura 36. Dendrograma de los 198 aislados de *P. aeruginosa*

En este trabajo describimos por primera vez el ST3449 en 5 aislados del paciente P18. La combinación de alelos de los 7 genes endógenos del ST3449 se muestra a continuación:

<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>guaA</i>	<i>mutL</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>trpE</i>
28	150	11	7	27	6	7

4. Secuenciación masiva de genomas de aislados de *P. aeruginosa*

Se realizó una selección de 79 aislados representativos de cada patrón genético (Tabla B1 del Anexo 1). Para el análisis de las secuencias se utilizó el pipeline TORMES (145). En la Tabla 13 se detalla la información referente al control de calidad de las muestras. Con este análisis se corroboraron los ST obtenidos mediante la técnica de PCR.

Tabla 13. Control de calidad de los 79 genomas secuenciados

	FQ	BNFQ
Average number of reads per sample	1 816 728	947 000
Average read length	262 bp	262 bp
Average number of contigs per sample	161	206
Average draft genome length per sample	6 651 277 bp	6 820 132 bp
Average contig length per sample	603 885 bp	498 389 bp
Average N50 per sample	226 808 bp	167 552 bp
Average GC content per sample	66,104%	66,07%
Average sequencing depth	69,579 X	35,464 X

4.1. Pangenoma

En la Figura 37 se representa el análisis el pangenoma de los 79 aislados donde se diferencian los genes core y genes accesorios. Los genes core son aquellos presentes en el 99-100% de los genomas comparados. Entre los genes accesorios podemos distinguir los genes soft core,

compartidos en el 95-99% de los genomas comparados, genes shell, compartidos en el 15-95% de los genomas comparados, y genes cloud, compartidos en el 0-15% de los genomas comparados. En los aislados de la colección de FQ se identificaron 12515 genes, de los cuales 4219 (33%) eran genes core y 8296 (67%) eran genes accesorios. Por otro lado, en los aislados de la colección de BNFQ se identificaron 12630 genes, de los cuales 4673 (37%) eran genes core y 7957 (63%) eran genes accesorios.

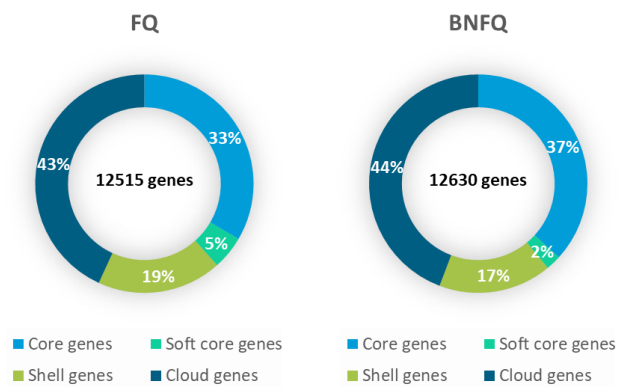


Figura 37. Pangenoma: Genes core y genes accesorios

La heterogeneidad de los aislados se puede observar en las Figuras 38 y 39, donde se representa de manera esquemática la presencia o ausencia de genes y cladogramas basados en los alineamientos de los genes core y accesorios. La nomenclatura que aparece en estas figuras fue la utilizada durante el proceso de secuenciación. En la Tabla C1 del Anexo 1 se describe la nomenclatura asignada a cada aislado.

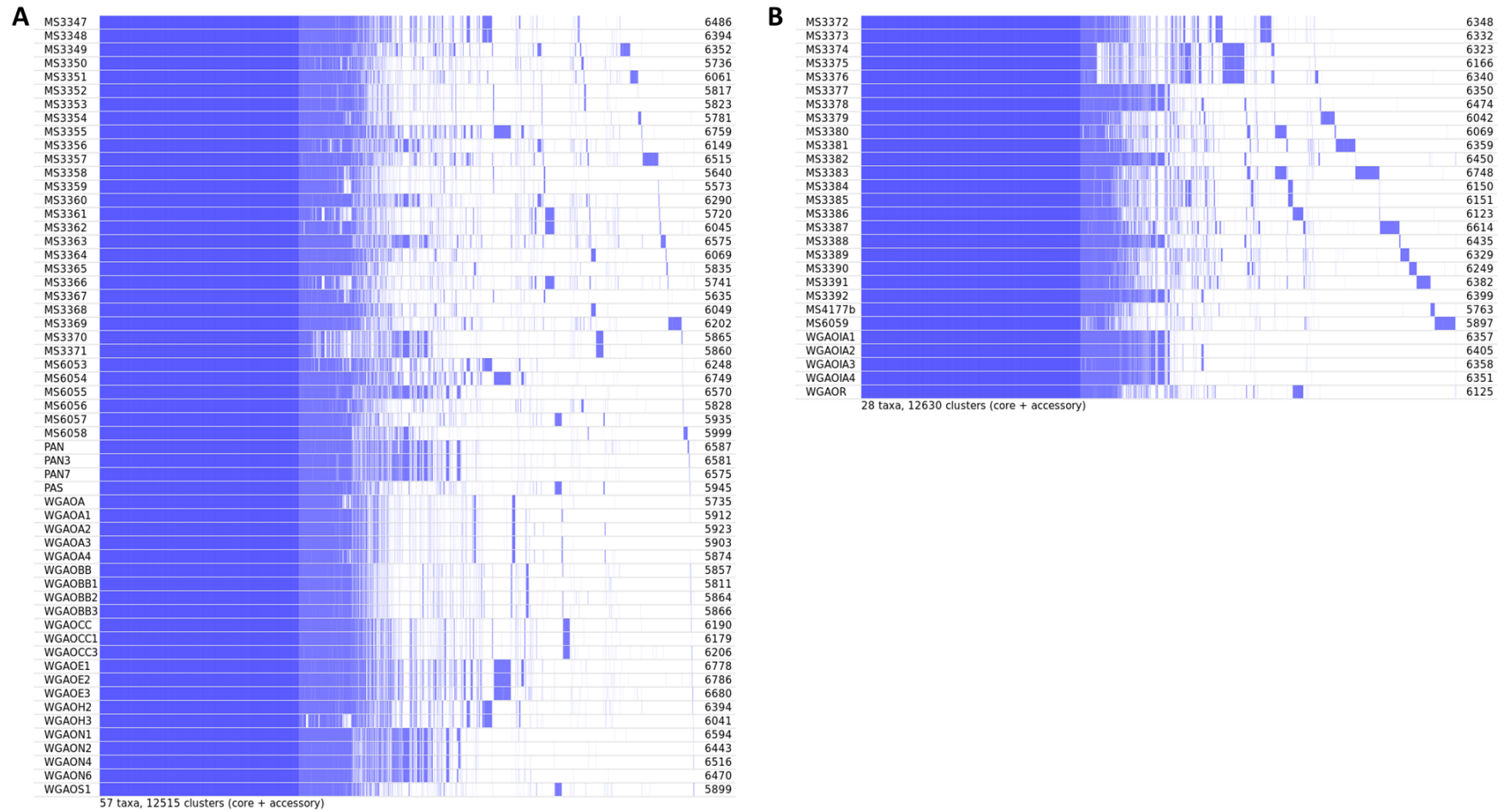
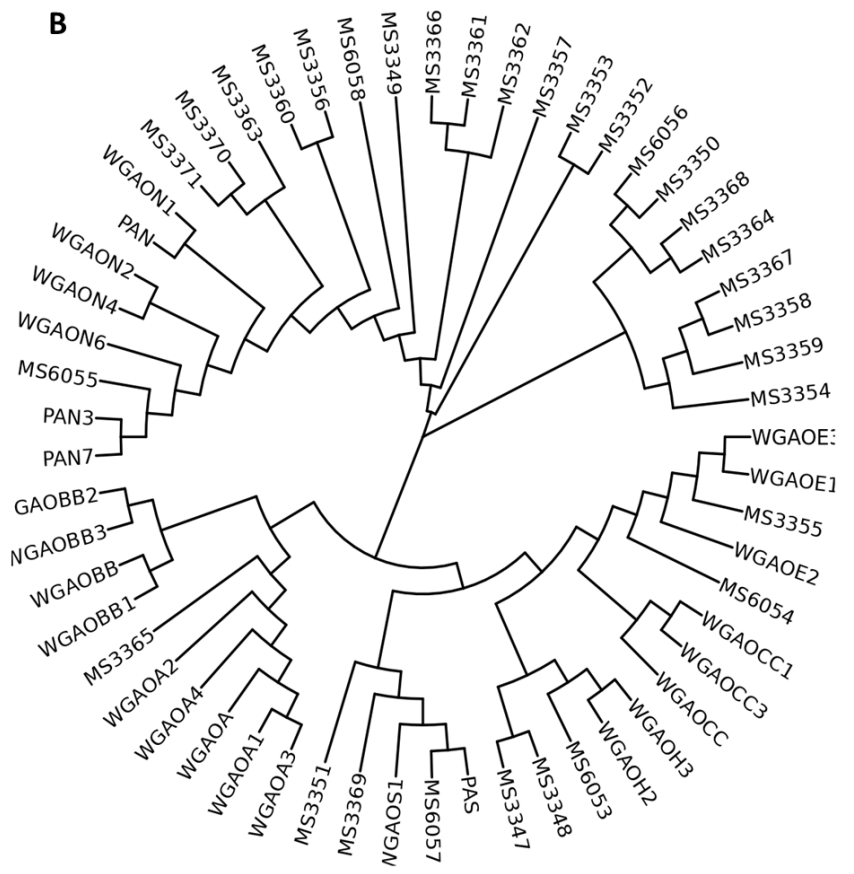
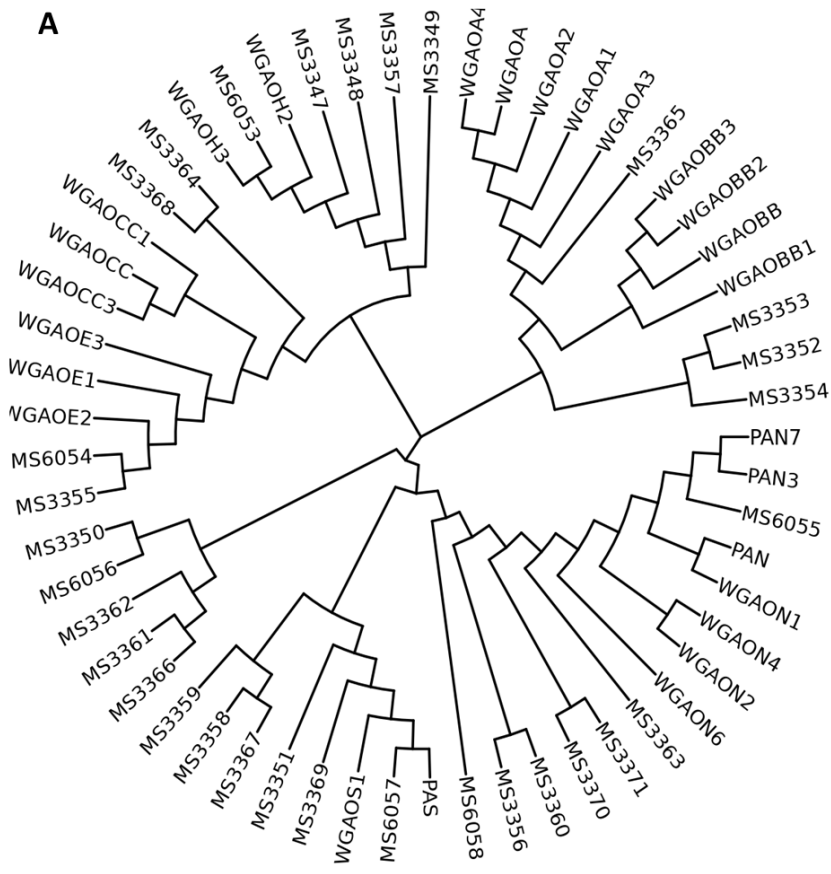


Figura 38. Representación esquemática de la presencia (azul) o ausencia (blanco) de genes. A) Colección FQ. B) Colección BNFQ



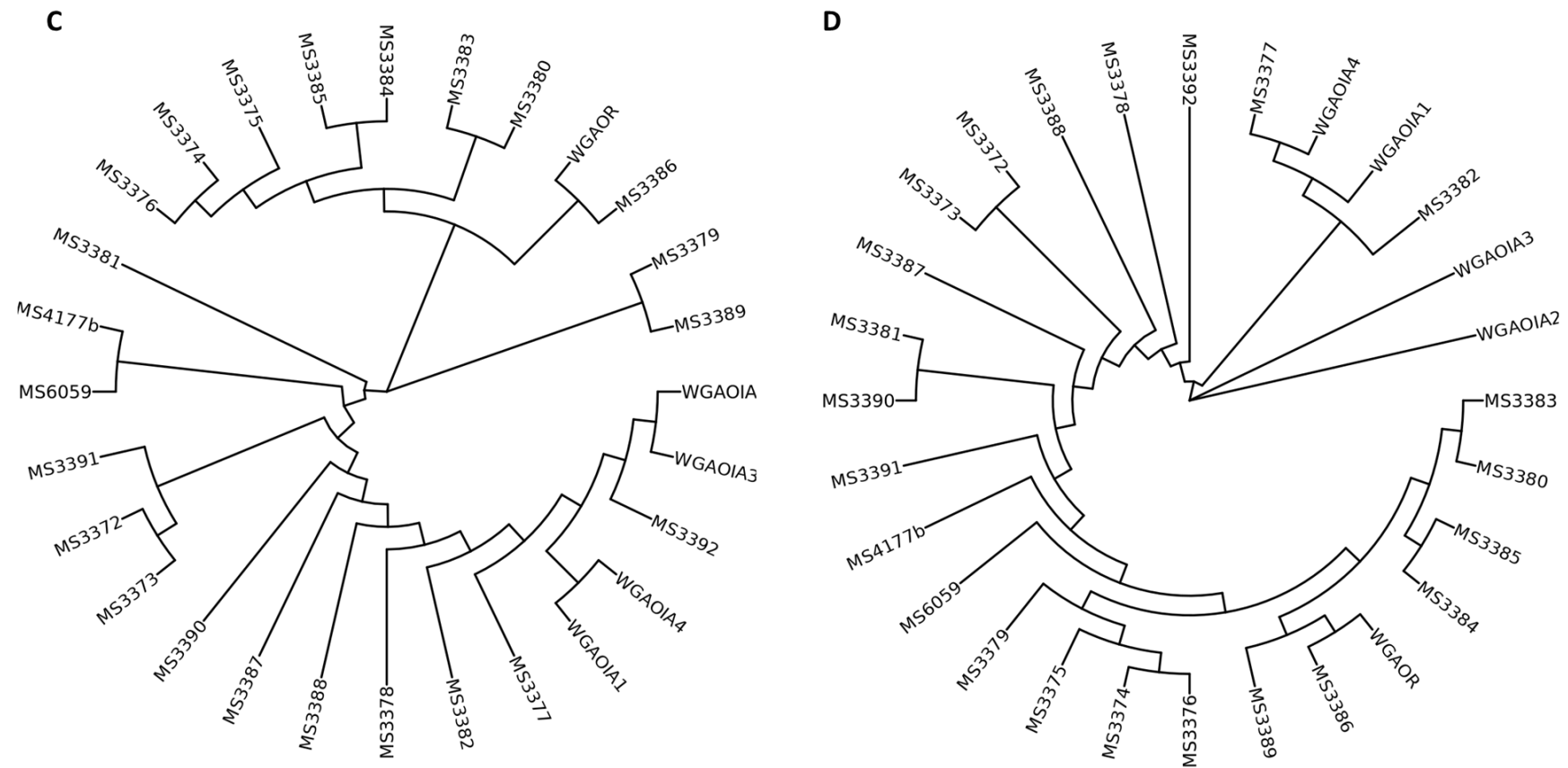


Figura 39. Cladogramas según presencia/ausencia de genes accesorios (A) y genes core (B) en los aislados de FQ y presencia/ausencia de genes accesorios (C) y genes core (D) en los aislados de BNFQ.

4.2. Serotipado *in silico*

Se realizó el serotipado *in silico* de los 79 genomas utilizando el software PAST. Como se puede observar en los gráficos de la Figura 40, existe una mayor diversidad de serotipos en la colección BNFQ. Dentro de la colección FQ se encontraron los serotipos O3, O4, O6, O7, O10, O11 y O12, siendo O6 y O10 los mayoritarios, englobando el 44,4 y 24% de los aislados, mientras que en la colección BNFQ se detectaron los serotipos O1, O2, O4, O6, O7, O10, O11 y O12, siendo O4 y O10 los mayoritarios, englobando el 36 y 20% de los aislados.

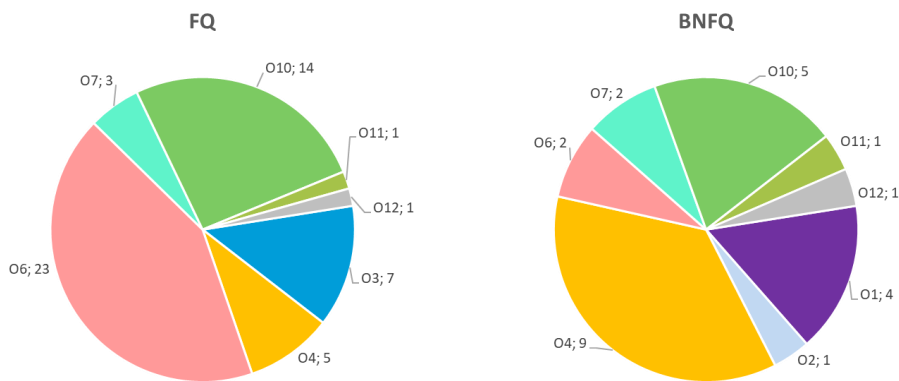


Figura 40. Serotipos de los aislados de *P. aeruginosa*

4.3. Resistoma de *P. aeruginosa*

Se estudió el resistoma de los 79 aislados representativos de cada patrón genético. Para la identificación de los genes de resistencia se emplearon los softwares ResFinder y CARD, incluidos en el pipeline TORMES. Una vez identificados, se utilizó el software MEGA para alinear estos genes con los de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 y analizar las mutaciones y/o polimorfismos encontrados. Todos los aislados eran resistentes o intermedios a betalactámicos, carbapenémicos y fluoroquinolonas; 34 aislados (43%) lo eran a aminoglucósidos, 20 aislados (25,3%) a colistina y 37 aislados (46,8%) lo fueron a fosfomicina.

4.3.1. Genes de resistencia a betalactámicos y carbapenémicos: Presencia de betalactamasas, alteraciones en AmpC y alteraciones en la porina OprD

Además de la presencia de betalactamasas, las mutaciones que conllevan a la sobreexpresión de AmpC se relacionan con un aumento de la resistencia a betalactámicos. Las alteraciones en el regulador transcripcional AmpR, así como mutaciones en los genes codificantes de las amidasas AmpD, AmpDh2 y AmpDh3, y mutaciones que alteran e inactivan las PBP conllevan a la sobreexpresión de AmpC, y por ende, al aumento de la resistencia a betalactámicos (166–168).

Los 79 aislados secuenciados fueron resistentes a betalactámicos. En 62 de ellos se detectaron mutaciones puntuales en *ampC* que llevaron a cambios aminoacídicos en AmpC (Tabla 14), siendo T₁₀₅A el más común, encontrado en 60 de ellos. En 14 aislados no se detectaron variaciones con respecto a la cepa control *P. aeruginosa* PAO1. Los genes *ampC* y *ampR* estuvieron ausentes en 12-6304, 13-0950 y 13-2772, pertenecientes al ST253. Se encontraron mutaciones en *ampR* en 31 aislados, siendo la mayoría cambios en aminoácidos; el aislado 13-2025 presentó la delección de 31 bp entre las posiciones 860 y 891 afectando al marco de lectura, y en 12-6494 la secuencia se vio interrumpida por un codón de parada, provocado por la inserción de un nucleótido entre las posiciones 860 y 861. Por otro lado, *ampD* estuvo ausente en 17 de los aislados y se encontraron sustituciones de aminoácidos en AmpD en 44, siendo G₁₄₈A y D₁₈₃Y las más comunes. En los aislados 14-1716 y 14-0035 se detectaron cambios aminoacídicos en AmpDh2 y en 12-5984 y 13-1058 la secuencia estuvo alterada por la delección de 7 bp al inicio de la secuencia. Por último, 44 aislados presentaron cambios en aminoácidos en AmpDh3, siendo A₂₁₉T el más común entre ellos; la secuencia de los aislados 12-1127 y 12-1346 estuvo truncada por la inserción de un nucleótido entre las posiciones 42 y 43 y en 13-0950 y 13-2772 *ampDh3* estuvo ausente. Así mismo, se encontraron mutaciones en los genes codificantes de las PBP (Penicillin binding proteins) (Tabla 15). Las alteraciones que inactivan estos genes, o la ausencia de estos, puede inducir la sobreexpresión de AmpC e incrementar los valores de CMI de AZT, FEP, CAZ y PIP (169).

Se encontraron las variantes de AmpC, PDC (*Pseudomonas* derived cephalosporinase), los siguientes aislados:

- PDC-1 (15 aislados): 12-0560, 12-5803, 13-5524, 14-3192, 13-1070, 13-1456, 13-1791, 14-3875, 12-7117, 12-6599, 13-5832, 13-5857 y 14-0867, secuenciotipo ST175, 08-0034, secuenciotipo ST111 y 14-0919, secuenciotipo ST293.
- PDC-2 (1 aislado): 12-5709, secuenciotipo ST446.
- PDC-3 (22 aislados): 14-0116, 13-2025, 14-1716, 13,5570, secuenciotipos ST111, ST179, ST198 y ST252, respectivamente, 12-6353 y 13-0865, secuenciotipo ST260, 15-6548 y 15-7690, secuenciotipo ST379, 12-5970, secuenciotipo ST447, 12-0805, 13-2507, 13-5486, secuenciotipo ST455, 13-2077, 13-3189 y 13-4111, secuenciotipo ST1249, 15-0788, secuenciotipo ST1399, 14-0294, 14-0421, 14-0652, 14-3223, 14-3362, secuenciotipo ST2238 y 12-6494, secuenciotipo ST3449.
- PDC-5 (12 aislados): 13-3298, 13-3423, 13-3753 y 13-5627, secuenciotipo ST155, 07,2043, 11-4059, 12-1371 y 12-1767, secuenciotipo ST443, 12-6547, 14-2563, 15-4983, secuenciotipo ST569, y 15-0495, secuenciotipo ST2360.
- PDC-7 (3 aislados): 12-3148, 13-6203 y 14-0035, secuenciotipos ST312, ST308 y ST313, respectivamente.
- PDC-8 (7 aislados): 13-3150, secuenciotipo ST17, 10,5351, secuenciotipo ST175 y 14-2595, 15-7136, 15-7350, 12-2603 y 12-3870, secuenciotipo ST179.
- PDC-9 (12 aislados): 08-6073, 11-1196, 12-1127, 12-1159, 12-1251, 12-1345, 12-1346, 12-1802, 13-1575, 12-5984, 13-4215 y 13-1058, secuenciotipo ST253.
- PDC-10 (4 aislados): 14-2158 y 14-2184, secuenciotipo ST274 y 12-2600 y 12-5422, secuenciotipo ST560.

Se encontraron además los genes que codifican las oxacilinasas OXA-46, OXA-50, OXA-395 y OXA-396, además del gen *bla_{PAO}*, identificado en 52 de los aislados.

Tabla 14. Susceptibilidad a betalactámicos y carbapenémicos y mutaciones en AmpC y sus reguladores

Aislado	CMI (µg/ml)								AmpC	AmpR	AmpD	AmpDh2	AmpDh3
	AZT	FEP	CAZ	PIP	TZP	IMP	MER	DOR					
14-2158	8	8	8	16	32	8	8	8	T ₂₁ A, T ₁₀₅ A, G ₃₉₁ A	wt	-	wt	wt
14-2184	>128	>128	>128	>256	>256	64	64	>64	T ₂₁ A, T ₁₀₅ A, G ₃₉₁ A	E ₈₈ K	-	wt	wt
14-0294	0,5	16	2	256	256	4	1	1	T ₁₀₅ A	wt	-	wt	wt
14-0421	0,5	8	2	4	4	2	2	2	T ₁₀₅ A	wt	-	wt	wt
14-0652	0,25	4	1	4	4	1	0,5	0,5	T ₁₀₅ A	wt	-	wt	wt
14-3223	2	4	4	8	16	2	0,5	1	T ₁₀₅ A	wt	A ₁₃₆ V, G ₁₄₈ A	wt	wt
14-3362	1	4	2	4	16	1	0,25	1	T ₁₀₅ A	wt	-	wt	wt
15-0495	16	64	64	128	128	32	8	16	R ₇₉ Q, T ₁₀₅ A	G ₂₈₃ E, M ₂₈₈ R	G ₁₄₈ A	wt	A ₂₁₉ T
08-6073	8	8	4	32	16	1	2	1	G ₂₇ D, A ₅₅ T, T ₁₀₅ A, Q ₁₅₅ R, V ₂₀₅ L, G ₃₉₁ A	E ₁₁₄ A, G ₂₈₃ E, M ₂₈₈ R	wt	wt	wt
11-1196	4	4	2	16	8	16	8	4	G ₂₇ D, A ₅₅ T, T ₁₀₅ A, Q ₁₅₅ R, V ₂₀₅ L, G ₃₉₁ A	E ₁₁₄ A, G ₂₈₃ E, M ₂₈₈ R	wt	wt	wt
12-1127	32	8	16	128	128	16	4	4	G ₂₇ D, A ₅₅ T, T ₁₀₅ A, Q ₁₅₅ R, V ₂₀₅ L, G ₃₉₁ A	E ₁₁₄ A, G ₂₈₃ E, M ₂₈₈ R	-	wt	Ins ₄₂₋₄₃ C
12-1159	2	2	0,5	4	4	2	2	1	G ₂₇ D, A ₅₅ T, T ₁₀₅ A, Q ₁₅₅ R, V ₂₀₅ L, G ₃₉₁ A	E ₁₁₄ A, G ₂₈₃ E, M ₂₈₈ R	-	wt	wt
12-1251	128	16	128	256	256	16	32	16	G ₂₇ D, A ₅₅ T, T ₁₀₅ A, Q ₁₅₅ R, V ₂₀₅ L, G ₃₉₁ A	E ₁₁₄ A, G ₂₈₃ E, M ₂₈₈ R	-	wt	wt
12-1345	8	1	1	1	1	1	1	1	G ₂₇ D, A ₅₅ T, T ₁₀₅ A, Q ₁₅₅ R, V ₂₀₅ L, G ₃₉₁ A	E ₁₁₄ A, G ₂₈₃ E, M ₂₈₈ R	wt	wt	wt
12-1346	64	8	32	>256	>256	16	4	16	G ₂₇ D, A ₅₅ T, T ₁₀₅ A, Q ₁₅₅ R, V ₂₀₅ L, N ₃₄₇ S, G ₃₉₁ A	E ₁₁₄ A, G ₂₈₃ E, M ₂₈₈ R	wt	wt	Ins ₄₂₋₄₃ C
12-1802	64	16	16	64	64	64	32	32	G ₂₇ D, A ₅₅ T, T ₁₀₅ A, Q ₁₅₅ R, V ₂₀₅ L, G ₃₉₁ A	E ₁₁₄ A, G ₂₈₃ E, M ₂₈₈ R	wt	wt	wt
14-1716	16	8	2	8	16	2	1	1	T ₁₀₅ A, V ₂₀₅ L	M ₂₈₈ R	Q ₄₄ H, G ₁₄₈ A, D ₁₈₃ Y	G ₅₉ D	A ₂₁₉ T

Aislado	CMI (µg/ml)								AmpC	AmpR	AmpD	AmpDh2	AmpDh3
	AZT	FEP	CAZ	PIP	TZP	IMP	MER	DOR					
12-6304	8	2	2	4	4	0,5	2	2	-	-	wt	wt	wt
13-1575	4	2	4	64	64	2	1	4	G27D, A55T, T105A, Q155R, V205L, G391A	L30M, E114A, G283E, M288R	V90A	wt	wt
07-2043	4	16	8	128	128	8	4	4	R79Q, T105A	wt	-	wt	D235G
11-4059	2	8	2	16	1	2	0,125	0,125	R79Q, T105A	wt	-	wt	D235G
12-1371	4	32	16	64	64	2	0,5	2	R79Q, T105A	wt	-	wt	D235G
12-1767	16	16	16	64	64	1	0,25	0,5	R79Q, T105A	wt	A136V, G148A	wt	D235G
10-5351	1	0.5	1	8	≤0.25	0,25	0,06	0,125	T105A, L176R	wt	Q44H, G148A, D183Y	wt	A219T
12-0560	1	0.5	1	8	≤0.25	0,25	0,06	0,125	wt	wt	G148A, D183Y	wt	A219T
12-5803	16	8	32	256	256	0,5	0,5	1	wt	wt	-	wt	A219T
08-0034	0,5	4	32	128	128	4	0,5	0,5	wt	wt	G148A, D183Y	wt	A219T
13-2025	0,5	32	2	2	2	4	1	0,5	T105A	Δ _{nt} 860-891.	G148A	wt	A219T
14-2595	0,5	32	2	2	2	4	1	0,5	T105A, L176R	wt	Q44H, G148A, D183Y	wt	A219T
15-7136	64	16	64	256	256	32	4	8	T105A, L176R	wt	Q44H, G148A, D183Y	wt	A219T
15-7350	128	64	128	64	64	32	16	16	T105A, L176R, D234G, V339A	wt	Q44H, G148A, D183Y	wt	A219T
12-0805	64	32	>128	>256	>256	32	16	16	T105A	wt	G148A, S175L	wt	A219T
13-2507	>128	>128	>128	>256	>256	32	16	16	T105A, V239A	wt	G148A, S175L	wt	A219T
13-5486	>128	>128	>128	>256	>256	8	4	8	T105A, Q146K, V239A	wt	G148A, S175L	wt	A219T
13-5524	64	128	64	64	64	16	64	32	wt	wt	T139M, G148A, D183Y	wt	A219T
13-3298	<0,125	8	0,13	0,5	1	2	0,125	0,25	R79Q, T105A	wt	-	wt	A219T
13-3423	1	16	2	8	8	4	0,5	1	R79Q, T105A	wt	Q44H, G148A, D183Y	wt	A219T
13-3753	0,25	1	0,25	0,5	0,5	1	0,125	0,25	R79Q, T105A	wt	Q44H, G148A, D183Y	wt	A219T
13-5627	0,25	2	0,13	1	1	2	0,25	1	R79Q, T105A	wt	Q44H, G148A, D183Y	wt	A219T
12-6547	16	8	4	16	16	4	2	0,5	R79Q, T105A, S254N	G283E, M288R	G148A, D183Y	wt	wt
12-6353	8	2	4	8	4	1	0,25	0,125	T105A, D272N	wt	G46S, G148A	wt	A219T
13-0950	8	16	2	8	8	0,25	0,25	0,125	-	-	-	wt	-

Aislado	CMI (µg/ml)								AmpC	AmpR	AmpD	AmpDh2	AmpDh3
	AZT	FEP	CAZ	PIP	TZP	IMP	MER	DOR					
13-2772	<0,125	1	0,5	<0.125	<0.125	0,25	0,125	0,125	-	-	-	wt	-
14-3192	64	32	4	16	16	32	32	16	wt	wt	G148A, D183Y	wt	A219T
12-5984	4	1	1	4	4	1	0,25	0,06	G27D, A55T, T105A, Q155R, V205L, G391A	E114A, G283E, M288R	wt	Δ _{NT1-7}	wt
14-0919	8	4	8	8	8	0,25	0,25	0,06	E247G	wt	R11L, G148A, D183Y	wt	V19M, A219T
12-6494	>128	128	128	>256	256	4	2	2	T105A	Ins 860-861a. STOP (292)	G148A, D183Y	wt	A219T
12-5709	8	2	1	4	4	16	4	2	G27D, T105A, V205L, G391A	E114A, G283E, M288R	wt	wt	A219T
13-0865	128	>128	>128	>256	>256	>64	>64	64	T105A, D272N	wt	G148A	wt	A219T
14-2563	64	16	64	128	>256	0,5	0,25	0,25	R79Q, T105A, S254N	G283E, M288R	G148A, D183Y	wt	wt
15-4983	16	8	16	64	64	32	8	8	T105A, S254N	G283E, M288R	G148A, D183Y	wt	wt
15-6548	16	8	8	64	0,5	16	4	4	T105A	wt	G148A	wt	R180L
15-7690	128	32	64	256	256	8	2	1	G27D, T105A, V205L, G391A	E114A, G283E, M288R	wt	wt	A208V
15-0788	0,25	2	0,5	0,5	0,25	0,5	≤0,06	≤0,06	T105A	wt	A136V, G148A	wt	wt
12-2603	4	8	4	4	4	16	2	1	T105A, L176R	wt	Q44H, G148A, D183Y	wt	A219T
12-3870	0,5	16	2	4	4	1	0,06	0,125	T105A, L176R	wt	Q44H, G148A, D183Y	wt	A219T
13-2077	1	2	4	4	4	2	0,5	1	F19L, T105A, L200F, V205L, V356I, G391A	G283E, M288R	wt	wt	wt
13-3189	32	64	64	256	256	16	8	8	F19L, T105A, L200F, V205L, V356I, G391A	G283E, M288R	wt	wt	wt
13-4111	16	16	16	32	32	8	1	1	F19L, T105A, L200F, V205L, V356I, G391A	L236R, G283E, M288R	wt	wt	wt
13-1070	32	64	32	64	64	32	32	32	wt	wt	T139M, G148A, D183Y	wt	A219T
13-1456	32	64	16	32	64	32	32	32	wt	wt	-	wt	A219T
13-1791	8	16	2	8	8	8	8	8	wt	wt	T139M, G148A, D183Y	wt	A219T
14-3875	32	8	16	8	16	32	16	16	wt	wt	G148A, D183Y	wt	A219T
12-3148	4	2	1	8	32	4	0,125	0,5	G27D, T105A, Q155R, V205L, V356I, G391A	E114A, G283E, M288R	wt	wt	wt
13-4215	8	1	4	8	8	1	0,5	0,5	G27D, A55T, T105A,	E114A, G283E, M288R	wt	wt	wt

Aislado	CMI (µg/ml)								AmpC	AmpR	AmpD	AmpDh2	AmpDh3
	AZT	FEP	CAZ	PIP	TZP	IMP	MER	DOR					
									Q155R, V205L, G391A				
13-5570	8	8	4	4	8	2	0,5	0,25	T105A	wt	wt	wt	A219T
12-7117	16	16	4	16	8	1	1	1	wt	wt	G148A, D183Y	wt	A219T
13-1058	64	16	32	4	2	2	0,5	0,5	G27D, A55T, T105A, Q155R, V205L, G391A	E114A, G283E, M288R	wt	Δ1M	wt
12-2600	16	8	4	8	8	2	0,25	0,25	T21A, T105A, V205L, G391P	E114A, I251V, G283E, M288R	G148A	wt	D75G
12-5422	32	8	8	16	16	2	32	0,25	T21A, T105A, V205L, G391P	E114A, I251V, G283E, M288R	G148A	wt	D75G
13-6203	32	64	>128	>256	>256	8	16	8	G27D, T105A, V205L, V356I, G391A	wt	-	wt	wt
14-0116	8	32	32	128	128	8	8	4	T105A	Δ _{nt 860-891}	G148A, T150A	wt	A219T
12-6599	32	64	64	128	128	32	32	32	wt	G154R	G148A, D183Y	wt	A219T
14-0035	64	64	128	>256	>256	16	32	8	P7S, G27D, T105A, V205L, V356I, G391A	E114A, I251V, G283E, M288R	wt	V89D	wt
12-5970	16	4	4	8	8	16	8	32	T105A	wt	G148A, D183Y	wt	A37T, A219T
13-3150	32	4	8	16	16	1	2	0,25	T105A, L176R	wt	A136V, G148A	wt	A219T
13-5832	32	128	16	64	128	32	64	32	wt	wt	T139M, G148A, D183Y	wt	A219T
13-5857	64	128	64	128	128	16	64	32	wt	wt	T139M, G148A, D183Y	wt	A219T
14-0867	128	128	128	>256	>256	64	64	>64	wt	wt	T139M, G148A, D183Y	wt	A219T

*AZT: Aztreonam, FEP: Cefepime, CAZ: Ceftazidima, PIP: Piperacilina, TZP: Piperacilina-Tazobactam, IMP: Imipenem, MER: Meropenem, DOR: Doripenem, Δ: Delección, Ins: Inserción,

STOP: Codón de parada prematuro, -: Gen ausente

**wt: secuencia igual a la de la cepa control *P. aeruginosa* PAO1

*** En letras minúsculas se representan las mutaciones en nucleótidos y en mayúsculas en aminoácidos

Tabla 15. Mutaciones en PBP

PBP	Tipo de mutación	Nº de aislados	Modificaciones (nº de aislados)
PBP1a	wt	1/79	-
	Cambios en aminoácidos	46/79	E ₂₄₅ D (15), I ₄₁₈ T (15), N ₆₂₂ K (15), P ₃₈₈ S (2), A ₂₅ T (2), R ₁₅₂ Q (1), D ₃₂₉ G (1), I ₄₁₈ V (19), A ₂₀₅ V (1), H ₆₂₈ N (3), A ₃₆₈ T (1), S ₆₃₂ I (1), Q ₆₄₂ L (1), D ₇₃ N (1), E ₁₆₁ Q (1)
	Inserción de aminoácidos	77/79	Ins ₆₁₆₋₆₁₆ P (77)
	Delección de aminoácidos	0	-
	Alteración del marco de lectura	0	-
	Codón de parada prematuro	0	-
	Gen ausente	0	-
PBP1b	wt	19/79	-
	Cambios en aminoácidos	60/79	S ₂₅ G (39), L ₃₅₃ Q (51), K ₆₀₇ R (9), S ₆₄₃ G (1), Q ₂₇₅ H (2), N ₅₄₄ S (1), V ₂₀₉ A (2), Q ₁₂₇ R (1), T ₅₁₈ A (1), P ₁₆ L (3), G ₆₅₃ S (1), M ₇₁₅ K (2)
	Inserción de aminoácidos	0	-
	Delección de aminoácidos	0	-
	Alteración del marco de lectura	0	-
	Codón de parada prematuro	0	-
	Gen ausente	0	-
PBP2	wt	74/79	-
	Cambios en aminoácidos	5/79	P ₄₈₈ S (1), N ₁₈₄ S (4)
	Inserción de aminoácidos	0	-
	Delección de aminoácidos	0	-
	Alteración del marco de lectura	0	-
	Codón de parada prematuro	0	-
	Gen ausente	0	-
PBP3	wt	54/79	-
	Cambios en aminoácidos	25/79	G ₃₇₆ R (1), E ₈₈ D (2), G ₁₄₄ S (1), N ₄₂₇ D (2), T ₃₇₉ M (1), P ₄₇₇ L (1), G ₆₃ D (1), R ₅₀₄ C (11), T ₉₁ A (3), V ₄₄₂ A (1), A ₁₃₉ S (3)
	Inserción de aminoácidos	0	-
	Delección de aminoácidos	0	-
	Alteración del marco de lectura	0	-
	Codón de parada prematuro	0	-
	Gen ausente	0	-
PBP3a	wt	8/79	-

PBP	Tipo de mutación	Nº de aislados	Modificaciones (nº de aislados)
	Cambios en aminoácidos	61/79	A ₁₀₄ P (55), I ₄₄₇ V (5), V ₇₀ A (1), P ₅₄ S (1), A ₂₀ S (7), G ₃₁₆ D (1), E ₃₇ K (12), I ₅₄₇ T (2), L ₅₅₂ V (1), R ₈₂ K (3), A ₈₆ D (4), Q ₅₆₂ E (3)
	Inserción de aminoácidos	0	-
	Delección de aminoácidos	0	-
	Alteración del marco de lectura	0	-
	Codón de parada prematuro	0	-
	Gen ausente	10/79	-
	wt	53/79	-
PBP4	Cambios en aminoácidos	26/79	A ₃₉₄ P (7), Q ₁₅₆ H (15), T ₂₀ A (1), V ₆₆ A (2), T ₄₀₈ A (1), G ₄₄₄ D (1)
	Inserción de aminoácidos	0	-
	Delección de aminoácidos	0	-
	Alteración del marco de lectura	0	-
	Codón de parada prematuro	0	-
	Gen ausente	0	-
	wt	73/79	-
PBP5	Cambios en aminoácidos	6/79	T ₂₈₆ A (1), E ₃₂₈ G (4), V ₂₉ I (1)
	Inserción de aminoácidos	0	-
	Delección de aminoácidos	0	-
	Alteración del marco de lectura	0	-
	Codón de parada prematuro	0	-
	Gen ausente	0	-
	wt	43/79	-
PBP6/7	Cambios en aminoácidos	35/79	S ₂₅₀ N (32), T ₂₀₀ I (1), T ₂₄₅ A(1), A ₂₈₇ S (1)
	Inserción de aminoácidos	0	-
	Delección de aminoácidos	0	-
	Alteración del marco de lectura	0	-
	Codón de parada prematuro	0	-
	Gen ausente	1/79	-

*wt: Secuencia sin cambios en comparación con la de la cepa control *P. aeruginosa* PAO1, Ins: Inserción

4.3.1.1. Análisis de la porina OprD

La resistencia a carbapenémicos, especialmente a imipenem, está relacionada con alteraciones en la porina OprD. Estas alteraciones se clasificaron en los 3 grupos descritos en la Tabla 16. El grupo G1 engloba aquellas mutaciones puntuales que se traducen en cambios aminoacídicos e inserciones y/o deleciones de aminoácidos. Los grupos G2 Y G3 engloban aquellas cepas cuya porina no es funcional debido a codones de parada prematuros o a alteraciones en el marco de lectura provocadas por la inserción y/o deleción de nucleótidos. Cincuenta y siete aislados pertenecían al grupo G1, 18 al grupo G2 y 3 al grupo G3. Dentro de G1, el subgrupo G1A a fue el mayoritario, englobando 29 aislados. Cabe destacar que 8 aislados pertenecientes a este subgrupo contenían además deleciones de un aminoácido en su secuencia. En segundo lugar, se encontró el subgrupo G1I, presente en 10 aislados. Finalmente, en un aislado no se encontraron mutaciones en *oprD*.

Tabla 16. Clasificación de las mutaciones encontradas en OprD.

Grupo	Nº de aislados	Alteraciones	Loops afectados	
wt	1/79	-	-	
G1	G1A*	29/79	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, Δ372-373MS, NNVGYKNYG ₃₇₅ SSSSYAGL-	L1, L4, L5, L6, L7, L8
	G1B	1/79	D43N, S57E, S59R, V127L, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, Δ372-373MS, NNVGYKNYG ₃₇₅ SSSSYAGL-	L1, L4, L5, L6, L7, L8
	G1C	3/79	S57E, S59R, V127L, E185Q, P186G, V189T, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, T276A, A281G, K296Q, Q301E, R310E, A315G, L347M, Δ372-373MS, NNVGYKNYG ₃₇₅ SSSSYAGL-, S403A, Q424E	L1, L4, L5, L6, L7, L8, L9
	G1D	7/79	T103S, K115T, F170L	L2
	G1E	1/79	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, Δ212G, R310E, A315G, G425A	L2, L4, L6, L9
	G1F	1/79	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, L252P, R310E, A315G, G425A	L2, L4, L7, L9
	G1G	3/79	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, Δ321F, G335S, G425A	L2, L4, L7, L9
	G1H	1/79	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, A315G, G316D, G425A	L2, L4, L7, L9

Grupo	Nº de aislados	Alteraciones	Loops afectados
G1I	10/79	T ₁₀₃ S, K ₁₁₅ T, F ₁₇₀ L, E ₁₈₅ Q, P ₁₈₆ G, V ₁₈₉ T, R ₃₁₀ E, A ₃₁₅ G, G ₄₂₅ A	L2, L4, L7, L9
G1J	1/79	T ₁₀₃ S, K ₁₁₅ T, F ₁₇₀ L, E ₁₈₅ Q, P ₁₈₆ G, V ₁₈₉ T, R ₃₁₀ E, A ₃₁₅ G, Ins ₄₀₁₋₄₀₂ H, C ₄₁₉ R	L2, L4, L7
G2	18/79	Stop	-
G3	3/79	Ins ₁₂₀₅₋₁₂₀₆ C	-

*Dentro del grupo G1A hubo 8 aislados con deleciones de aminoácidos adicionales a las alteraciones ya mencionadas: Δ_{146} P (1 aislado), Δ_{412} R (1 aislado), Δ_{67} Q (5 aislados), Δ_{18} T (1 aislado).

** Δ : Deleción, Ins: Inserción

***wt: Secuencia sin cambios en comparación con la de la cepa control *P. aeruginosa* PAO1

4.3.2. Genes de resistencia a aminoglucósidos

De los 79 aislados secuenciados, 34 fueron resistentes a aminoglucósidos. En Tabla 17 se recogen las mutaciones encontradas en los genes que codifican las oxidorreductasas DsbM y NuoG, la fosforilasa GalU, los factores de elongación FusA1 y FusA2 y las proteínas ribosomales RplB y RplY. Se observaron cambios aminoacídicos en DsbM en 30 aislados, siendo predominantes las sustituciones C₂₈R y G₃₂C. Así mismo, en los 34 aislados se detectaron mutaciones puntuales en NuoG, siendo la sustitución T₄₈₄A común en 33 de ellos. Uno de estos 33 aislados presentó además la inserción de un aminoácido en su secuencia, y otro obtuvo una proteína truncada por la presencia de un codón de parada prematuro. Se encontraron cambios aminoacídicos en FusA1 y FusA2 en 10 y 34 aislados, respectivamente; además uno de los aislados presentó alteraciones en el codón de inicio de *fusA2*. En cuanto a las proteínas ribosomales RplB y RplY, se detectaron cambios en aminoácidos en 2 y 9 aislados, respectivamente. No se encontraron mutaciones en *galU*.

Tabla 17. Mutaciones en los genes de resistencia a aminoglucósidos

Aislado	CMI (μ g/ml)			DsbM	GalU	FusA1	FusA2	NuoG	RplB	RplY
	GEN	TOB	AK							
14-2158	16	4	64	wt	wt	wt	G ₆₉₅ A	T ₄₈₄ A	wt	wt
14-2184	>64	>64	>128	wt	wt	Y ₅₅₂ C, Q ₆₇₈ R	G ₆₉₅ A	T ₄₈₄ A	wt	wt
15-0495	32	16	64	wt	wt	P ₄₂₂ S, T ₄₅₆ A	S ₁₇₆ A, L ₆₆₁ M, G ₆₉₅ A	T ₄₈₄ A	wt	A ₁₂₃ S
12-1127	8	1	32	C ₂₈ R,	wt	wt	Q ₁₆₁ L,	S ₄₆₈ A, T ₄₈₄ A,	wt	A ₁₂₃ S

Aislado	CMI (µg/ml)			DsbM	GalU	FusA1	FusA2	NuoG	RplB	RplY
	GEN	TOB	AK							
				V ₂₂₀ L			S ₁₇₆ A, A ₁₉₇ D, G ₆₉₅ A	A ₄₈₉ V, K ₅₈₅ R, R ₆₃₉ K		
12-1346	8	2	32	C ₂₈ R, V ₂₂₀ L	wt	wt	Q ₁₆₁ L, S ₁₇₆ A, A ₁₉₇ D, G ₆₉₅ A	S ₄₆₈ A, T ₄₈₄ A, A ₄₈₉ V, K ₅₈₅ R, R ₆₃₉ K	wt	A ₁₂₃ S
12-1802	64	8	>128	C ₂₈ R, V ₂₂₀ L	wt	wt	Q ₁₆₁ L, S ₁₇₆ A, A ₁₉₇ D, G ₆₉₅ A	STOP	G ₁₃₈ D	A ₁₂₃ S
12-6304	64	16	128	C ₂₈ R, V ₂₂₀ L	wt	A ₂₁ T	Q ₁₆₁ L, S ₁₇₆ A, A ₁₉₇ D, G ₆₉₅ A	S ₄₆₈ A, T ₄₈₄ A, A ₄₈₉ V, K ₅₈₅ R, R ₆₃₉ K	wt	A ₁₂₃ S
13-1575	32	32	64	C ₂₈ R, V ₂₂₀ L	wt	V ₆₂₂ L	Q ₁₆₁ L, S ₁₇₆ A, A ₁₉₇ D, G ₆₉₅ A	S ₄₆₈ A, T ₄₈₄ A, A ₄₈₉ V, K ₅₈₅ R, Q ₅₉₄ R, R ₆₃₉ K	T ₉ A	A ₁₂₃ S
12-1767	16	0,5	16	C ₂₈ R, S ₁₅₄ A, F ₂₀₆ L, G ₂₁₈ D	wt	wt	G ₆₉₅ A	P ₄₇₄ L, T ₄₈₄ A	wt	wt
10-5351	8	8	0.5	G ₃₂ C	wt	wt	S ₁₇₆ A, G ₆₉₅ A	A ₄₃₃ T, T ₄₈₄ A	wt	wt
12-0560	64	16	0,5	G ₃₂ C	wt	wt	S ₁₇₆ A, G ₆₉₅ A	A ₄₃₃ T, T ₄₈₄ A	wt	wt
12-5803	>64	64	4	G ₃₂ C	wt	wt	S ₁₇₆ A, G ₆₉₅ A	A ₄₃₃ T, T ₄₈₄ A	wt	wt
08-0034	>64	64	16	C ₂₈ R, F ₂₀₆ L, Q ₂₁₀ R, G ₂₁₈ D	wt	wt	S ₁₇₆ A, Q ₆₀₁ H, G ₆₉₅ A	T ₄₈₄ A	wt	wt
13-2025	>64	16	>128	C ₂₈ R	wt	T ₆₇₁ A	Q ₆₀₁ H, G ₆₉₅ A	A ₄₃₃ T, T ₄₈₄ A	wt	wt
14-2595	16	8	128	C ₂₈ R	wt	T ₆₇₁ A	Q ₆₀₁ H, M ₆₃₀ T, G ₆₉₅ A	A ₄₃₃ T, T ₄₈₄ A	wt	wt
15-7136	32	4	64	C ₂₈ R	wt	A ₂₁ T	H ₄₆₆ P, Q ₆₀₁ H,	Δ ₇₀ P, A ₄₃₃ T, T ₄₈₄ A	wt	wt

Aislado	CMI (µg/ml)			DsbM	GalU	FusA1	FusA2	NuoG	RplB	RplY
	GEN	TOB	AK							
							M ₆₃₀ T, G ₆₉₅ A			
15-7350	>64	8	128	C ₂₈ R	wt	T ₆₇₁ A	M ₆₃₀ T, G ₆₉₅ A	A ₄₃₃ T, T ₄₈₄ A	wt	wt
13-2507	8	2	32	C ₂₈ R, F ₂₀₆ L, R ₂₁₂ C, G ₂₁₈ D	wt	Y ₅₅₂ C	Δ _{Nnt1}	A ₄₃₃ T, T ₄₈₄ A	wt	A ₁₂₃ S, G ₂₀₁ S
13-5524	>64	64	4	G ₃₂ C	wt	wt	S ₁₇₆ A, G ₆₉₅ A	A ₄₃₃ T, T ₄₈₄ A	wt	wt
14-3192	>64	>64	4	G ₃₂ C	wt	wt	S ₁₇₆ A, G ₆₉₅ A	A ₄₃₃ T	wt	wt
12-6494	8	4	16	wt	wt	wt	S ₁₇₆ A, G ₆₉₅ A	T ₄₈₄ A	wt	wt
13-0865	>64	>64	>128	C ₂₈ R	wt	wt	S ₁₇₆ A, Q ₆₀₁ H, G ₆₉₅ A	T ₄₈₄ A	wt	wt
15-7690	32	4	32	C ₂₈ R, G ₅₂ S, F ₂₀₆ L, R ₂₁₂ C	wt	wt	S ₁₇₆ A, A ₁₉₇ D, G ₆₉₅ A	T ₄₈₄ A, K ₅₈₅ R, R ₆₃₉ K	wt	A ₁₂₃ S
13-1070	>64	64	16	G ₃₂ C	wt	wt	S ₁₇₆ A, G ₆₉₅ A	A ₄₃₃ T, T ₄₈₄ A	wt	wt
13-1456	>64	>64	32	G ₃₂ C	wt	A ₅₅₅ E	S ₁₇₆ A, G ₆₉₅ A	A ₄₃₃ T, T ₄₈₄ A	wt	wt
13-1791	>64	>64	16	G ₃₂ C	wt	wt	S ₁₇₆ A, G ₆₉₅ A	A ₄₃₃ T, T ₄₈₄ A	wt	wt
14-3875	>64	64	8	G ₃₂ C	wt	wt	S ₁₇₆ A, G ₆₉₅ A	A ₄₃₃ T, T ₄₈₄ A	wt	wt
12-7117	>64	64	8	G ₃₂ C	wt	wt	S ₁₇₆ A, G ₆₉₅ A	T ₄₈₄ A	wt	wt
13-6203	64	32	4	C ₂₈ R, F ₂₀₆ L, G ₂₁₈ D	wt	wt	S ₁₇₆ A, Q ₆₀₁ H, G ₆₉₅ A	T ₄₈₄ A, K ₅₈₅ R	wt	A ₁₂₃ S
14-0116	>64	>64	32	C ₂₈ R, F ₂₀₆ L, Q ₂₁₀ R, G ₂₁₈ D	wt	wt	S ₁₇₆ A, Q ₆₀₁ H, G ₆₉₅ A	T ₄₈₄ A	wt	wt

Aislado	CMI (µg/ml)			DsbM	GalU	FusA1	FusA2	NuoG	RplB	RplY
	GEN	TOB	AK							
12-6599	>64	>64	16	G ₃₂ C	wt	wt	S ₁₇₆ A, G ₆₉₅ A	A ₄₃₃ T, T ₄₈₄ A	wt	wt
13-5832	>64	>64	8	G ₃₂ C	wt	wt	S ₁₇₆ A, G ₆₉₅ A	A ₄₃₃ T, T ₄₈₄ A	wt	wt
13-5857	>64	>64	8	G ₃₂ C	wt	wt	S ₁₇₆ A, G ₆₉₅ A	A ₄₃₃ T, T ₄₈₄ A	wt	wt
14-0867	>64	>64	16	G ₃₂ C	wt	wt	S ₁₇₆ A, G ₆₉₅ A	A ₄₃₃ T, T ₄₈₄ A	wt	wt

*GEN: Gentamicina, TOB: Tobramicina, AK: Amikacina, Δ: Delección

**wt: secuencia igual a la de la cepa control *P. aeruginosa* PAO1

En cuanto a la presencia de AME, destaca la presencia de la fosfotransferasa APH(3')-Ib en los 34 aislados. También se encontraron APH(3'')-Ib y APH(6)-Id en uno. Se detectaron las nucleotidiltransferasas ANT(2'')-Ia, ANT(3'')-Ia y ANT(3'')-Ih en 14, 7 y 2 aislados, respectivamente. Finalmente, las acetiltransferasas AAC(3)-Ib y AAC(6')-Ib se detectaron en 5 aislados, junto con la AAC(6')-IId, que se detectó en 2.

4.3.3. Genes de resistencia a fluoroquinolonas: Mutaciones en las QRDR y disminución de sensibilidad a ciprofloxacino

Los 79 aislados secuenciados fueron resistentes a fluoroquinolonas. Se estudiaron las mutaciones en los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*, y sus respectivas proteínas resultantes con respecto a la cepa control *P. aeruginosa* PAO1. Las mutaciones encontradas se describen en la Tabla 18. Setenta aislados presentaron cambios aminoacídicos en GyrA, en 20 se encontró la delección de 2 aminoácidos (SE) y en 1 se encontró un codón de parada prematuro, provocado por la sustitución de un nucleótido en *gyrA*. De igual manera, las mutaciones puntuales en 18, 36 y 31 cepas en *gyrB*, *parC* y *parE*, respectivamente, llevaron a cambios aminoacídicos en las proteínas que codifican.

Cabe destacar que se detectó el gen *crpP*, descrito recientemente como un mecanismo plasmídico de resistencia a ciprofloxacino (73), en el cromosoma de 54 aislados (Tabla 18). La secuencia de 8 aislados fue idéntica a la de la cepa control *P. aeruginosa* PA14. En 11 aislados se encontraron sustituciones aminoacídicas como A₄T, S₅P, E₆D, R₂₀K, D₂₃H, F₃₂Y, I₄₂L en CrpP y en 35 aislados el codón de inicio se encontró 17 aminoácidos por delante del de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PA14.

Tabla 18. Mutaciones en los genes de resistencia a fluoroquinolonas

Aislado	CMI (µg/ml)		QRDR				CrpP
	LEV	CIP	ParC	ParE	GyrA	GyrB	
14-2158	8	16	wt	wt	D ₈₇ N, K ₄₀₉ R	H ₁₄₈ N	-
14-2184	32	32	wt	wt	D ₈₇ N	H ₁₄₈ N	-
14-0294	1	0,25	V ₆₄₆ L	wt	P ₅₅₅ S	P ₇₄₉ S	-
14-0421	4	4	V ₆₄₆ L	wt	P ₅₅₅ S	wt	-
14-0652	8	8	V ₆₄₆ L	wt	P ₅₅₅ S	wt	-
14-3223	2	1	V ₆₄₆ L	wt	P ₅₅₅ S	wt	-
14-3362	1	0,5	V ₆₄₆ L	wt	P ₅₅₅ S	wt	-
15-0495	2	2	A ₆₈₈ V	wt	T ₈₃ I, P ₈₈₆ S, Δ ₉₁₂₋₉₁₃ SE	S ₄₆₆ T	wt
08-6073	2	0,5	wt	D ₅₃₃ E	wt	wt	wt
11-1196	8	2	wt	D ₅₃₃ E	D ₈₇ N	wt	-
12-1127	2	1	wt	D ₅₃₃ E	D ₈₇ N	wt	wt
12-1159	8	4	wt	D ₅₃₃ E	D ₈₇ N	wt	wt
12-1251	16	32	wt	D ₂₇ G, C ₄₀₉ Y, D ₅₃₃ E	T ₈₃ I, Δ ₉₁₂₋₉₁₃ SE	wt	wt
12-1345	8	2	E ₉₁ K	D ₅₃₃ E	D ₈₇ N	wt	-
12-1346	2	4	wt	D ₅₃₃ E	D ₈₇ N	wt	wt
12-1802	8	2	wt	D ₅₃₃ E	D ₈₇ N	wt	wt
14-1716	1	1	P ₆₈₃ S	wt	wt	wt	M17+
12-6304	16	4	wt	D ₅₃₃ E	T ₈₃ I, P ₂₆₆ L, Δ ₉₁₂₋₉₁₃ SE	wt	M17+
13-1575	4	8	wt	D ₅₃₃ E	T ₈₃ I, P ₂₆₆ L, Δ ₉₁₂₋₉₁₃ SE	wt	M17+
07-2043	4	2	wt	wt	A ₅₁ V	R ₅₂₆ C	-
11-4059	4	1	wt	wt	A ₅₁ V	R ₅₂₆ C	-
12-1371	4	4	wt	wt	A ₅₁ V	R ₂₀₇ C, R ₅₂₆ C	-
12-1767	8	4	wt	wt	A ₅₁ V	R ₅₂₆ C	-
10-5351	4	4	wt	wt	wt	E ₄₆₈ G	M17+
12-0560	4	4	S ₈₇ W, L ₁₆₈ Q	wt	T ₈₃ I, D ₈₇ N	wt	M17+
12-5803	>32	>32	S ₈₇ W, L ₁₆₈ Q	wt	T ₈₃ I, D ₈₇ N	wt	M17+
08-0034	>32	>32	S ₈₇ W, L ₁₆₈ Q	wt	T ₈₃ I, D ₈₇ N	wt	M17+
13-2025	0,5	0,25	S ₈₇ L	wt	STOP	wt	E ₆ D, R ₂₀ K
14-2595	0,5	0,25	wt	wt	A ₇₈₇ V	wt	-

Aislado	CMI (µg/ml)		QRDR				CrpP
	LEV	CIP	ParC	ParE	GyrA	GyrB	
15-7136	4	2	wt	wt	T ₈₃ A	wt	-
15-7350	4	1	wt	T ₃₉₁ I	wt	P ₇₄₉ S	-
12-0805	32	8	V ₄₁₉ L, V ₆₄₆ L	S ₄₅₇ R	G ₇₅ A	E ₄₆₈ D, T ₄₉₉ A	M17+
13-2507	2	0,5	V ₄₁₉ L, V ₆₄₆ L	S ₄₅₇ R	G ₇₅ A	E ₄₆₈ D	M17+
13-5486	1	0,5	V ₄₁₉ L, V ₆₄₆ L	S ₄₅₇ R	G ₇₅ A	E ₄₆₈ D, Q ₅₃₃ R	M17+
13-5524	>32	>32	S ₈₇ W, L ₁₆₈ Q	wt	T ₈₃ I, D ₈₇ N	wt	M17+
13-3298	4	0,5	wt	wt	Ins ₁₃₅₋₁₃₆ L	wt	A ₄ T, E ₆ D, R ₂₀ K, D ₂₃ H, F ₃₂ Y, I ₄₂ L
13-3423	4	1	wt	wt	R ₆₁₄ C	wt	A ₄ T, E ₆ D, R ₂₀ K, D ₂₃ H, F ₃₂ Y, I ₄₂ L
13-3753	8	4	wt	wt	A ₅₁ V, D ₈₇ N, F ₇₉₇ L	wt	A ₄ T, E ₆ D, R ₂₀ K, D ₂₃ H, F ₃₂ Y, I ₄₂ L
13-5627	2	1	wt	wt	F ₇₉₇ L	wt	A ₄ T, E ₆ D, R ₂₀ K, D ₂₃ H, F ₃₂ Y, I ₄₂ L
12-6547	4	2	wt	wt	T ₈₃ A	wt	M17+
12-6353	0,25	≤0,03	V ₆₄₆ L	wt	Δ ₉₁₂₋₉₁₃ SE	wt	M17+
13-0950	4	0,5	wt	D ₅₃₃ E	G ₈₁ C, Δ ₉₁₂₋₉₁₃ SE	wt	-
13-2772	0,06	0,03	wt	D ₅₃₃ E	G ₈₁ C, Δ ₉₁₂₋₉₁₃ SE	wt	-
14-3192	>32	>32	S ₈₇ W, L ₁₆₈ Q	wt	T ₈₃ I, D ₈₇ N	wt	M17+
12-5984	0,25	≤0,03	wt	D ₅₃₃ E	Δ ₉₁₂₋₉₁₃ SE	wt	A ₄ T, E ₆ D, R ₂₀ K, D ₂₃ H, F ₃₂ Y, I ₄₂ L
14-0919	0,5	0,06	wt	wt	wt	wt	M17+
12-6494	16	4	V ₆₄₆ L	G ₂₈₅ S	D ₈₇ N	S ₆₁₈ L	M17+
12-5709	0,5	0,125	A ₅₈₇ T	D ₅₃₃ E	Δ ₉₁₂₋₉₁₃ SE	wt	M17+
13-0865	8	2	V ₆₄₆ L	wt	Δ ₉₁₂₋₉₁₃ SE	wt	M17+
14-2563	2	1	wt	wt	T ₈₃ A	T ₄₇₁ M	E ₆ D, R ₂₀ K
15-4983	2	0,5	wt	wt	T ₈₃ A	wt	M17+
15-6548	4	1	H ₂₆₂ Q	wt	D ₈₇ Y	wt	M17+
15-7690	8	4	A ₅₈₇ T	D ₅₃₃ E	Δ ₉₁₂₋₉₁₃ SE	wt	M17+
15-0788	1	1	R ₄₉₄ C, V ₆₄₆ L	wt	T ₈₃ A	S ₄₆₆ F	-
12-2603	1	0,5	wt	wt	wt	wt	-
12-3870	0,5	0,25	wt	wt	wt	wt	-
13-2077	0,06	0,06	wt	D ₅₃₃ E	T ₈₃ A, Δ ₉₁₂₋₉₁₃ SE	wt	-
13-3189	0,13	0,13	wt	D ₅₃₃ E	T ₈₃ A, Δ ₉₁₂₋₉₁₃ SE	wt	-
13-4111	0,5	0,25	wt	D ₅₃₃ E	T ₈₃ A, Δ ₉₁₂₋₉₁₃ SE	wt	-

Aislado	CMI (µg/ml)		QRDR				CrpP
	LEV	CIP	ParC	ParE	GyrA	GyrB	
13-1070	>32	>32	S ₈₇ W, L ₁₆₈ Q	wt	T ₈₃ I, D ₈₇ N	wt	M17+
13-1456	>32	>32	S ₈₇ W, L ₁₆₈ Q	wt	T ₈₃ I, D ₈₇ N	wt	M17+
13-1791	>32	>32	S ₈₇ W, L ₁₆₈ Q	wt	T ₈₃ I, D ₈₇ N	wt	M17+
14-3875	>32	>32	S ₈₇ W, L ₁₆₈ Q	wt	T ₈₃ I, D ₈₇ N	wt	M17+
12-3148	8	8	wt	A ₄₇₃ V, D ₅₃₃ E	wt	wt	S ₅ P
13-4215	0,5	0,5	wt	D ₅₃₃ E	Δ ₉₁₂₋₉₁₃ SE	wt	M17+
13-5570	0,25	0,06	H ₂₆₂ Q	wt	Δ ₉₁₂₋₉₁₃ SE	wt	wt
12-7117	>32	>32	S ₈₇ W, L ₁₆₈ Q	wt	T ₈₃ A, D ₈₇ N	wt	M17+
13-1058	4	1	wt	D ₅₃₃ E	Δ ₉₁₂₋₉₁₃ SE	T ₃₉₄ I, S ₄₆₆ Y	M17+
12-2600	16	16	wt	D ₅₃₃ E	T ₈₃ I	wt	M17+
12-5422	16	8	wt	D ₅₃₃ E	T ₈₃ I	wt	M17+
13-6203	>32	>32	S ₈₇ L, P ₇₅₂ T	P ₄₃₈ S, D ₅₃₃ E	T ₈₃ I	E ₄₆₈ D	-
14-0116	32	32	S ₈₇ L	wt	T ₈₃ I, V ₆₇₁ I, G ₈₆₀ S, D ₈₉₃ E, A ₉₀₀ G, S ₉₀₃ A, Δ ₉₁₂₋₉₁₃ SE	wt	E ₆ D, R ₂₀ K
12-6599	>32	>32	S ₈₇ W, L ₁₆₈ Q	wt	T ₈₃ I, D ₈₇ N	wt	M17+
14-0035	8	2	wt	D ₅₃₃ E	T ₈₃ I	wt	A ₄ T, E ₆ D, R ₂₀ K, D ₂₃ H, F ₃₂ Y, I ₄₂ L
12-5970	2	0,5	H ₂₆₂ Q	E ₂₁₅ Q	wt	wt	E ₆ D
13-3150	32	16	wt	D ₅₃₃ E, R ₆₁₀ S	T ₈₃ I, Δ ₉₁₂₋₉₁₃ SE	wt	M17+
13-5832	>32	>32	S ₈₇ W, L ₁₆₈ Q	wt	T ₈₃ I, D ₈₇ N	wt	M17+
13-5857	>32	>32	S ₈₇ W, L ₁₆₈ Q	wt	T ₈₃ I, D ₈₇ N	wt	M17+
14-0867	>32	>32	S ₈₇ W, L ₁₆₈ Q	wt	T ₈₃ I, D ₈₇ N	wt	M17+

*LEV: Levofloxacin, CIP: Ciprofloxacin, Δ: Delección, Ins: Inserción, -: Gen ausente

** M17+: El codón de inicio de la secuencia de CrpP en estos aislados estaba 17 aminoácidos más adelante que el de cepa de referencia *P. aeruginosa* PA14

***wt: secuencia igual a la de las cepas controles *P. aeruginosa* PAO1 (QRDR) y PA14 (CrpP)

4.3.4. Genes de resistencia a polimixinas

De los 79 aislados secuenciados, 20 fueron resistentes a colistina. Se estudiaron las mutaciones en varios sistemas de dos componentes relacionados con la resistencia a polimixinas, descritos en la Tabla 19. En el sistema PhoPQ se detectaron cambios en aminoácidos en 2 aislados en PhoQ, sin embargo, en PhoP no se encontraron mutaciones. En cuanto al sistema PmrAB, se encontraron sustituciones de aminoácidos en 10 aislados, siendo L₇₁R el cambio más frecuente; así mismo, todos los aislados presentaron cambios en aminoácidos en PmrB, siendo Y₃₄₅H común en todos. De igual manera, ParS presentó cambios en aminoácidos en los 20 aislados, siendo H₃₉₈R el mayoritario; y en 6 aislados se encontraron las sustituciones L₁₅₃R y S₁₇₀N en ParR. Finalmente, CprR y ColS estuvieron alterados en 1 aislado. No se encontraron mutaciones en ColR.

Tabla 19. Mutaciones en los genes de resistencia a polimixinas

Aislado	CMI (µg/ml)	PhoP	PhoQ	PmrA	PmrB	ParS	ParR	CprR	ColS	ColR
	COL									
14-2184	8	wt	wt	L ₇₁ R	Y ₃₄₅ H	A ₈₂ T, L ₁₄₁ P, H ₃₉₈ R	wt	wt	wt	wt
14-0294	8	wt	wt	wt	Y ₃₄₅ H	H ₃₉₈ R	wt	wt	wt	wt
08-6073	4	wt	wt	wt	S ₂ P, A ₄ T, V ₁₅ I, G ₆₈ S, Y ₃₄₅ H	H ₃₉₈ R	L ₁₅₃ R, S ₁₇₀ N	wt	wt	wt
08-0034	8	wt	wt	wt	Y ₃₄₅ H	H ₃₉₈ R	wt	wt	wt	wt
12-6547	8	wt	wt	L ₇₁ R	Y ₃₄₅ H	H ₃₉₈ R	L ₁₅₃ R, S ₁₇₀ N	wt	wt	wt
14-3192	8	wt	wt	wt	Y ₃₄₅ H	H ₃₉₈ R	wt	wt	wt	wt
12-5984	8	wt	wt	L ₇₁ R	S ₂ P, A ₄ T, V ₁₅ I, G ₆₈ S, Y ₃₄₅ H	H ₃₉₈ R	L ₁₅₃ R, S ₁₇₀ N	wt	wt	wt
14-0919	4	wt	wt	T ₃₁ I	Y ₃₄₅ H	H ₃₉₈ R	wt	wt	wt	wt
12-5709	4	wt	wt	L ₇₁ R	Y ₃₄₅ H	H ₃₉₈ R	L ₁₅₃ R, S ₁₇₀ N	wt	wt	wt
15-6548	4	wt	wt	L ₇₁ R	Y ₃₄₅ H	H ₃₉₈ R	wt	L ₂₁₃ M	wt	wt
15-7690	4	wt	wt	L ₇₁ R	Y ₃₄₅ H	H ₃₉₈ R	L ₁₅₃ R, S ₁₇₀ N	wt	wt	wt
12-2603	16	wt	S ₃₀₀ R	wt	Y ₃₄₅ H	D ₁₇₃ N, H ₃₉₈ R	wt	wt	wt	wt
13-1070	8	wt	wt	wt	S ₈₀ N, Y ₃₄₅ H	H ₃₉₈ R	wt	wt	wt	wt
13-1791	16	wt	wt	Δ _{inicio sec}	Q ₂₆₃ L, Y ₃₄₅ H	H ₃₉₈ R	wt	wt	wt	wt
12-3148	>32	wt	A ₃₉₁ V	wt	Y ₃₄₅ H	A ₂₉ V, H ₃₉₈ R	L ₁₅₃ R, S ₁₇₀ N	wt	A ₃₁₆ T	wt
13-5570	8	wt	wt	L ₇₁ R	Y ₃₄₅ H	H ₃₉₈ R	wt	wt	wt	wt
14-0116	>32	wt	wt	L ₇₁ R	S ₂ P, A ₄ T, V ₆ A, V ₁₅ I, G ₆₈ S, P ₂₅₄ S,	L ₁₃₇ P, H ₃₉₈ R	G ₆₅ D	wt	wt	wt

					Y ₃₄₅ H					
12-5970	16	wt	wt	L ₇₁ R	Y ₃₄₅ H	H ₃₉₈ R	wt	wt	wt	wt
13-5832	16	wt	wt	wt	L ₅₉ P, Y ₃₄₅ H	H ₃₉₈ R	wt	wt	wt	wt
14-0867	>32	wt	wt	wt	L ₅₉ P, Y ₃₄₅ H	H ₃₉₈ R	wt	wt	wt	wt

*COL: Colistina, Δ: Delección

**wt: secuencia igual a la de la cepa control *P. aeruginosa* PAO1

4.3.5. Genes de resistencia a fosfomicina

De los 79 aislados estudiados, 37 fueron resistentes a fosfomicina. Se estudiaron las mutaciones en el gen codificante del transportador GlpT, y se encontraron mutaciones en 10 de los aislados. Se encontraron las sustituciones aminoacídicas F₂₈₆L, A₁₇T, W₁₃₂R, T₃₃₆P, L₁₀₁M, G₇₇D, T₂₁₁P y P₄₄₄S en los aislados 14-2184, 14-1716, 13-1575, 13-1791, 12-3148, 14-0116, 12-6599 y 13-3150, respectivamente, la inserción de 4 aminoácidos (GVAV) entre las posiciones 202 y 203 en el aislado 12-7117 y la delección de 6 (YLIEDG) en las posiciones 54-59 en el 13-6203. Se encontró además la metaloenzima modificadora del antibiótico, FosA, en 29 aislados.

4.3.6. Alteraciones en los sistemas de expulsión

Tras comparar los genomas de las 79 cepas estudiadas con el de la cepa control *P. aeruginosa* PAO1 y analizar las alteraciones (mutaciones y/o polimorfismos) en los sistemas de expulsión y sus genes reguladores se detectaron diferentes tipos de mutaciones que conllevaban a cambios en el marco de lectura de los genes por la inserción y/o delección de nucleótidos, así como cambios de nucleótidos que conducían a la aparición de codones de parada prematuros. Estas mutaciones a nivel de secuencia nucleotídica conllevaban a cambios en la secuencia peptídica, como inserciones y/o delecciones de aminoácidos o la aparición de una proteína truncada no funcional.

Las alteraciones en las subunidades del sistema **MexAB-OprM** y en sus reguladores conllevan a un incremento en la resistencia a fluoroquinolonas, carbapenémicos y betalactámicos (170). En la Tabla 20 se detallan las mutaciones encontradas en los 79 aislados analizados. En lo referente a la subunidad MexA se encontraron sustituciones aminoacídicas en los aislados 14-2184, 15-0495, 14-1716, 10,5351, 14,2595, 15,7136, 15,7350, 15-0788, 12-2603 y 12-3870, además de la delección de un aminoácido de serina en los aislados 14-0294, 140421, 14-0652, 14-3223 y 14-3362, la alteración del marco de lectura de *mexA* por la inserción de un nucleótido en la secuencia en los aislados 15-6548, 13-2077, 13-3189 y 13-

4111 y en el aislado 13-1058 la secuencia de *mexA* estuvo truncada por la inserción de 5 bp (gccgc) entre las posiciones 94 y 95, provocando la aparición de un codón de parada prematuro en la posición 43. No se encontraron mutaciones en las 59 cepas restantes. La subunidad MexB estuvo alterada en 25 de los aislados. En 18 de ellos se detectaron sustituciones aminoacídicas; en 10 se encontraron deleciones de aminoácidos y en 2 se encontraron codones de parada prematuros. El análisis de la secuencia del gen que codifica la porina OprM detectó la presencia de codones de parada prematuros en 3 aislados y en otros 4 se observaron polimorfismos en la secuencia de aminoácidos. El resto de los aislados presentaron un genotipo silvestre de OprM, igual al de la cepa PAO1.

Así mismo, se detectaron cambios aminoacídicos en NalC en 76 aislados, siendo G₇₁E y S₂₀₉R comunes en todos. Tras analizar la proteína NalD se detectaron mutaciones en los aislados 12-1802 ($\Delta_{183-186}$ LFDP) y 07-2043, 11-4059, 12-1371 y 12-1767 (T₁₅₈P). Finalmente, las alteraciones en el represor MexR se observaron en 29 cepas, siendo estas, sustituciones de aminoácidos en 25 de ellas y la presencia de un codón de parada prematuro en las 4 restantes. El gen *mexR* estuvo ausente en los aislados 14-0294, 14-0421, 14-0652, 14-3223 y 14-3362.

La alteración de las subunidades del sistema **MexCD-OprJ**, o la sobreexpresión del mismo por mutaciones en el gen represor *nfxB* (Tabla 20) conlleva a un aumento de la resistencia a fluoroquinolonas. En la subunidad MexC de 63 aislados se encontraron cambios aminoacídicos como S₃₃₀A. En 76 aislados se detectaron variaciones aminoacídicas en la subunidad MexD, siendo E₂₅₇Q la más frecuente; en 2 se encontró la deleción del codón de inicio y en 1 aislado se encontró un codón de parada prematuro. Se encontraron variaciones en la porina OprJ en 74 aislados. En 72 se detectaron sustituciones aminoacídicas como M₆₉V y D₆₈G, y en los aislados 11-1196 y 12-1802 se encontraron codones de parada prematuros.

En lo referente al regulador NfxB, se detectaron 26 aislados con cambios aminoacídicos y en los aislados 12-1196 y 12-1802 se encontró la inserción de un aminoácido de prolina entre las posiciones 105 y 106. Cabe destacar que en los aislados 13-0950 y 13-2772 los genes *nfxB*, *mexC* y *oprJ* estuvieron ausentes.

Las alteraciones en las subunidades del sistema **MexEF-OprN** y la sobreexpresión del mismo por mutaciones en los genes que codifican los reguladores MexT, MexS y MvaT (Tabla 20) incrementan la resistencia a fluoroquinolonas y carbapenémicos (171). En 72 aislados se encontró la deleción de una secuencia de 8 bp (ccagccgg); la secuencia de 8 aislados se vio

truncada por deleciones y sustituciones nucleotídicas que provocaron la aparición de codones de parada prematuros, y en los aislados 14-0919 y 12-7117 la inserción y deleción de un nucleótido, respectivamente, alteró el marco de lectura de *mexT*. En los 79 aislados analizados se encontraron cambios aminoacídicos en MexS, siendo D₂₄₉N común a todos. En los aislados 12-1767 y 07-2043 se encontró la sustitución A₉T en MvaT, y en los 77 restantes no se encontró ninguna mutación. En la subunidad MexE de 19 aislados se detectaron cambios aminoacídicos, en los aislados 12-2600 y 12-5422 la secuencia resultó truncada por la deleción de 4 bp (gggc) que provocó la aparición de codones de parada prematuros. En 13 aislados se observaron sustituciones de aminoácidos en la subunidad MexF y en el aislado 12-5803 *mexE* y *mexF* estuvieron ausentes. Finalmente, en la porina OprN se encontraron cambios aminoacídicos en 28 aislados, siendo S₁₃P común a 27 de ellos.

Las alteraciones mutacionales en los genes que conforman el sistema **MexXY-OprM** y sus reguladores incrementan la resistencia a aminoglucósidos, carbapenémicos y betalactámicos (54). En la Tabla 20 se recogen las mutaciones encontradas en las subunidades de este sistema y sus reguladores. El análisis mutacional reveló cambios aminoacídicos en la subunidad MexX en 77 aislados, siendo la sustitución K₃₂₉Q la más frecuente; además el marco de lectura de *mexX* estuvo alterado por la deleción de un nucleótido en 13-5486. En 73 aislados se detectaron cambios aminoacídicos en MexY, siendo T₅₄₃A el más común y en los aislados 13-1058, 12-2600 y 12-5422, la secuencia se vio truncada por cambios y deleciones de nucleótidos, que provocaron la aparición de codones de parada prematuros. El análisis mutacional de la porina OprM reveló codones de parada prematuros en los aislados 12-0560, 12-5803 y 08-0034, además de sustituciones aminoacídicas en 12-1251, 12-1371, 13-5627 y 14-0035.

En los 79 aislados se encontraron sustituciones de aminoácidos en Fmt, siendo I₁₈₁V la más frecuente, encontrada en 65 aislados. Finalmente, en el gen represor *mexZ* se detectaron varias alteraciones. En 44 aislados se encontraron cambios aminoacídicos, siendo G₁₉₅E el más común; en 8 se detectaron inserciones y deleciones de aminoácidos y en 7 aislados la secuencia de MexZ estuvo truncada por sustituciones nucleotídicas e inserciones de secuencias de nucleótidos que provocaron la aparición de codones de parada prematuros. la deleción de nucleótidos en 6 aislados alteró el marco de lectura de *mexZ* y en el aislado 14-2184 este gen estuvo ausente.

Tabla 20. Mutaciones encontradas en los sistemas de expulsión y sus reguladores

Bomba /Gen	Tipo de modificación	Nº de aislados	Mutaciones y/o polimorfismos (nº de aislados)	
MexAB-OprM	mexA	wt	59/79	-
		Cambios en aminoácidos	10/79	L337Q (1), S130Q (1), I63V (1), A128T (4), P96L (1), V48E (2)
		Delección de aminoácidos	5/79	$\Delta_{27}S$ (5)
		Inserción de aminoácidos	0	-
		Alteración del marco de lectura	4/79	Ins _{nt902-903} (1), Ins _{nt790-791} (3)
		Codón de parada prematuro	1/79	-
		Gen ausente	0	-
	mexB	wt	54/79	-
		Cambios en aminoácidos	18/79	I958L (6), N248S (1), R817C (1), P776S (1), Y545C (1), L672R (1), N517S (1), I186V (4), S1041E (7), V1042A (7), G967D (1)
		Delección de aminoácidos	10/79	$\Delta_{200}P$ (3), $\Delta_{663}V$ (4), $\Delta_{498}K$ (1), $\Delta_{36-40}PAIAP$ (1), $\Delta_{488}L$ (1)
		Inserción de aminoácidos	0	-
		Alteración del marco de lectura	0	-
		Codón de parada prematuro	2/79	-
		Gen ausente	0	-
	oprM	wt	72/79	-
		Cambios en aminoácidos	4/79	T454A (1), R328C (1), A391V (1), D488N (1)
		Delección de aminoácidos	0	-
		Inserción de aminoácidos	0	-
		Alteración del marco de lectura	0	-
		Codón de parada prematuro	3/79	-
	nalC	wt	0	-
		Cambios en aminoácidos	76/79	G71E (76), S209R (76), S5P (1), A145V (13), A186T (14), A160T (1), P210L (3), P183S (1)
		Delección de aminoácidos	8/79	$\Delta_{139-142}LLSE$ (5), $\Delta_{10-14}ERGRQ$, Δ_1M (2)
		Inserción de aminoácidos	3/79	Ins _{66-67I} (3)
		Alteración del marco de lectura	0	-
		Codón de parada prematuro	0	-
		Gen ausente	0	-
	nalD	wt	74/79	-
Cambios en aminoácidos		4/79	T158P (4)	
Delección de aminoácidos		1/79	$\Delta_{183-186}LFDP$ (1)	
Inserción de aminoácidos		0	-	
Alteración del marco de lectura		0	-	
Codón de parada prematuro		0	-	
Gen ausente		0	-	
mexR	wt	45/79	-	
	Cambios en aminoácidos	25/79	V126E (25)	
	Delección de aminoácidos	0	-	
	Inserción de aminoácidos	0	-	

Bomba /Gen	Tipo de modificación	Nº de aislados	Mutaciones y/o polimorfismos (nº de aislados)	
MexCD-OprJ	Alteración del marco de lectura	0	-	
	Codón de parada prematuro	4/79	-	
	Gen ausente	5/79	-	
	mexC	wt	14/79	-
		Cambios en aminoácidos	63/79	S330A (63), K230N (1), Q293R (1), H310R (4), P47S (10), R76Q (20), A378T (19), P383S (42), A384V (19), Q381L (1), A102V (4), T145I (3), E26A (7), A221V (1), S313G (1)
		Delección de aminoácidos	0	-
		Inserción de aminoácidos	0	-
		Alteración del marco de lectura	0	-
		Codón de parada prematuro	0	-
		Gen ausente	2/79	-
	mexD	wt	0	-
		Cambios en aminoácidos	76/79	E257Q (51), A536S (4), S845A (74), A959S (6), T87S (17), A155T (16), V660I (18), N669D (18), S685G (18), I703V (18), S915A (18), I982V (18), K1031R (20), S1040T (18), S68L (18), L168M (2), A566T (10), V607A (10), I900V (4), E231G (2), V465A (1), A997T (1)
		Delección de aminoácidos	2/79	Δ ₁ M (2)
		Inserción de aminoácidos	0	-
		Alteración del marco de lectura	0	-
		Codón de parada prematuro	1/79	-
		Gen ausente	0	-
	oprJ	wt	3/79	-
		Cambios en aminoácidos	72/79	D68G (42), M69V (69), Q267R (19), N73D (3), T376S (3), A214V (1), S264R (1)
		Delección de aminoácidos	0	-
		Inserción de aminoácidos	0	-
		Alteración del marco de lectura	0	-
		Codón de parada prematuro	2/79	-
		Gen ausente	2/79	-
	nfxB	wt	51/79	-
		Cambios en aminoácidos	26/79	R21H (16), D56G (15), G142S (2), W180R (2), S186A (2), A30T (1), G45D (2), T172P (3), R82L (3), F135L (2), R163L (2)
		Delección de aminoácidos	0	-
Inserción de aminoácidos		2/79	Ins105-106P (2)	
Alteración del marco de lectura		0	-	
Codón de parada prematuro		0	-	
Gen ausente		2/79	-	
MexEF-OprN	mexE	wt	57/9	-
		Cambios en aminoácidos	19/79	T285I (4), S8F (13), G315D (1), R362Q (1), D370E (6), L92P (1), D353E (6), S196Y (2), A383G (1)
		Delección de aminoácidos	0	-
		Inserción de aminoácidos	0	-
		Alteración del marco de lectura	0	-

Bomba /Gen	Tipo de modificación	Nº de aislados	Mutaciones y/o polimorfismos (nº de aislados)	
	Codón de parada prematuro	2/79	-	
	Gen ausente	1/79	-	
	<i>mexF</i>	wt	65/79	-
		Cambios en aminoácidos	13/79	T ₉₈₈ K (2), A ₅₈₃ V (2), E ₈₇₂ D (1), M ₃₈₆ I (1), D ₂₃₀ A (6), A ₉₃₀ V (2), G ₂₄₁ R (2), F ₅₀₉ V (2), D ₆₆₆ E (3)
		Delección de aminoácidos	0	-
		Inserción de aminoácidos	0	-
		Alteración del marco de lectura	0	-
		Codón de parada prematuro	0	-
		Gen ausente	1/79	-
		<i>oprN</i>	wt	51/79
	Cambios en aminoácidos		28/79	S ₁₃ P (27), S ₃₄₇ R (1), F ₈₆ S (1), D ₁₀₂ N (1), A ₁₆₂ V (1), A ₁₁₃ S (3), A ₄₁₀ S (3), A ₄ T (3)
	Delección de aminoácidos		0	-
	Inserción de aminoácidos		0	-
	Alteración del marco de lectura		0	-
	Codón de parada prematuro		0	-
	Gen ausente		0	-
	<i>mexT</i>	wt	0	-
		Cambios en aminoácidos	0	-
		Delección de aminoácidos	0	-
		Inserción de aminoácidos	0	-
		Alteración del marco de lectura	70/79	Δ _{nt236-243} (1), Δ _{nt237-244} (66), Δ _{nt238-257} (1), Δ _{nt621} (1), Ins _{nt574-575g} (1)
		Codón de parada prematuro	8/79	-
		Gen ausente	1/79	-
	<i>mexS</i>	wt	0	-
		Cambios en aminoácidos	79/79	D ₂₄₉ N (79), A ₃₇ V (5), P ₁₁₅ L (5), V ₇₀ A (1), G ₂₂₄ A (1), A ₅₂ T (1), E ₂₀₅ V (2), A ₅₆ D (1), V ₇₃ A (2), A ₇₅ V (1), A ₂₅₈ V (1)
		Delección de aminoácidos	0	-
		Inserción de aminoácidos	0	-
Alteración del marco de lectura		0	-	
Codón de parada prematuro		0	-	
Gen ausente		0	-	
<i>mvaT</i>	wt	77/79	-	
	Cambios en aminoácidos	2/79	A ₉ T (2)	
	Delección de aminoácidos	0	-	
	Inserción de aminoácidos	0	-	
	Alteración del marco de lectura	0	-	
	Codón de parada prematuro	0	-	
	Gen ausente	0	-	
<i>MexXY-OprM</i>	wt	1/79	-	
	<i>mexX</i> Cambios en aminoácidos	77/79	K ₃₂₉ Q (76), L ₃₃₁ V (59), D ₃₄₆ H (7), W ₃₅₈ R (77), G ₂₉₂ S (1), A ₃₀ T (21), R ₅₉ H (1), L ₂₂ M (4), D ₁₃₅ Y (4), R ₃₅₁ S (1), A ₂₇ T (2), A ₁₅ T (3), E ₂₅ D (3), E ₂₆ K (3), A ₂₈ P (3), D ₂₉ E (3), G ₃₁ E (3), T ₃₃ A (3), A ₃₄ T (3), E ₃₅ D (3),	

Bomba /Gen	Tipo de modificación	Nº de aislados	Mutaciones y/o polimorfismos (nº de aislados)	
			R46K (3), A153S (3), K161R (3), K236Q (3), R338H (3), I349V (3), D384G (3), V309I (1), G344D (2)	
	Delección de aminoácidos	0	-	
	Inserción de aminoácidos	0	-	
	Alteración del marco de lectura	1/79	Δ_{nt111} (1)	
	Codón de parada prematuro	0	-	
	Gen ausente	0	-	
	wt	0	-	
	mexY	Cambios en aminoácidos	73/79	T543A (69), Q840E (35), M347T (1), I6T (5), I536V (25), G589A (24), R304C (1), N1036T (19), Q1039R (15), T232A (1), F29S (1), A772T (1), V373A (2), Q282R (5), V299A (1), S476P (1), G530S (2), V942A (4), V979M (2), E152D (3), A87V (1), A258V (2), D628H (3), H638R (2), D428N (4), N210S (3), Q843P (3), P9S (1), G1002A (2), V980I (2)
		Delección de aminoácidos	1/79	Δ_{iM} (1)
		Inserción de aminoácidos	0	-
		Alteración del marco de lectura	0	-
		Codón de parada prematuro	3/79	-
		Gen ausente	0	-
		wt	72/79	-
	oprM	Cambios en aminoácidos	4/79	T454A (1), R328C (1), A391V (1), D448N (1)
		Delección de aminoácidos	0	-
		Inserción de aminoácidos	0	-
		Alteración del marco de lectura	0	-
		Codón de parada prematuro	3/79	-
Gen ausente		-	-	
wt	0	-		
fnt	Cambios en aminoácidos	79/79	I181V (65), L287V (48), A185T (1), I196V (11), I196D (17), A308T (18), S54N (16), R268C (2), M86I (3), A179V (3), E277K (3), A161V (2), A296S (3), R281H (2)	
	Delección de aminoácidos	0	-	
	Inserción de aminoácidos	0	-	
	Alteración del marco de lectura	0	-	
	Codón de parada prematuro	0	-	
	Gen ausente	0	-	
wt	18/79	-		
mexZ	Cambios en aminoácidos	44/79	L138R (13), N186S (11), V208L (5), A144T (2), L166P (1), G195E (14), S9P (2), G50D (4), L174P (1), T31N (3), G68A (3), Q69R (3), N76R (3), R78D (3), F136L (3), Q140L (3), E146A (3), R147Q (3), I161V (3), I170V (3), D182N (3), M191L (3), L196I (3), S201G (3), Y204H (3), L207R (3), D209R (3), N186S (12), G89S (1), G137D (1), L199R (1)	
	Delección de aminoácidos	7/79	Δ_{34M} (1), $\Delta_{103-106QRLV}$ (5), $\Delta_{136-140FGLRQ}$ (1)	
	Inserción de aminoácidos	1/79	Ins161-162Y (1)	
	Alteración del marco de lectura	6/79	$\Delta_{nt438-453}$ (3), Δ_{nt645} (1), Δ_{nt484} (2)	
	Codón de parada prematuro	9/79	-	
	Gen ausente	0	-	

Bomba /Gen	Tipo de modificación	Nº de aislados	Mutaciones y/o polimorfismos (nº de aislados)
	Gen ausente	1/79	-

*Δ: Delección, Ins: Inserción, nt: nucleótido.

**wt: Secuencia sin cambios en comparación con la de la cepa control *P. aeruginosa* PAO1

***Las letras en minúscula indican mutaciones en nucleótidos y en mayúscula indican mutaciones en aminoácidos

5. Factores de virulencia en *P. aeruginosa*

Una vez estudiado el resistoma de los 79 aislados de *P. aeruginosa* secuenciados, se estudió el viruloma de los mismos. A lo largo de este estudio se observó la presencia de genes de virulencia, se determinó la capacidad de formación de biofilm y la movilidad de los aislados. Finalmente, se estudió la virulencia de estos aislados en modelos animal y celular, utilizando larvas de *Galleria mellonella* y la línea celular A549.

5.1. Genes de virulencia

Utilizando la base de datos VirulenceFinder, incluida en el pipeline TORMES, se identificaron 292 genes de virulencia involucrados en los procesos de adherencia, actividad antimicrobiana, antifagocitosis y captación de hierro, así como biosurfactantes, enzimas, toxinas secretadas por los sistemas de secreción y genes reguladores. En la Figura 42 se representa de manera general la distribución de estos genes entre los 79 aislados, en verde se representan los genes presentes y, en gris, los genes ausentes.

Mediante PCR, secuenciación y posterior comparación con la base de datos VFBD (VirulenceFinder Database) se determinó, en *P. aeruginosa*, la presencia de 280 genes de virulencia que intervienen en procesos asociados a la adherencia bacteriana, actividad antimicrobiana y enzimática, biosíntesis de surfactantes y ramnolípidos, captación de hierro, toxinas, sistema QS y sistemas de secreción (Tabla A4 del Anexo 4). Cabe destacar la alta prevalencia de estos genes en los aislados de *P. aeruginosa*, estando presentes en la colección FQ en un rango entre 71,4% - 90%, y en los aislados de la colección BNFQ en un rango entre 83%-89,6%.

Se estudió la presencia de 29 genes relacionados con el flagelo y su funcionamiento, donde *fleI*, *fleP* y *flgL* estuvieron ausentes en 20 aislados, así como 34 genes involucrados en la biogénesis y funcionamiento del pili. En estos últimos se observó una amplia variedad de

distribución de los genes *fimT*, *fimU*, *fimV*, *pilA*, *pilB*, *pilC*, *pilE*, *pilV*, *pilW*, *pilX*, *pilY* y *pilZ*. De igual manera fue interesante determinar la presencia de 20 genes implicados en la síntesis de alginato, presentes en todos los aislados, a excepción de 6 aislados (13-5486, 12-0805, 12-6353, 13-2507, 13-3753 y 12-1159) carentes de *algQ* y 3 (13-3753, 10-5351 y 12-1159) donde *algB*, *algF* y *algP* estuvieron ausentes. Los genes con actividad enzimática, *lasA* y *lasB*, estuvieron presentes en todos los aislados.

Tras estudiar los genes implicados en la captación de hierro, se observó la ausencia de aquellos relacionados con la síntesis de piochelina, *pchGHI*, en 15-0495 y *pchF* en 13-3753. Los genes responsables de la biosíntesis de pioverdina, *pvdADST* estuvieron presentes en 40 aislados, sin embargo, en 3 de la colección de FQ (13-5486, 13-2507 y 12-0560) no se encontró ninguno. El receptor FpvA se encontró en 24 aislados de FQ y 18 de BNFQ. Los genes responsables de la biosíntesis de fenazinas, *phzABCDEFG* estuvieron presentes en todos los aislados, a excepción de 13-3753, donde solo se encontró *phzD* y 12-1159 y 10-5351, donde solo se encontró *phzCDF*.

En todos los aislados se encontraron los genes *xcpPQRSTUVWXYZ* del T2SS. En los aislados de la colección FQ, 13-3753, 10-5351 y 12-1159, se encontraron los genes de producción de cianuro de hidrógeno *hcnA*, *hcnB* y *hcnC* y la exotoxina A (*toxA*) estuvo ausente en 12-1159.

En lo que se refiere al T3SS, se detectaron las proteínas efectoras ExoU, ExoS, ExoT y ExoY. Todos los aislados fueron positivos para *exoS* o *exoU*, a excepción de 4 (12-1159, 13-2077, 13-3189, 13-4111) que no presentaron ninguno de esos genes. Así mismo, en ningún aislado se detectó la presencia de *exoS* y *exoU* juntos. Cabe destacar que en ambas colecciones predominó la presencia de *exoS* sobre *exoU* (75% FQ y 68% BNFQ). Se detectó la ausencia de los genes *psc2*, *pscP* y *pscQ* en 3 aislados de FQ (13-3753, 10-5351, 12-1159) y de *pscB* y *exsA* en 10-5351 y 12-1159, respectivamente.

Se estudió la presencia de 20 proteínas efectoras del T6SS y su distribución entre ambas colecciones está representada en la Figura 41. Entre un 75-100% de los genes efectoros estuvieron presentes en los aislados de la colección FQ, y entre un 85-100% en la colección BNFQ. Comenzando por la colección FQ, *hcpA* y *hpcC* estuvieron ausentes en 4 y 9 cepas, respectivamente. Se detectó la presencia de *pldA* en 14 aislados, de *pldB* en todos, a excepción de uno (10-5351), y *tle3* estuvo ausente en 4 (12-5709, 15-0495, 15-6548 y 12-6494). Los

que afectaron a las 79 cepas, siendo A₄₆V el mayoritario, identificado en 58 cepas. Así mismo, se encontraron mutaciones en los genes *rpoN* y *rpoS* en 14 y 8 cepas, respectivamente, siendo estas sustituciones en aminoácidos. En solo 3 aislados se encontraron polimorfismos en GacA, siendo 1 de ellas provocada por la delección de una glutamina en la posición 128 y, 2 de ellas cambios en aminoácidos, sin embargo, las alteraciones en GacS afectaron a 18 cepas, 17 de las cuales fueron por cambios aminoacídicos y la cepa restante presentó una delección de 5 aminoácidos en las posiciones 639-643. El regulador MvfR estuvo alterado en 27 cepas por cambios en aminoácidos, como A₃₁₄V, encontrado en 19 cepas, y en 2 más se produjo la delección de una glutamina en la posición 290. Finalmente, *rhII* y *rhIR* estuvieron ausentes en 14 cepas; mientras en RhII se encontraron cambios aminoacídicos en 60 cepas, en RhIR solo se encontraron en 5, además de la delección de 2 aminoácidos en las posiciones 121-122 en uno de los aislados.

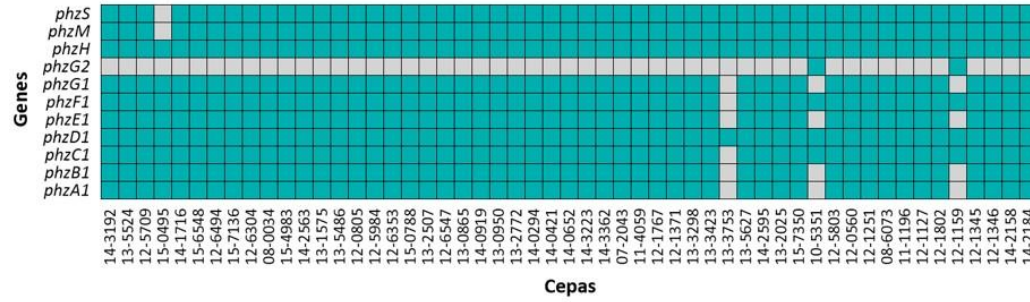
Tabla 21. Mutaciones en genes reguladores del T6SS

Gen	Tipo de mutación	Nº de aislados	Modificaciones (nº de aislados)
<i>ladS</i>	wt	0/79	-
	Cambios en aminoácidos	73/79	V ₅₀₉ A (73), A ₅₁₇ S (2), F ₃₆₂ L (8), L ₁₀₁ I (21), S ₇₉₄ T (20), P ₂₃₉ L (1), G ₂₆₀ D (2), D ₆₂ G (1), S ₁₆₂ T (2), T ₅₅₆ P (2), V ₇₉₁ I (2), L ₆₅₀ M (2)
	Delección de aminoácidos	0	-
	Inserción de aminoácidos	0	-
	Alteración del marco de lectura	0	-
	Codón de parada prematuro	6/79	-
	Gen ausente	0	-
<i>retS</i>	wt	0	-
	Cambios en aminoácidos	79/79	A ₄₆ V (58) V ₃₅ A (1), D ₅₅₉ H (7), I ₃₂₄ V (28), L ₄₁₉ P (2), A ₅₆₉ T (1), S ₁₀₂ I (2), D ₇₁₃ G (2), Q ₆₂₄ H (1), L ₆₃₇ M (1)
	Delección de aminoácidos	0	-
	Inserción de aminoácidos	0	-
	Alteración del marco de lectura	0	-
	Codón de parada prematuro	0	-
	Gen ausente	0	-
<i>rpoN</i>	wt	65/79	-
	Cambios en aminoácidos	14/79	D ₂₉₅ Y (2), V ₃₆₈ I (1), N ₁₆₉ H (1), T ₃₆₅ P (4), I ₁₈₀ V (1), S ₈₁ G (3), S ₇₆ P (1), S ₇₁ T (1)
	Delección de aminoácidos	0	-
	Inserción de aminoácidos	0	-
	Alteración del marco de lectura	0	-
	Codón de parada prematuro	0	-
	Gen ausente	0	-
<i>rpoS</i>	wt	71/79	-

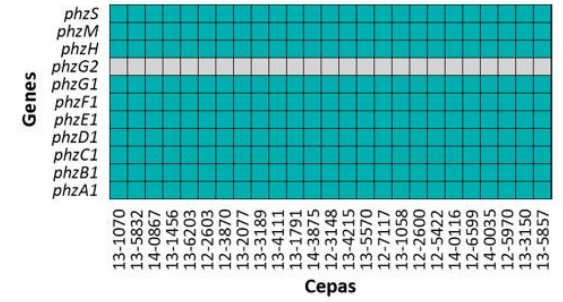
Gen	Tipo de mutación	Nº de aislados	Modificaciones (nº de aislados)
	Cambios en aminoácidos	8/79	E ₃₀₅ K (1), H ₁₂ R (2), A ₃₈ T (5)
	Delección de aminoácidos	0	-
	Inserción de aminoácidos	0	-
	Alteración del marco de lectura	0	-
	Codón de parada prematuro	0	-
	Gen ausente	0	-
	wt	76/79	-
<i>gacA</i>	Cambios en aminoácidos	2/79	C ₃₉ F (1), L ₆₃ P (1)
	Delección de aminoácidos	1/79	Δ ₁₂₈ Q (1)
	Inserción de aminoácidos	0	-
	Alteración del marco de lectura	0	-
	Codón de parada prematuro	0	-
	Gen ausente	0	-
	wt	60/79	-
<i>gacS</i>	Cambios en aminoácidos	17/79	T ₃₀₆ A (1), G ₄₇₄ S (2), G ₅₇₂ D (3), D ₉₀₇ E (4), A ₈₄₅ T (1), L ₆₃₈ P (1), Q ₂₀₆ H (2), L ₃₅₅ P (2), T ₈₅₂ S (3), T ₉₁₂ N (3), V ₃₃₁ I (1), S ₅₀₈ N (1), D ₅₅₈ N (1)
	Delección de aminoácidos	1/79	Δ ₆₃₉₋₆₄₃ QRKLQ (1)
	Inserción de aminoácidos	0	-
	Alteración del marco de lectura	0	-
	Codón de parada prematuro	1/79	-
	Gen ausente	0	-
	wt	50/79	-
<i>mvfR</i>	Cambios en aminoácidos	27/79	A ₃₁₄ V (19), R ₂₉ C (1), G ₃₁₉ S (2), P ₆₀ L (3), L ₅₀ Q (2)
	Delección de aminoácidos	2/79	Δ ₂₉₀ Q (2)
	Inserción de aminoácidos	0	-
	Alteración del marco de lectura	0	-
	Codón de parada prematuro	0	-
	Gen ausente	0	-
	wt	5/79	-
<i>rhII</i>	Cambios en aminoácidos	60/79	S ₆₂ G (54), D ₈₃ E (34), A ₁₂₇ G (15), P ₇₄ S (1), S ₁₂₃ G (1), R ₄₁ K (2)
	Delección de aminoácidos	0	-
	Inserción de aminoácidos	0	-
	Alteración del marco de lectura	0	-
	Codón de parada prematuro	0	-
	Gen ausente	14/79	-
	wt	59/79	-
<i>rhIR</i>	Cambios en aminoácidos	5/79	V ₃₀ A (1), T ₅₄ A (1), G ₇₈ E (2), P ₅₆ L (1)
	Delección de aminoácidos	1/79	Δ ₁₂₁₋₁₂₂ TL (1)
	Inserción de aminoácidos	0	-
	Alteración del marco de lectura	0	-
	Codón de parada prematuro	0	-
	Gen ausente	14/79	-
	wt	59/79	-

*wt: Secuencia igual a la de la cepa control *P. aeruginosa* PAO1, Δ: Delección

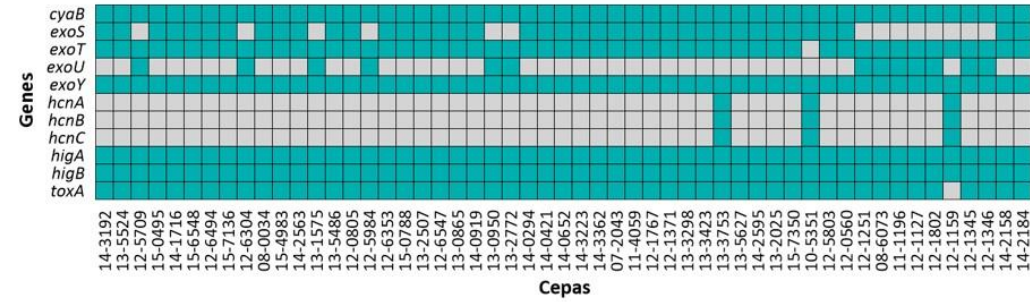
Actividad antimicrobiana - Colección FQ



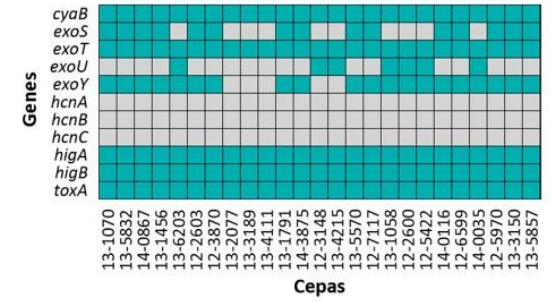
Actividad antimicrobiana - Colección BNFQ



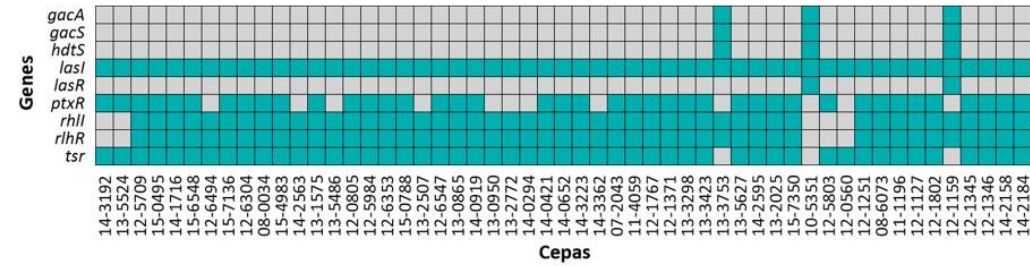
Toxinas - Colección FQ



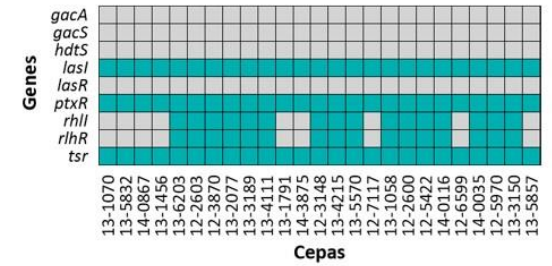
Toxinas - Colección BNFQ



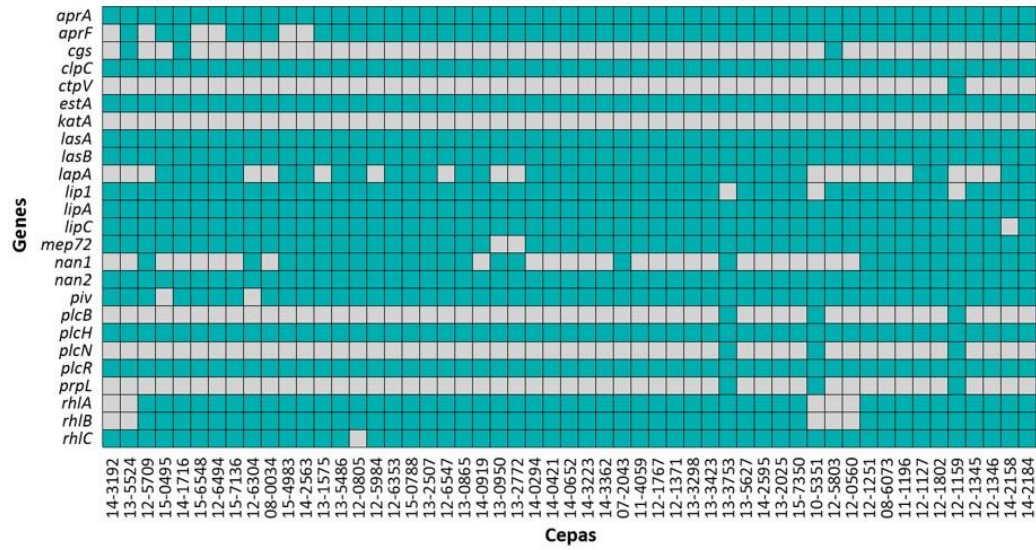
Regulación - Colección FQ



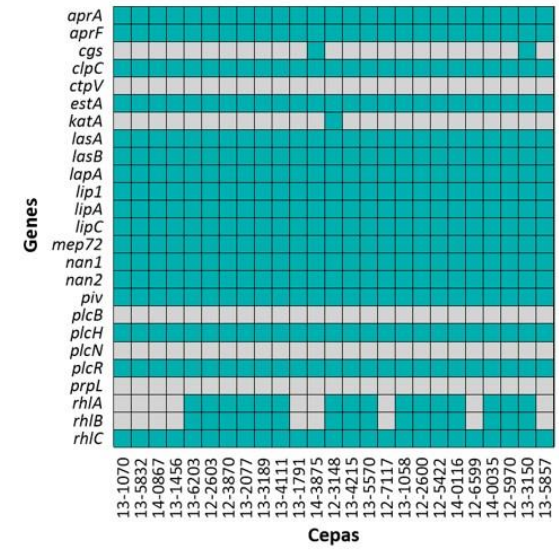
Regulación - Colección BNFQ



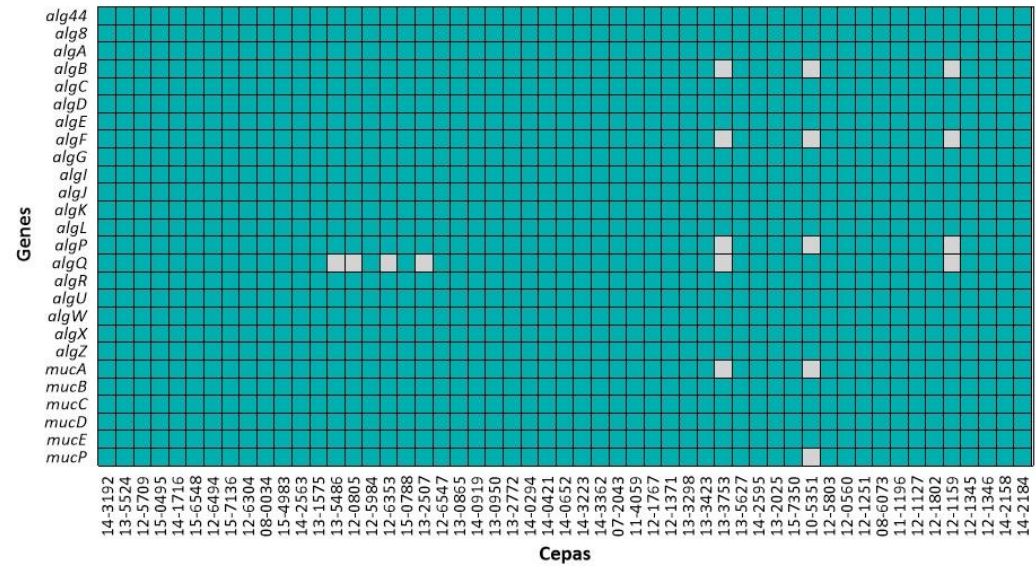
Biosurfactantes y actividad enzimática - Colección FQ



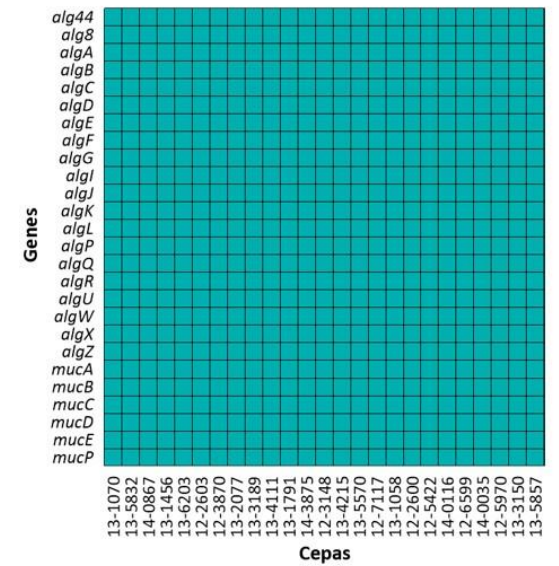
Biosurfactantes y actividad enzimática - Colección BNFG



Antifagocitosis - Colección FQ



Antifagocitosis - Colección BNFG



5.2. Formación de biofilm

La capacidad de formación de biofilm se evaluó mediante la cuantificación de la cantidad de cristal violeta adherido a los pocillos. Todos los aislados fueron productores de biofilm (Figura 43-A). El 93% produjo biofilm fuerte, el 6% de los aislados fue productor de biofilm moderado y el 1% lo fue de biofilm débil. A continuación, el biofilm formado se cuantificó mediante el conteo de UFC y su normalización definida como el $\text{Log}_{10}\text{UFC}/\text{DO}_{600}$ y representado en las gráficas de la Figura 43-B. De esta manera se pueden observar cuantitativamente las diferencias que existen entre la producción de biofilm de los aislados de ambas colecciones. Si bien se ven diferencias entre las cepas de una misma colección, es evidente que la capacidad de formar biofilm es mayor en las cepas provenientes de pacientes con FQ que en aquellas provenientes de pacientes con BNFQ.

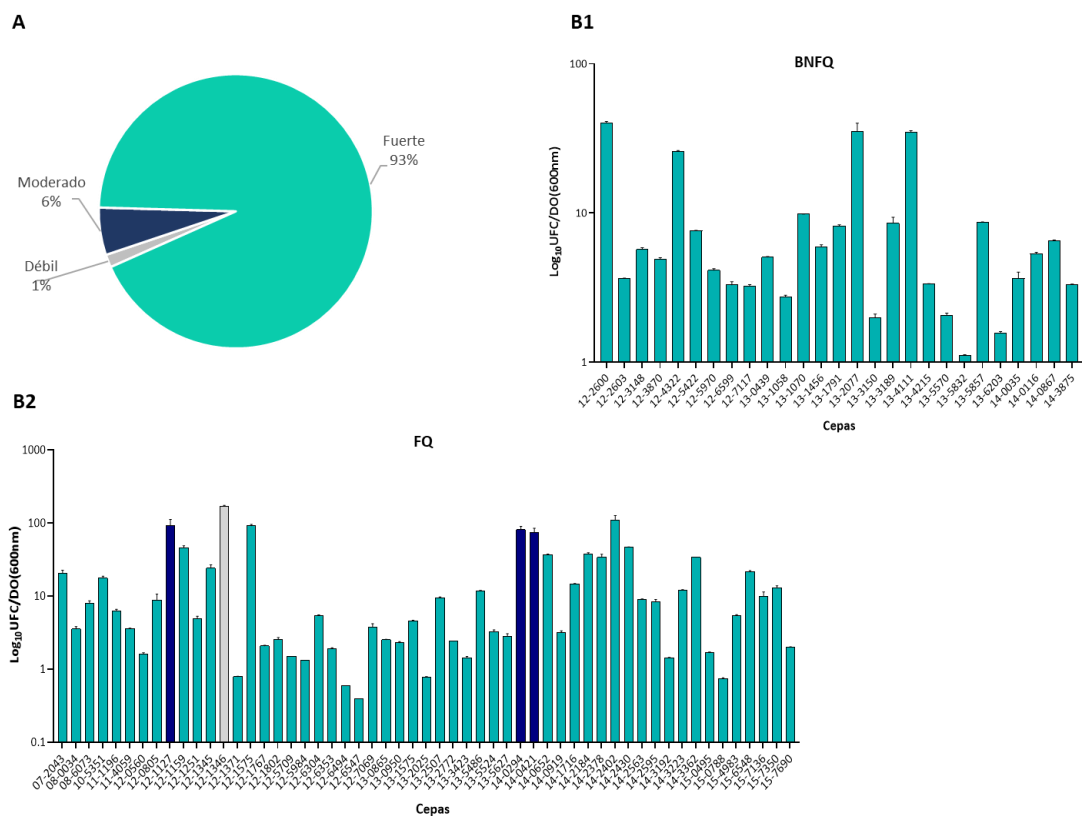


Figura 43. Formación de biofilm. A) Capacidad productora de biofilm. B1) Cuantificación del biofilm en los aislados de la colección BNFQ. B2) Cuantificación del biofilm en los aislados de la colección FQ

5.2.1. Oxilipinas y formación de biofilm

Como se describió anteriormente, las oxilipinas 10-HOME y 7,10-DiHOME, sintetizadas por las diolsintasas de *P. aeruginosa*, en presencia de ácido oleico, favorece la formación de biofilm (98). Una vez comprobada la actividad diolsintasa de una selección de aislados de ambas colecciones (Tabla 22), mediante la inoculación en MHA suplementado con ácido oleico, se estudió la formación de biofilm de los mismos en presencia de ácido oleico. Como se observa en los gráficos de la Figura 44-A, en presencia de ácido oleico incrementa la capacidad de formación de biofilm de los aislados de *P. aeruginosa*.

En una selección de aislados donde se observó un incremento en la formación de biofilm en presencia de ácido oleico (Tabla 22) se estudió la expresión del gen PA2077, conformante del operón que codifica las diolsintasas. Como se puede ver en el gráfico 44-B, hay expresión del gen en todos los aislados.

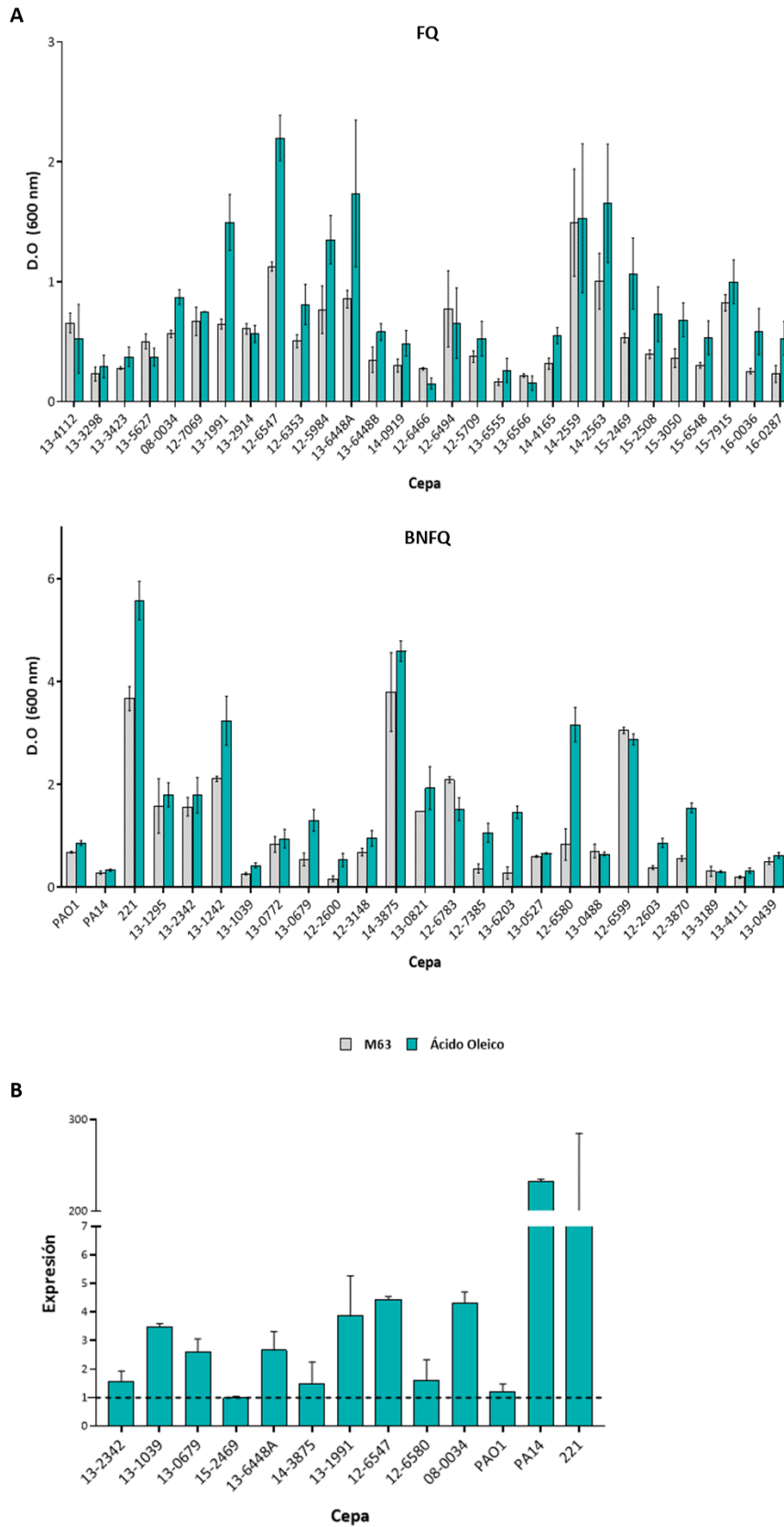


Figura 44. Estudio de la actividad diolsintasa. A) Efecto del ácido oleico en la formación de biofilm. B) Expresión del gen *PA2077*

Tabla 22. Selección de aislados con actividad diolsintasa

Aislados con actividad diolsintasa	Colección	Expresión de PA2077
13-4112		-
13-3298		-
13-3423		-
13-5627		-
08-0034		4,33
12-7069		-
13-1991		3,86
13-2914		-
12-6547		4,44
12-6353		-
12-5984		-
13-6448A		2,66
13-6448B		-
14-0919		-
12-6466	FQ	-
12-6494		-
12-5709		-
13-6555		-
13-6566		-
14-4165		-
14-2559		-
14-2563		-
15-2469		0,99
15-2508		-
15-3050		-
15-6548		-
15-7915		-
16-0036		-
16-0287		-
13-1295	BNFQ	-

Aislados con actividad diolsintasa	Colección	Expresión de PA2077
13-2342		1,57
13-1242		-
13-1039		3,48
13-0772		-
13-0679		2,61
12-2600		-
12-3148		-
14-3875		1,49
13-0821		-
12-6783		-
12-7385		-
13-6203		-
13-0527		-
12-6580		1,62
13-0488		-
12-6599		-
12-2603		-
12-3870		-
13-3189		-
13-4111		-
13-0439		-

*Todos los aislados de esta tabla tienen actividad diolsintasa, sin embargo, el estudio de expresión del gen PA2077 solo se realizó en los 10 cuyo valor se muestra en la tabla.

5.3.Movilidad

Otro de los factores de virulencia estudiados fue la movilidad swimming y swarming de los aislados de pacientes con FQ. Los desplazamientos de los aislados están representados en la gráfica de la Figura 45. Como se indica en dicha gráfica, el rango de desplazamiento es de 0,6-7,1 cm en el caso de movilidad de tipo swimming y de 0,5-7,3 cm en el caso del tipo swarming. Como se puede ver, no existe diferencia entre estos rangos, sin embargo, en 8 aislados el tipo swimming predominó sobre el swarming y en 29 aislados se produjo el caso

contrario. En los aislados restantes apenas se observaron diferencias entre los dos tipos de movilidad.

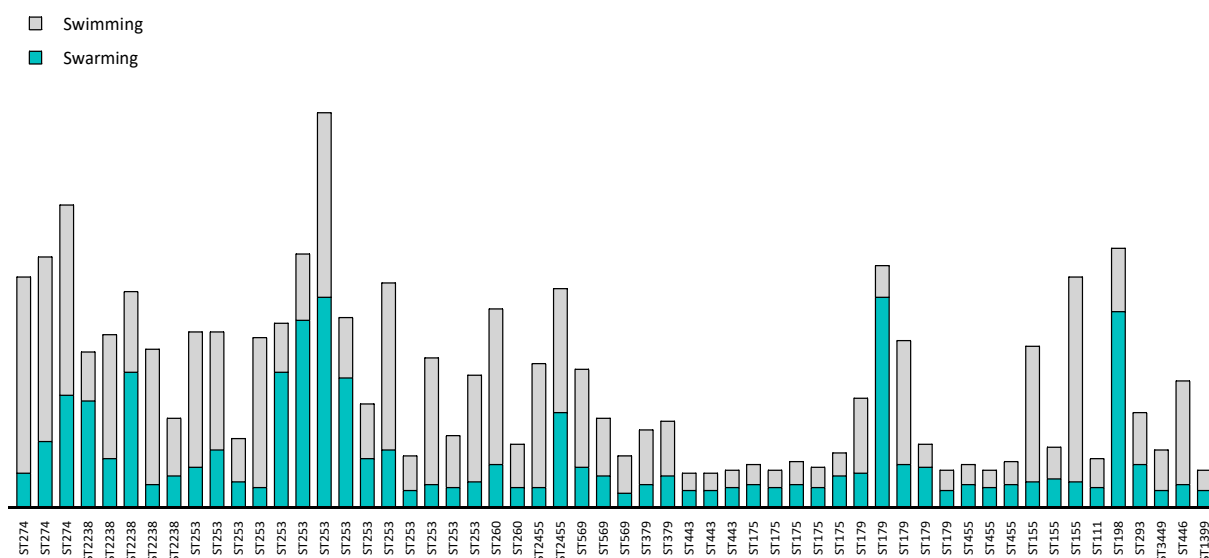


Figura 45. Movilidad de los aislados de *P. aeruginosa*

Los desplazamientos se clasificaron en 3 categorías según su rango y se definieron los patrones de movilidad baja, media y alta para las cepas a las que engloban (Tabla 23).

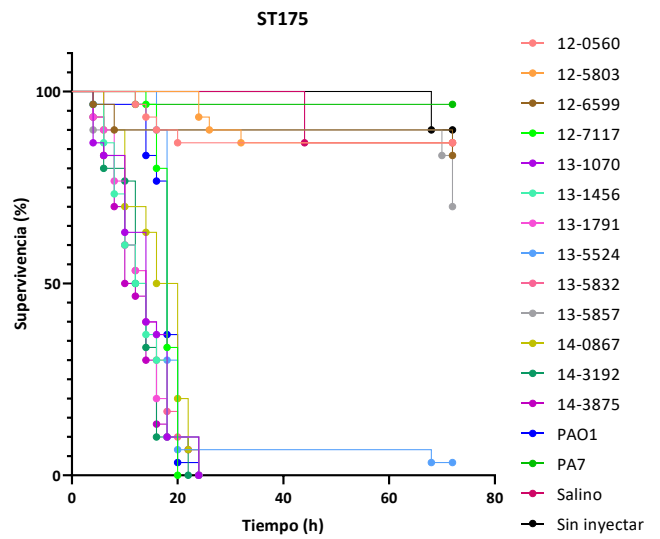
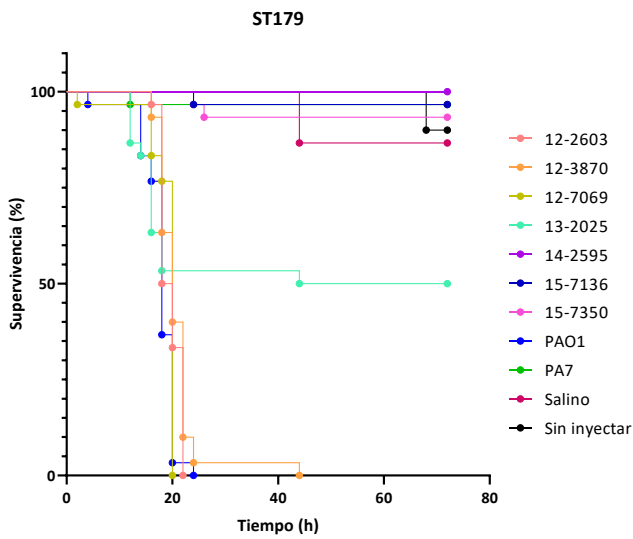
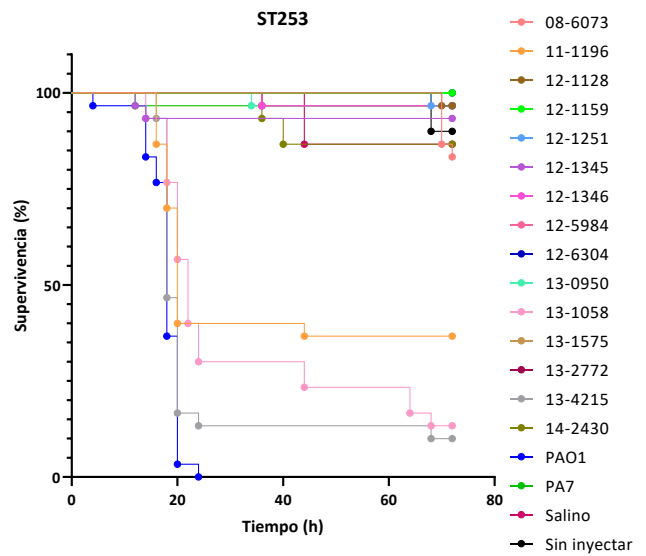
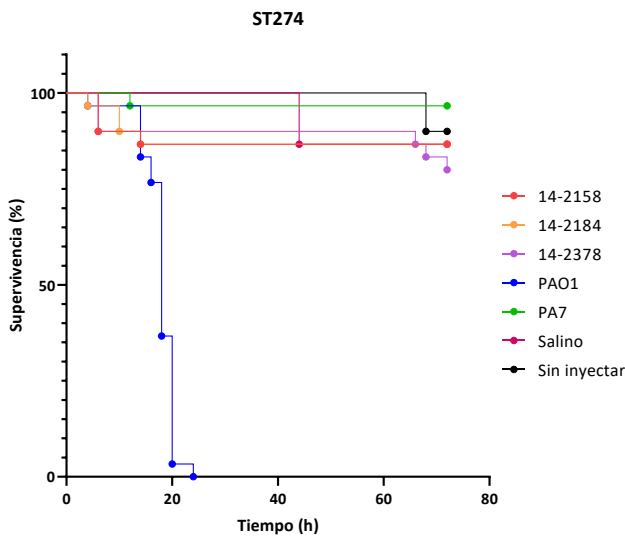
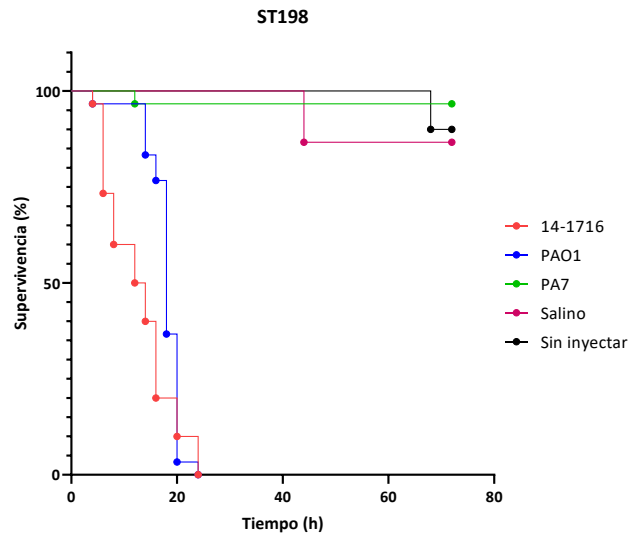
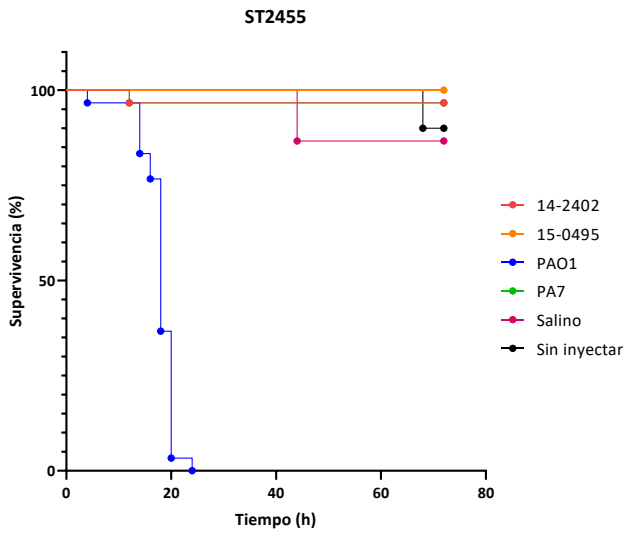
Tabla 23. Patrones de movilidad según el rango de desplazamiento

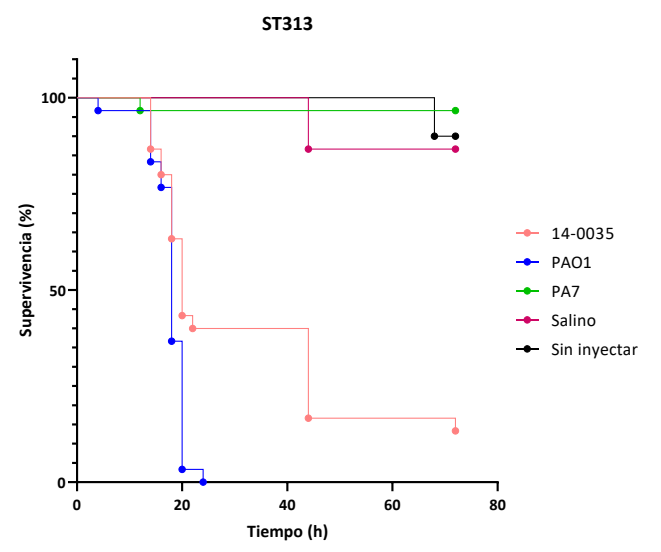
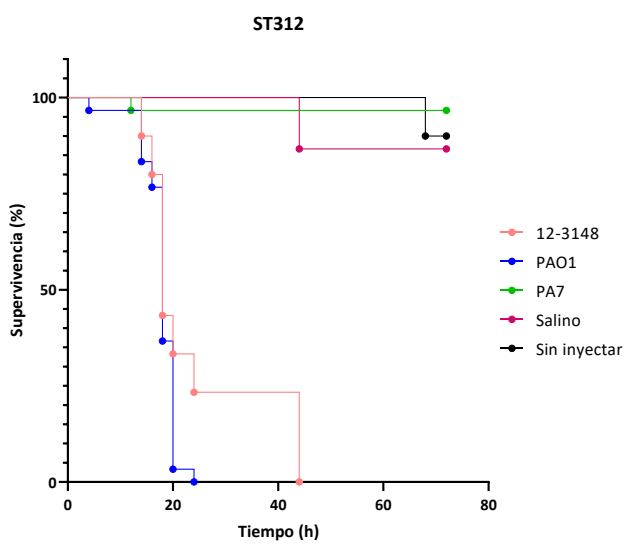
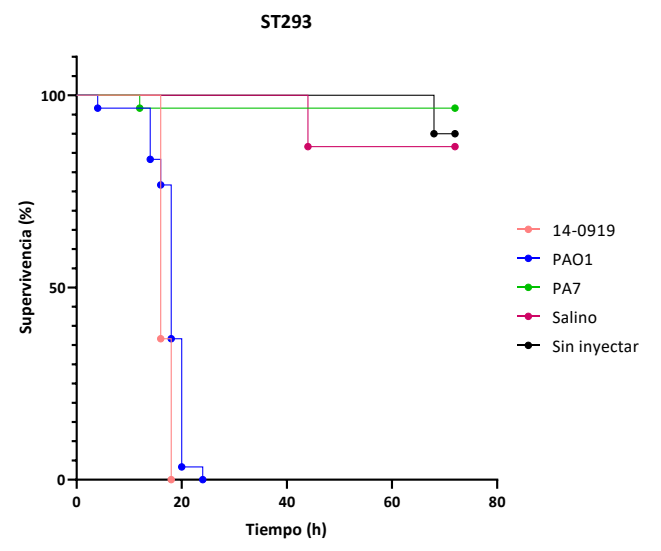
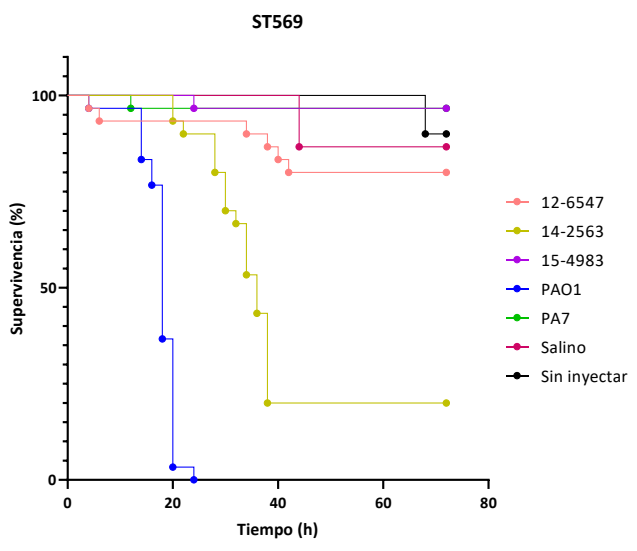
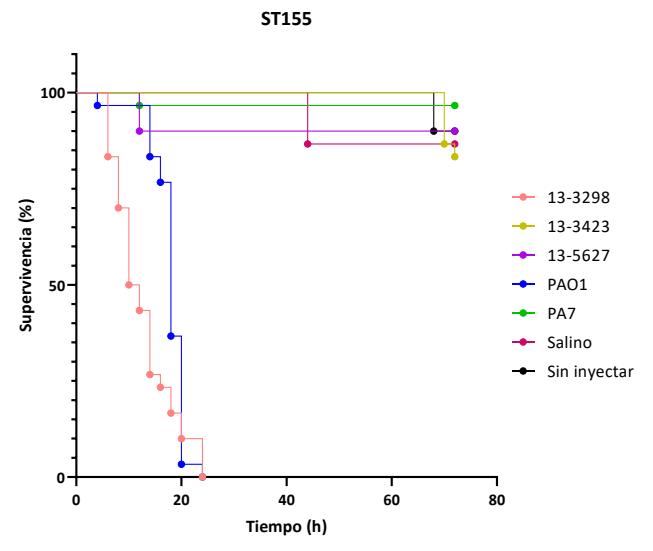
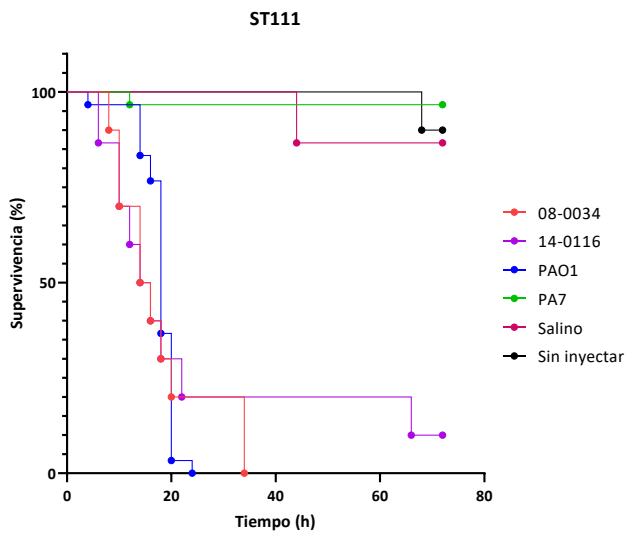
Movilidad (cm)	Tipo	Nº de aislados	ST
Baja (≤ 1)	Swimming	15	ST443 (3), ST175 (5), ST179 (2), ST455 (3), ST111 (1), ST1399 (1)
	Swarming	29	ST2238 (1), ST253 (6), ST260 (1), ST2455 (1), ST569 (1), ST379 (1), ST443 (3), ST175 (4), ST179 (1), ST455 (3), ST155 (3), ST111 (1), ST3449 (1)
Media (1-5)	Swimming	33	ST2238 (5), ST253 (11), ST260 (1), ST2455 (2), ST569 (3), ST379 (2), ST179 (3), ST155 (2), ST198 (1), ST293 (1), ST3449 (1), ST446 (1)
	Swarming	23	ST274 (3), ST2238 (4), ST253 (6), ST260 (1), ST2455 (1), ST569 (2), ST379 (1), ST175 (1), ST179 (3), ST293 (1)

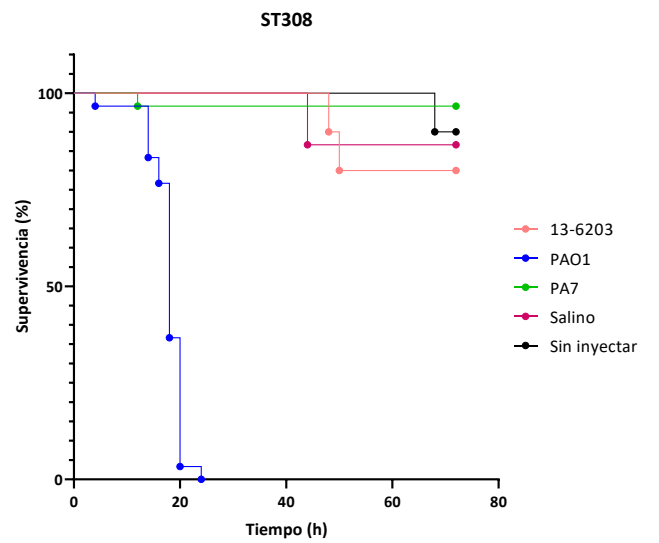
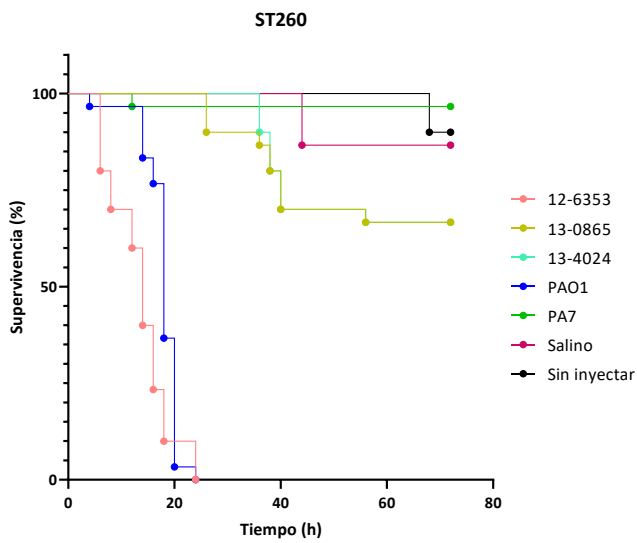
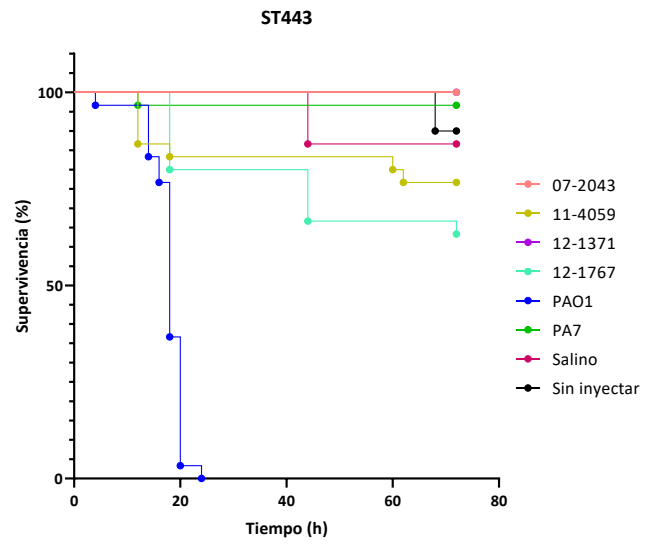
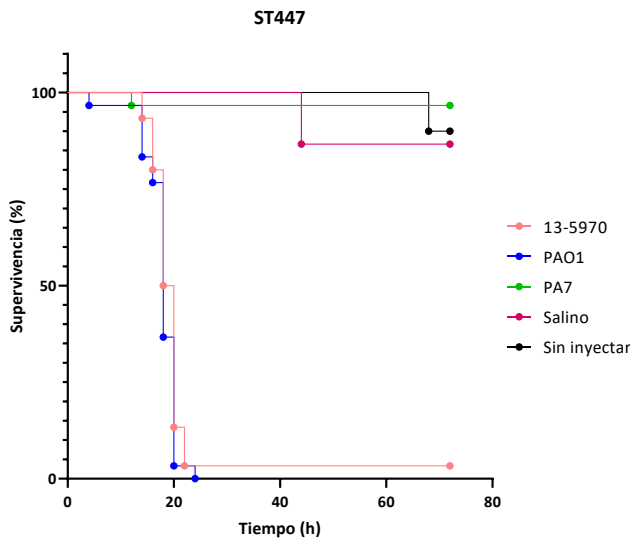
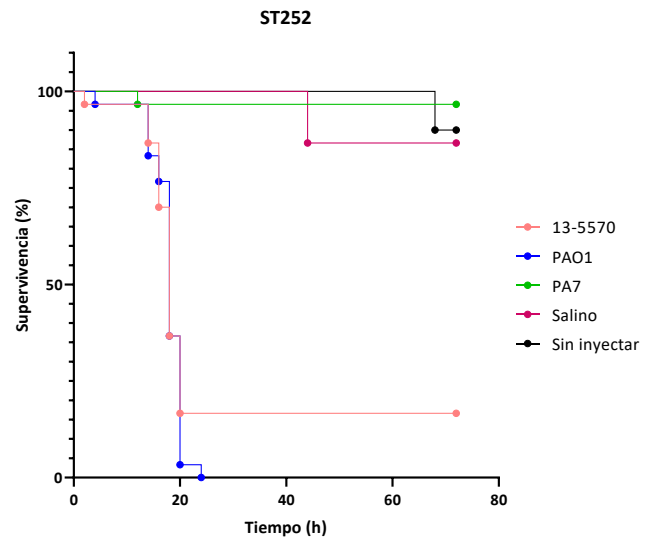
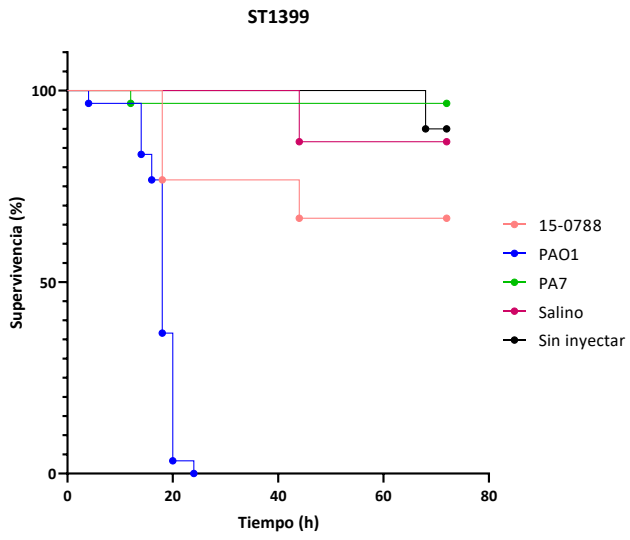
Movilidad (cm)	Tipo	Nº de aislados	ST
Alta (>5)	Swimming	8	ST274 (3), ST253 (3), ST260 (1), ST155 (1)
	Swarming	4	ST253 (2), ST179 (1), ST198 (1)

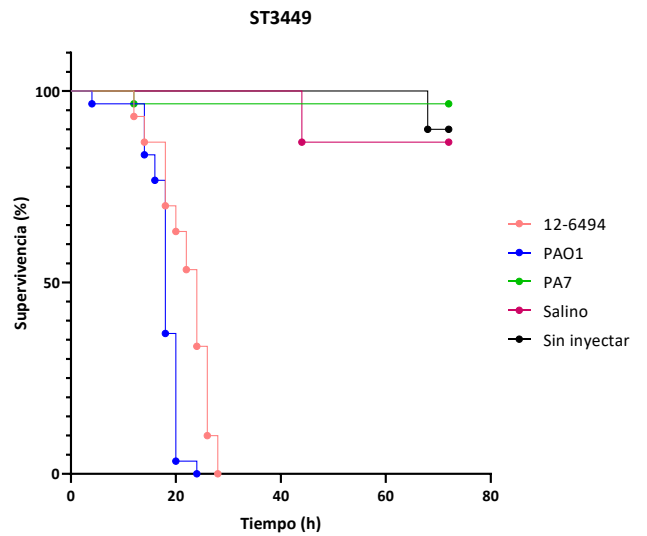
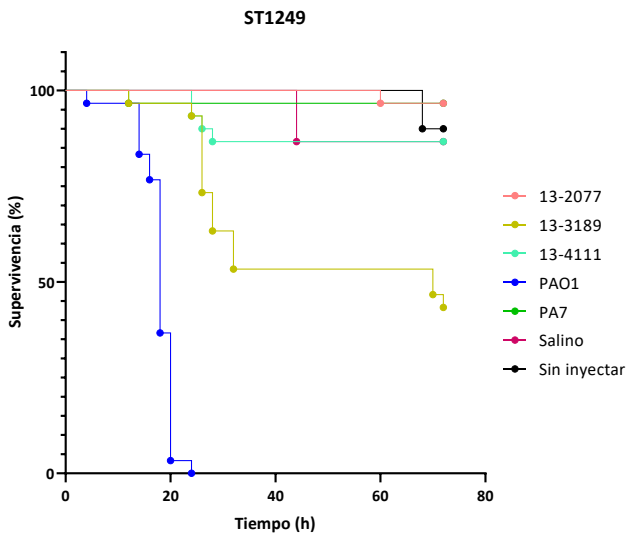
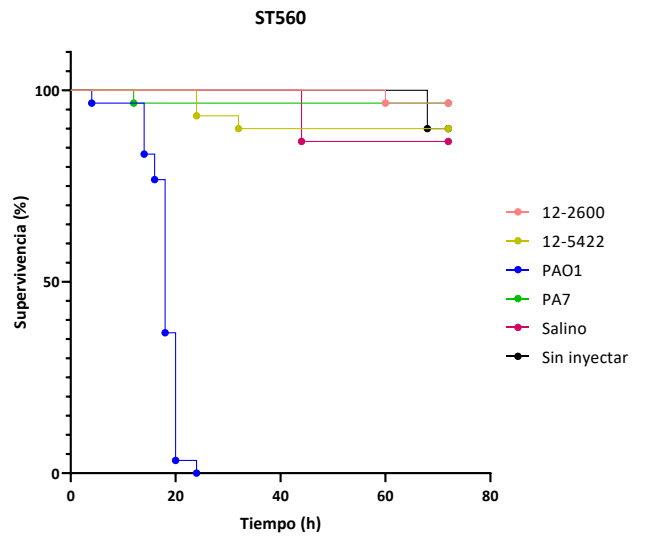
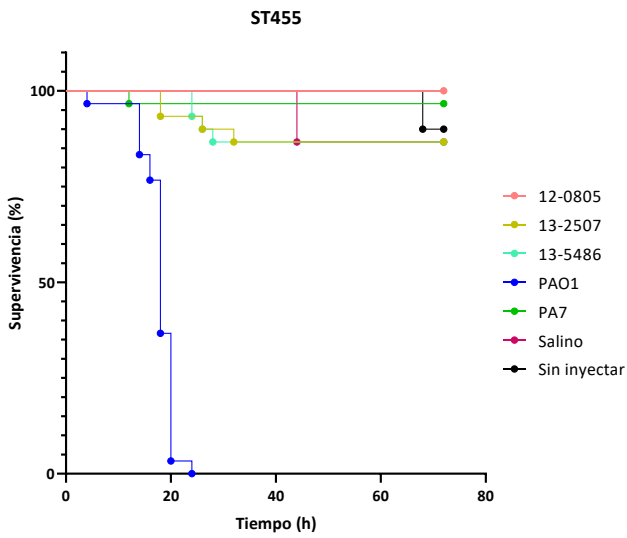
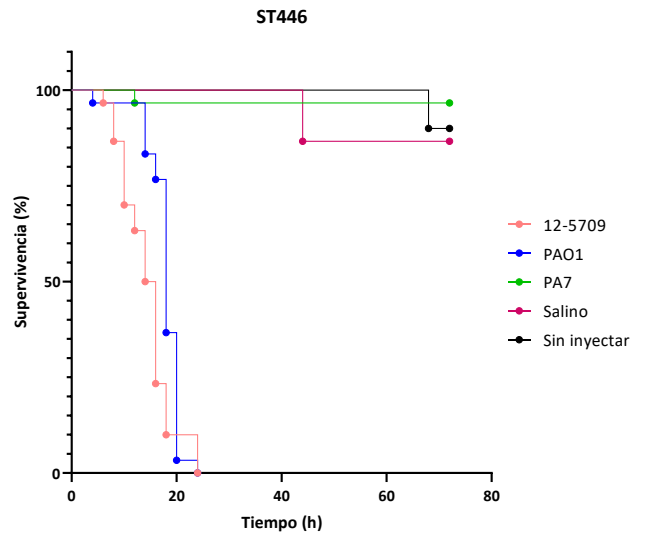
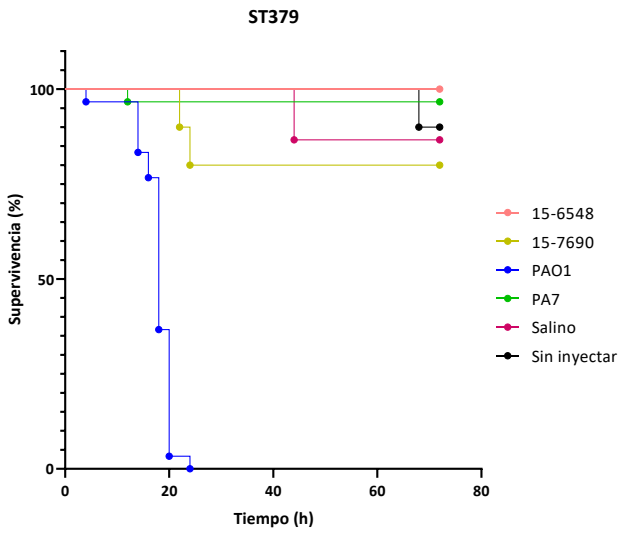
5.4. Estudios de supervivencia/mortalidad en *G. mellonella*

Se utilizó el modelo animal *G. mellonella* para estudiar la virulencia de los 79 aislados secuenciados (Tabla B1 del Anexo 1). Las cepas de referencia *P. aeruginosa* PAO1 y PA7 se utilizaron como controles, además de larvas inyectadas con solución salina y larvas sin inyectar. En las gráficas de la Figura 46 se representa el porcentaje de supervivencia tras 72 horas de infección. La cepa *P. aeruginosa* PAO1 (línea azul) es altamente virulenta y tras 24 horas de infección no quedaban larvas vivas. Los aislados pertenecientes a los clones ST198, ST293, ST312, ST313, ST1399, ST252, ST447, ST446, ST3449 mostraron un comportamiento similar al de esta cepa. Por el contrario, la cepa *P. aeruginosa* PA7 (línea verde) no fue virulenta, mostrando un 90-100% de larvas vivas tras 72 horas de infección. Los aislados pertenecientes a los clones ST2455, ST274, ST443, ST308, ST379, ST455, ST560 y ST1249 mostraron un comportamiento similar al de esta cepa. Dentro de los ST253, ST179, ST175, ST569, ST260, ST575, ST2238 y ST155 se englobaron aislados con comportamientos similares a los de las cepas *P. aeruginosa* PAO1 y PA7.









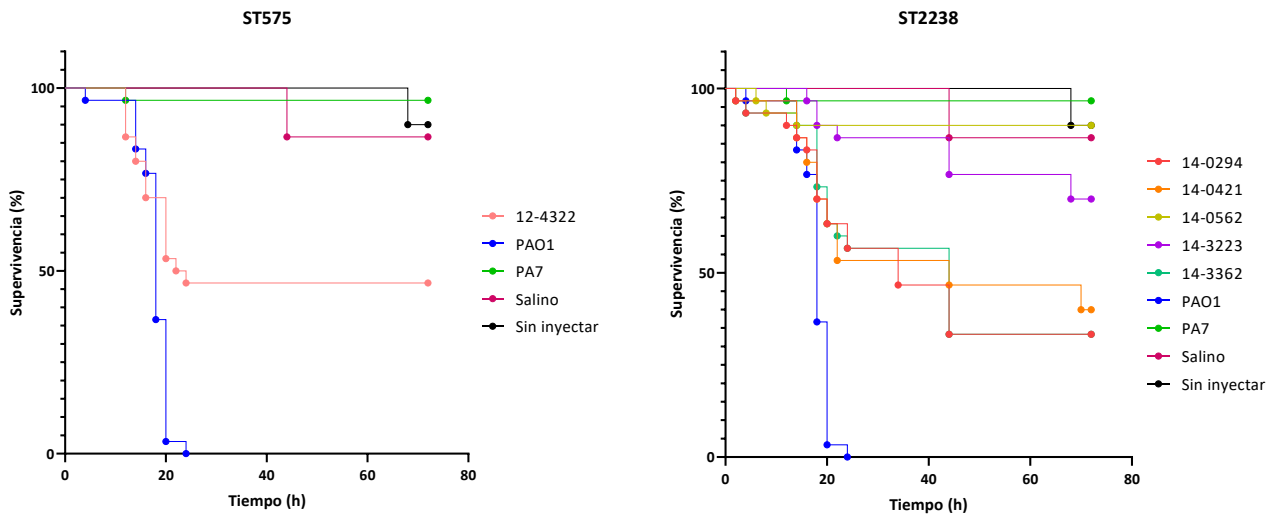


Figura 46. Curvas de Kaplan Meier de supervivencia de *G. mellonella* infectadas con *P. aeruginosa*

5.5. Interacción de *P. aeruginosa* con la línea celular A549

Partiendo de los 79 aislados de *P. aeruginosa* secuenciados (Tabla B1 del Anexo 1), se hizo una selección de manera aleatoria de 24 aislados (Tabla D1 del Anexo 1) para estudiar su interacción con la línea celular A549. Para ello se realizaron infecciones durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se realizó una descripción visual del cultivo y mediante microscopía de inmunofluorescencia se estudió la interacción bacteria-célula. Se observó una mayor adherencia de *P. aeruginosa* a las superficies inertes que a las células, lo cual interfería con los resultados de interacción con la línea celular A549, por lo que no hemos incluido ningún dato de porcentajes de adhesión e internalización, ya que consideramos que estos no eran representativos de la capacidad de adhesión e invasión de los aislados estudiados.

Mediante microscopía confocal observamos los distintos comportamientos de los aislados al interactuar con las células A549, los cuales clasificamos en 3 categorías según el daño celular:

- Categoría 1 (8 aislados): Tras 1 hora de infección se observó que las células estaban en perfecto estado. Los aislados 14-2184, 14-2378, 14-0421 y 14-0652 fueron adherentes y portadores del gen *exoS*, mientras que 12-1371, 14-3223, 12-5984 y 14-0919 fueron invasivos y portadores de los genes *exoS* (3 aislados) y *exoU* (1 aislado).

- Categoría 2 (5 aislados): Transcurrido el tiempo de infección se observó que algunas células habían cambiado su morfología, algunas de ellas presentaban una forma redondeada, indicando cierto daño celular en el citoesqueleto. Se observó muerte celular en un rango aproximado de 20-50%. Los aislados 13-5486, 11-4059, 14-2563 y 13-2772 fueron invasivos, 3 de ellos eran portadores del gen *exoS* y 1 de *exoU*, y el 12-5709 fue adherente y portador de *exoU*.
- Categoría 3 (11 aislados): Tras 1 hora de infección se observó daño celular severo en el citoesqueleto de la célula. La mayoría de los aislados al cabo de ese tiempo habían matado al 100% de las células, sin embargo, en otros casos aún sobrevivía aproximadamente el 30%. Observamos un fenotipo citotóxico, predominando el genotipo *exoU*.

Las imágenes de microscopía de fluorescencia de la Figura 47 muestran ejemplos representativos de los experimentos de interacción bacteria-célula. El citoesqueleto de las células, marcado con faloidina, aparece en verde, el ADN celular, marcado con DAPI, aparece en azul, y el ADN bacteriano, marcado con GFP, aparece en rojo.

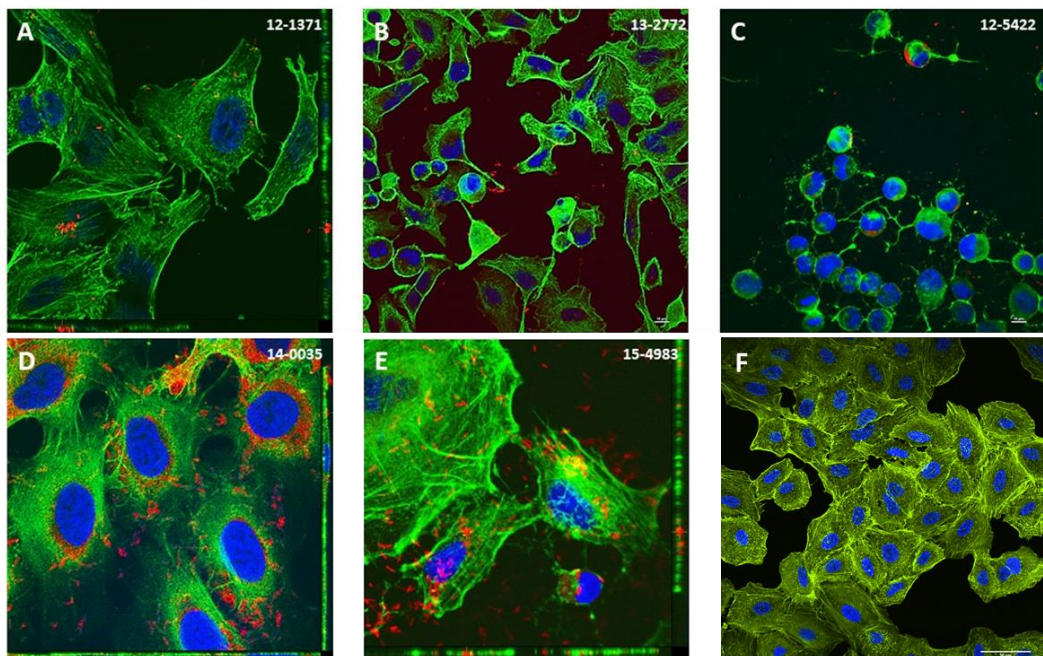


Figura 47. Interacción de *P. aeruginosa* con la línea celular A549. imágenes de microscopía de inmunofluorescencia en las que se puede observar la internalización de *P. aeruginosa* (A, D, E), el daño celular provocado (B, C, E) y un control de las células sin infectar (F).

6. Estudio del T6SS de *P. aeruginosa*

6.1. Ensayo de competitividad bacteriana. Determinación del índice de competitividad y expresión del T6SS

P. aeruginosa, *B. cenocepacia* y *A. xylosoxidans* son los patógenos más comúnmente aislados de pacientes con FQ. Para estudiar la competitividad bacteriana se utilizaron las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y Pae221, *B. cenocepacia* BcJ2315 y *A. xylosoxidans* Ax1203, todas ellas aisladas de pacientes con FQ. En las gráficas de la Figura 48 se muestran los resultados de los experimentos de competitividad bacteriana a las 5 y 24 horas realizados en MHA y con células A549. *P. aeruginosa* presenta conteos de UFC superiores en todos los escenarios. Se calcularon los índices de competitividad de cada bacteria con respecto a *P. aeruginosa*. Este valor está comprendido entre 0 y 1. Un índice de competitividad próximo a 1 supone la imposición de una bacteria sobre el resto. Como se observa en la Tabla 24, en todos los casos el índice de competitividad de *P. aeruginosa* fue próximo a 1, y superando a *B. cenocepacia* y *A. xylosoxidans*.

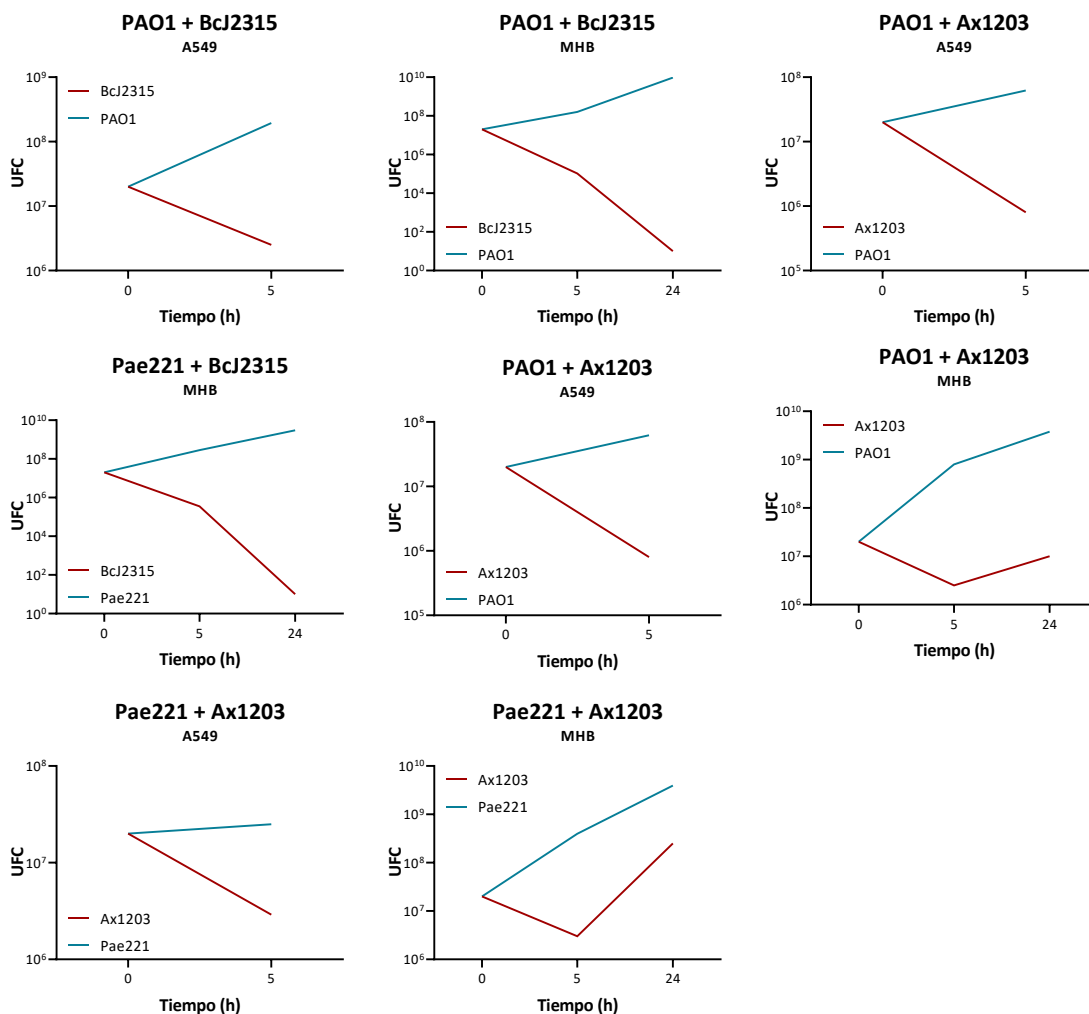


Figura 48. Competitividad bacteriana. *P. aeruginosa* (PAO1, Pae221) vs *B. cenocepacia* (BcJ2315) y *P. aeruginosa* (PAO1, Pae221) vs *A. xylosoxidans* (Ax1203)

Tabla 24. Índice de competitividad

Experimento		Índice de competitividad (0-1)		
		A549 (5h)	MHB (5h)	MHB (24h)
PAO1 + BcJ2315	BcJ2315	0,015	0,0005	0
	PAO1	0,985	0,995	1
Pae221 + BcJ2315	BcJ2315	0,052	0,0005	0
	Pae221	0,948	0,995	1
PAO1 + Ax1203	Ax1203	0,020	0,003	0,002
	PAO1	0,980	0,970	0,980

Experimento		Índice de competitividad (0-1)		
		A549 (5h)	MHB (5h)	MHB (24h)
Pae221 + Ax1203	Ax1203	0,111	0,007	0,176
	Pae221	0,889	0,993	0,824

La expresión del T6SS se estudió durante la competitividad de las 3 bacterias mediante RT-qPCR. Transcurrido el tiempo de infección en células A549 se centrifugó el sobrenadante y se extrajo el ARN del pellet resultante según el protocolo descrito en el apartado X de la sección de Metodología.

En lo referente a los genes de *P. aeruginosa*, durante la competición con *B. cenocepacia*, observamos un aumento considerable en la expresión de *vgrG1b* (2,468), *hcp2* (2,377) e *icmF2* (3,543) en PAO1, y de *tagQ* (2,254), *hcp2* (2,089) y *hsiC2* (2,074) en el caso de Pae221 (Figura 49-A1). Por otro lado, durante la competición con *A. xylosoxidans* se observó un incremento en la expresión de *vgrG1b* (2,925), *icmF2* (1,940) y *hsiC2* (1,719) en PAO1, sin embargo, los genes de Pae221 estaban reprimidos, o en niveles basales (Figura 49-B1). Se observó la sobreexpresión de los genes *tssM1* (2,006) y *hcp1* (1,777) de *B. cenocepacia* al competir con PAO1, sin embargo, los valores de expresión de *tssM1* (8,602) fueron 4 veces mayores al competir con la cepa Pae221 y *hcp1* se mantuvo en un nivel basal (Figura 49-A2). En lo referente a los genes de *A. xylosoxidans*, se observó un incremento en la expresión de *vgrG2* y *tssG* al competir con las cepas PAO1 (3,024 y 11,489, respectivamente) y Pae221 (7,183 y 8,030, respectivamente), sin embargo, el valor de expresión de *vgrG2* fue el doble al competir con Pae221. Se observó también que al competir con Pae221 la expresión de *dotU* se mantuvo en un nivel basal, sin embargo, al competir con PAO1 este gen estuvo reprimido (Figura 49-B2).

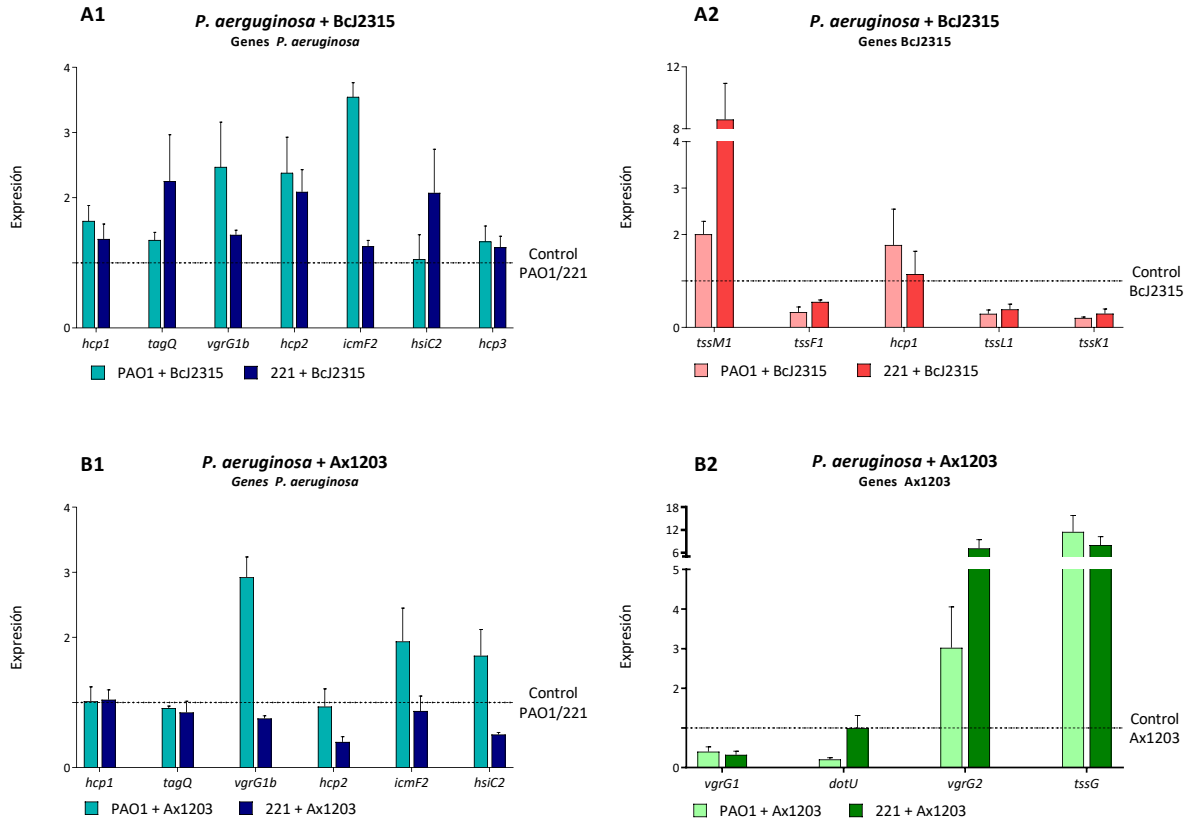


Figura 49. Expresión del T6SS en cultivos mixtos de *P. aeruginosa* y *B. cenocepacia* (A1 y A2) y *P. aeruginosa* y *A. xylosoxidans* (B1 y B2)

6.2. Efecto de metales traza en la expresión del T6SS de *P. aeruginosa*

Estudios clínicos han revelado un incremento en las concentraciones de metales como hierro, cobre y zinc, en los pulmones de pacientes con FQ. Por ello se tuvo un interés especial en reproducir dichas condiciones y estudiar el efecto de hierro, cobre y zinc, a concentraciones fisiológicas, en la expresión del T6SS. Para ello se utilizaron 5 aislados representativos de la colección FQ, las cepas de referencia *P. aeruginosa* PAO1 y Pae221 y la línea celular A549. Tras 5 horas de infección se recogió el sobrenadante y se extrajo el ARN y se estudió la expresión del T6SS mediante RT-qPCR. Se decidió analizar la expresión del T6SS transcurridas 5 horas de infección, puesto que en los experimentos previos que habíamos realizado con la cepa PAO1 observamos que a ese tiempo se registraban los mayores niveles de expresión de los genes analizados, además de obtenerse una concentración óptima de ARN para el análisis de expresión génica.

6.2.1. Hierro

En la Figura 50 se observa la expresión de los genes de T6SS en presencia de hierro (1 $\mu\text{g/ml}$). En el aislado 14-3223 se observó un incremento en la expresión del gen represor *pppA*. Los genes *tagQ*, *vgrG1b*, *icmF2*, *hsiB2* y *vgrG2* mostraron valores de expresión muy próximos al nivel basal en el aislado 12-1251, además de una ligera sobreexpresión en *hcp2* y *hcp3*. Los genes pertenecientes a los clústeres H1 y H2 estuvieron reprimidos o con expresión basal en el aislado 12-1371, sin embargo, se observó un ligero incremento en la expresión de *hcp3*. Los genes de los tres clústeres estuvieron reprimidos o tuvieron expresión basal en el aislado 13-3298, y en el aislado 12-6353 se observó la sobreexpresión de *tagQ*, *icmF2*, *hsiB2*, *vgrG2* y *hcp3*. En lo referente a las cepas de referencia, se observó sobreexpresión de *hcp1*, *tagQ*, *hsiB2* y *hcp3* en la cepa *P. aeruginosa* PAO1, sin embargo, en el caso de la cepa *P. aeruginosa* Pae221 estos genes tenían una expresión basal (*hcp1*, *hcp3*) o estaban reprimidos (*tagQ*, *hsiB2*).

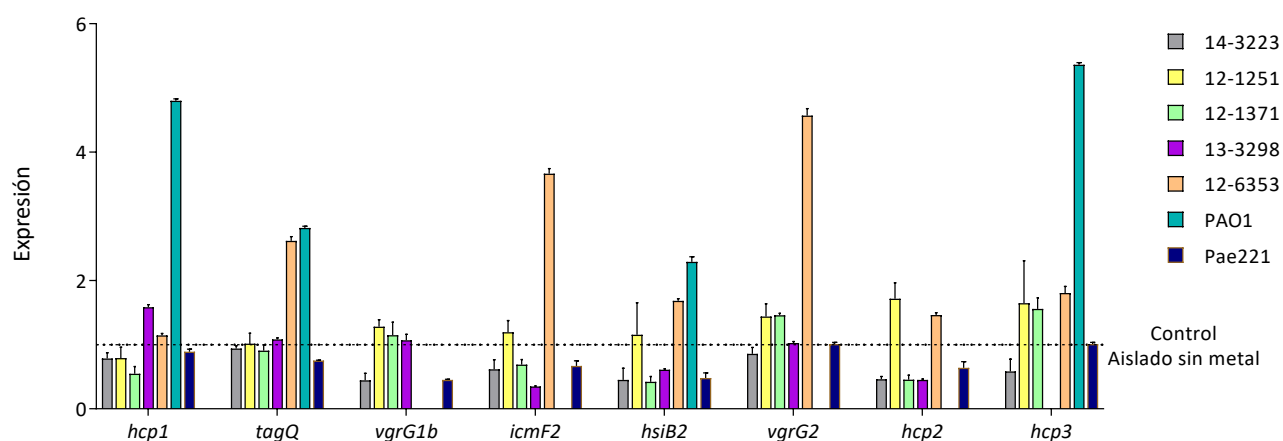


Figura 50. Efecto del hierro (1 $\mu\text{g/ml}$) en la expresión del T6SS

6.2.2. Cobre

Tal y como se observa en la Figura 51, en presencia de cobre (0,2 $\mu\text{g/ml}$) incrementó la expresión de *vgrG2* y *hcp2* en el aislado 14-3223. En los aislados 12-1251 y 12-1371 se observó la sobreexpresión de los genes de los clústeres H2 y H3, y de *hcp1*, *vgrG1b*, *icmF2* y *hsiB2* en el aislado 12-6353. En lo referente a las cepas de referencia, se observó un incremento en la

expresión de *hcp1* y *hcp3* en la cepa *P. aeruginosa* PAO1 y de *hcp1* en la cepa *P. aeruginosa* Pae221.

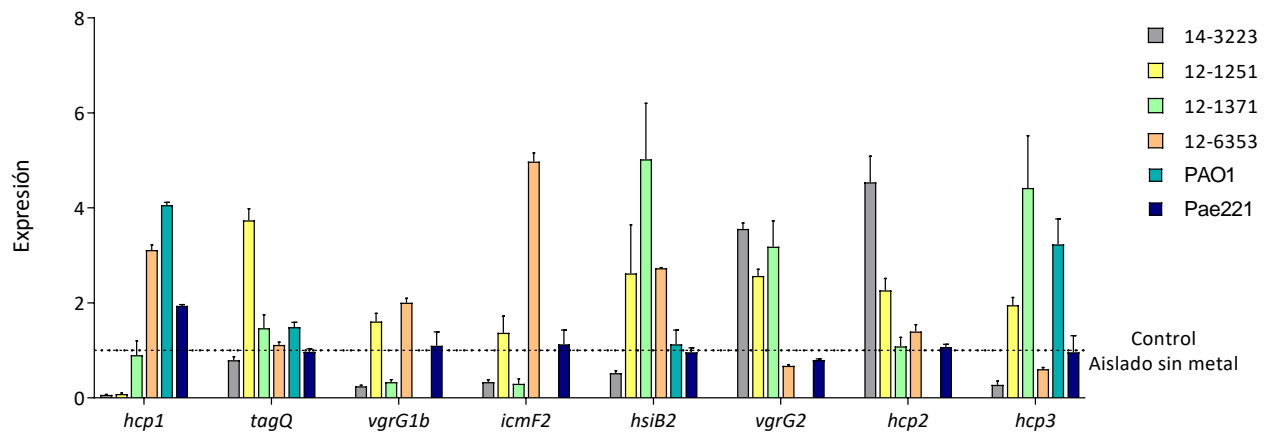


Figura 51. Efecto del cobre (0,2 µg/ml) en la expresión del T6SS

6.2.3. Zinc

Los resultados representados en la Figura 52 indican que en presencia de zinc (1,3 µg/ml) se induce la expresión de *hcp1*, *tagQ* e *icmF2* en el aislado 13-3298, y de *vgrG2*, *hcp2* y *hcp3* en el aislado 12-1251. En lo referente a las cepas de referencia, se observó un incremento en la expresión de *hcp1* e *icmF2* en la cepa *P. aeruginosa* PAO1, sin embargo, los genes de la cepa *P. aeruginosa* Pae221 estuvieron reprimidos, a excepción de *hcp1* y *hcp2* cuya expresión se mantuvo en un nivel basal.

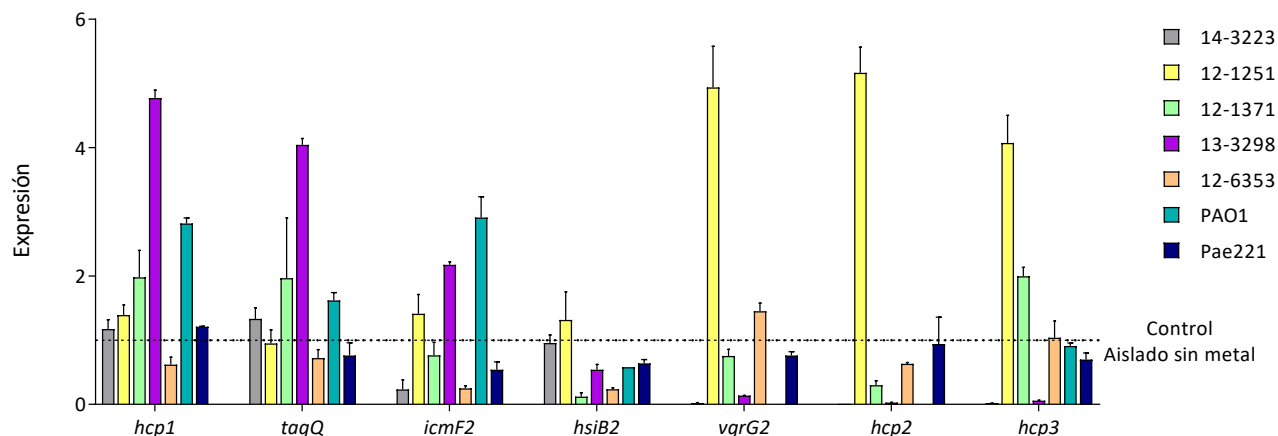


Figura 52. Efecto del zinc (1,3 µg/ml) en la expresión del T6SS

6.3. Efecto de antibióticos a concentraciones subinhibitorias en la expresión del T6SS en *P. aeruginosa*

Bajo la acción de la polimixina B y bajo concentraciones subinhibitorias de kanamicina, se ha visto un incremento en la expresión del H1-T6SS en *P. aeruginosa* (92,134). Por tanto, otro de los objetivos de este trabajo fue determinar el efecto de otros antibióticos a concentraciones subinhibitorias, como gentamicina e imipenem, en la expresión del T6SS de 5 aislados de la colección FQ. Se incluyó además la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 y se utilizó la línea celular A549. Tras 5 horas de infección se recogió el sobrenadante y se extrajo el ARN siguiendo el protocolo descrito en el apartado X de la sección de Metodología y se estudió la expresión del T6SS mediante RT-qPCR.

6.3.1. Gentamicina

En la Figura 53 se representa el efecto de gentamicina (1/4 CMI) en la expresión del T6SS de *P. aeruginosa*. En el aislado 14-3223 se observó un incremento en la expresión de *hcp1*, *vgrG1b*, *vgrG2* y *hcp3*. El aislado 12-1251 tuvo un valor de expresión de *hcp1* 15 veces mayor que el aislado 14-3223. Se observó un ligero incremento en la expresión de *vgrG2* en el aislado 12-1371. En los aislados 13-3298 y 12-6353 se observó sobreexpresión de *icmF2* y *hcp2*, y de *hcp3* en el 12-6353. Finalmente, *vgrG1b* y *hcp2* se sobreexpresaron en la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1.

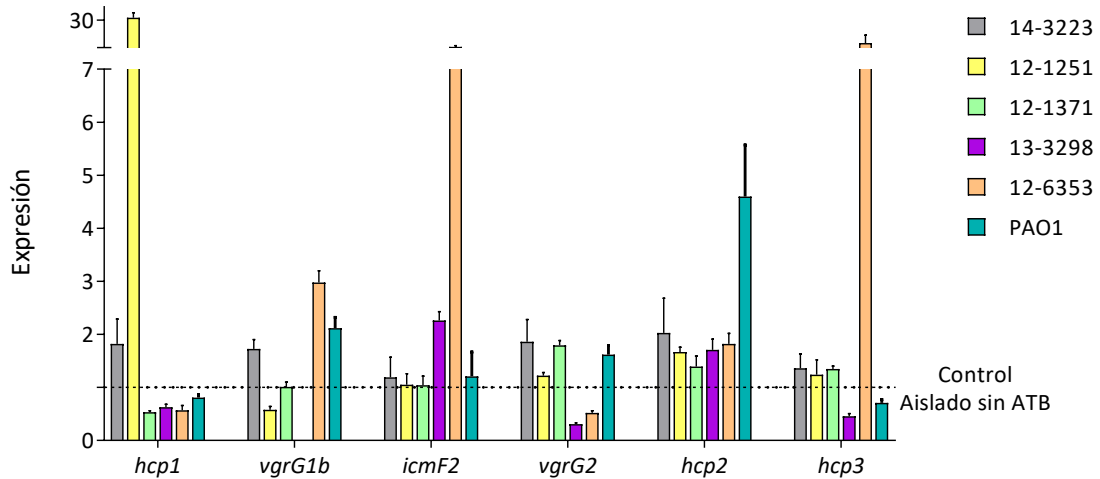


Figura 53. Efecto de gentamicina a concentraciones subinhibitorias (1/4 CMI) en la expresión del T6SS de *P. aeruginosa*

6.3.2. Imipenem

Bajo el efecto de concentraciones subinhibitorias de imipenem, observamos sobreexpresión de *vgrG1b* en el aislado 14-3223, además de un ligero incremento de la expresión con respecto al nivel basal de *vgrG2* en el aislado 12-6353. Se observó la sobreexpresión de *hcp1*, *vgrG1b*, *vgrG2*, *icmF2* y *hcp3* en el aislado 13-3298. Finalmente, en la cepa *P. aeruginosa* PAO1 los genes *hcp2* e *icmF2* se mantuvieron en valores de expresión cercanos al basal (Figura 54).

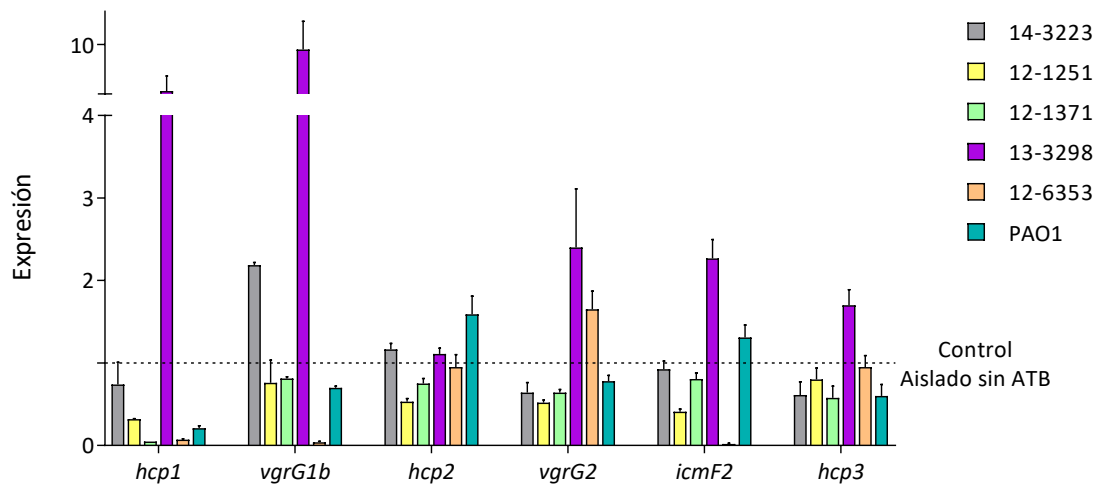


Figura 54. Efecto de imipenem a concentraciones subinhibitorias (1/4 CMI) en la expresión del T6SS de *P. aeruginosa*

DISCUSIÓN

Este trabajo se trata de un estudio retrospectivo descriptivo en el cual hemos analizado 198 aislados de *P. aeruginosa* recolectados en el período de 2007 a 2016. Los aislados procedían de 23 pacientes con FQ (n=123) y 17 pacientes con BNFQ (n=75).

En lo referente al análisis de sensibilidad a antibióticos, nuestros resultados revelaron que todos los aislados fueron intermedios/resistentes a betalactámicos (aztreonam, cefepime, ceftazidima, piperacilina, piperacilina-tazobactam, imipenem) y fluoroquinolonas (levofloxacino y ciprofloxacino), a la vez que mostraban porcentajes de resistencia elevados a aminoglucósidos (gentamicina y tobramicina) y carbapenémicos (meropenem y doripenem). Estos datos concuerdan con diversos estudios que muestran como *P. aeruginosa* es resistente a un elevado número de antimicrobianos (6,19,52,172).

Colistina resultó ser el antibiótico más efectivo frente a los aislados de la colección de FQ (72,3% de aislados sensibles). De manera similar ocurrió en los aislados de pacientes con BNFQ (68% de aislados sensibles). Este antibiótico dejó de emplearse en el tratamiento de infecciones por bacterias gramnegativas debido a su elevada neuro y nefrotoxicidad, pero hoy en día, colistina se utiliza como último recurso en el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa*. La baja resistencia a este antibiótico, se debe en parte, a su uso limitado durante las últimas décadas (6,173). Entre los aislados de pacientes con BNFQ, amikacina mostró la mayor efectividad, con un 80% de aislados sensibles. Este antibiótico es comúnmente utilizado en la clínica para tratar infecciones por *P. aeruginosa* en pacientes con BNFQ (174,175).

Se encontró una amplia diversidad clonal en ambas colecciones. Dentro de la colección de aislados de FQ se encontraron 28 pulsotipos y 14 subtipos, mientras que dentro de la colección de BNFQ se encontraron 16 pulsotipos y 14 subtipos. En este trabajo hemos visto que, de manera general, cada paciente presentaba varios aislados consecutivos de *P. aeruginosa* con un mismo pulsotipo (con sus respectivos subtipos) durante el período de estudio. En trabajos previos se había observado que los pacientes con patologías crónicas, como la FQ, estaban generalmente infectados por una misma cepa de *P. aeruginosa*, la cual persistía durante largos períodos de tiempo. Sin embargo, en algunos casos se encontró que varias cepas, no relacionadas clonalmente, podían coinfectar temporal o permanentemente dichos pacientes (170–173). De manera similar a lo descrito por estos autores, en nuestro estudio encontramos varios pacientes (P10, P11, P15, P31 y P34) donde coexistían o habían coexistido diferentes cepas con pulsotipos y/o secuenciotipos distintos durante un período de tiempo determinado (Tabla 25). El hecho de que varias cepas no relacionadas clonalmente

coincidan en un determinado espacio de tiempo podría llevar a un reemplazamiento total de algunas de ellas o por el contrario a una convivencia estable. Esto conduciría a la persistencia de linajes con características fenotípicas y genotípicas distintas, y por tanto características funcionales diferentes, como las encontradas en algunos de los aislados analizados en nuestro estudio. Estas particularidades han sido descritas previamente en la literatura e incluso se ha visto que en pacientes crónicos infectados con un mismo clon existía una gran diversidad dentro de las cepas genéticamente relacionadas pertenecientes a dicho clon (170).

Tabla 25. Pacientes portadores de aislados con distintos pulsotipos y ST

Paciente	Aislado	Pulsotipo	Perfil de resistencia	ST
P10 (FQ)	08-0034	S	MDR	111
	12-7069	J1	multiS	179
	13-1991	J1	multiS	179
	13-2025	J5	modR	179
	13-2914	J4	multiS	179
	13-4112	J4	multiS	179
	14-2595	J4	MDR	179
	15-7136	J2	modR	179
	15-7350	J3	MDR	179
	P11 (FQ)	12-0805	V	MDR
12-2730		U1	MDR	455
13-2507		U2	MDR	455
13-5486		U1	MDR	455
13-5524		A3	MDR	175
13-5954		A3	MDR	175
P15 (FQ)	13-0950	P	modR	253
	13-2772	Q	multiS	253
	14-3192	B	MDR	175
P31 (BNFQ)	13-4215	HH	multiS	253
	13-5570	FF	modR	252
P34 (BNFQ)	12-2600	GG1	modR	560
	12-5422	GG2	MDR	560
	13-1574	OO	MDR	308

Paciente	Aislado	Pulsotipo	Perfil de resistencia	ST
	13-6203	OO	MDR	308
	13-6427	NN	MDR	111
	13-6712	NN	XDR	111
	13-6750	NN	XDR	111
	13-6787	NN	XDR	111
	14-0074	NN	MDR	111
	14-0116	NN	XDR	111

La gran diversidad encontrada en cepas pertenecientes a un mismo clon (con un mismo pulsotipo y secuenciotipo), como es el caso de los diferentes fenotipos de resistencia mostrados por los aislados estudiados es un claro indicio de la capacidad de adaptación de *P. aeruginosa*. Es bien sabido que a nivel genómico esta bacteria sufre mutaciones puntuales, inserciones e incluso grandes deleciones que conllevan al desarrollo de clados individuales que pueden persistir dentro de ambientes hostiles como el de las vías respiratorias bajas en pacientes con FQ. Aunque, por otro lado, la diversidad clonal en un mismo paciente podría tratarse no de un fenómeno de adaptación, sino de recolonización por otras cepas diferentes adquiridas del ambiente o por transmisión de paciente a paciente.

Hace algunos años existía la creencia de que los pacientes con FQ eran portadores de cepas únicas y que la transmisión entre pacientes estaba restringida al contacto repetido, cercano e íntimo (76). En 1986 se describió el primer estudio de transmisión nosocomial de un clon multirresistente de *P. aeruginosa* en un centro de FQ en Dinamarca (176). Desde entonces han sido numerosos los estudios epidemiológicos donde se demuestra la propagación de clones entre pacientes con FQ (76). Cabe destacar que en nuestro estudio hemos encontrado indicios de transmisión de cepas de relacionadas clonalmente, no solo entre pacientes con FQ, sino también entre pacientes con FQ y BNFQ. Tal es el caso de los aislados pertenecientes al pulsotipo A, secuenciotipo ST175. Como bien se detalló en el apartado de Resultados, este pulsotipo contiene los subtipos A1-A9, representados por 47 aislados provenientes de 7 pacientes (2 de FQ y 5 de BNFQ) (Tabla 26). Los aislados pertenecientes a los subtipos A2 y A3 fueron los más comunes entre los diferentes pacientes. A pesar de no tener acceso al historial clínico de estos pacientes y no saber la relación existente entre ellos (si son familia, pertenecen a un mismo entorno, si estuvieron ingresados en habitaciones contiguas, etc.), si es evidente que existe una relación clonal entre estos aislados, pudiéndose interpretar como un brote,

corroborando la capacidad de transmisión entre pacientes y el papel de *P. aeruginosa* como responsable de infecciones nosocomiales (34,76,177). El ST175 de *P. aeruginosa* está considerado como uno de los principales clones responsables de contaminaciones en ambientes hospitalarios y colonizadores de las secreciones respiratorias de pacientes con FQ. Además en los últimos años su aparición es cada vez más frecuente en varias regiones de Europa central (178). En este trabajo pudimos comprobar que este secuenciotipo era el más prevalente en la colección de aislados de BNFQ (52%). No obstante, en la literatura no hay muchos estudios donde se reporte la prevalencia de este secuenciotipo en BNFQ.

Tabla 26. Distribución de los subtipos del pulsotipo A entre los aislados pertenecientes a ambas colecciones

Paciente	Aislado	Pulsotipo	Perfil de resistencia	ST
P9 (FQ)	10-5351	A4	modR	175
	10-6523	A2	modR	175
	10-6529	A2	modR	175
	11-0928	A2	MDR	175
	11-2731	A2	modR	175
	11-5752	A2	MDR	175
	12-0560	A1	MDR	175
	12-1268	A2	MDR	175
	12-5123	A1	MDR	175
	12-5803	A2	MDR	175
	13-2464	A2	MDR	175
P11 (FQ)	13-5524	A3	MDR	175
	13-5954	A3	MDR	175
P26 (BNFQ)	13-0541	A3	MDR	175
	13-0584	A3	MDR	175
	13-0679	A3	MDR	175
	13-0772	A3	MDR	175
	13-0821	A3	MDR	175
	13-0947	A3	MDR	175
	13-1039	A3	MDR	175
	13-1070	A3	MDR	175

Paciente	Aislado	Pulsotipo	Perfil de resistencia	ST
	13-1131	A3	MDR	175
	13-1224	A3	MDR	175
	13-1225	A3	MDR	175
	13-1242	A3	MDR	175
	13-1295	A3	MDR	175
	13-1456	A7	MDR	175
	13-1652	A9	MDR	175
	13-1791	A9	XDR	175
	13-1811	A8	MDR	175
	13-2342	A7	MDR	175
P27 (BNFQ)	14-3875	A5	MDR	175
	14-3952	A5	MDR	175
P30 (BNFQ)	14-4018	A3	MDR	175
P32 (BNFQ)	12-0881	A2	MDR	175
	12-7117	A2	MDR	175
	13-5505	A3	MDR	175
	13-5576	A6	MDR	175
	13-5574	A3	MDR	175
	13-5832	A3	MDR	175
	13-5857	A6	MDR	175
P40 (BNFQ)	13-6422	A8	XDR	175
	13-6710	A7	MDR	175
	14-0084	A8	XDR	175
	14-0613	A8	XDR	175
	14-0741	A8	MDR	175
	14-0867	A8	MDR	175

Es alarmante la evidencia de la existencia de cepas epidémicas MDR/XDR de *P. aeruginosa* ampliamente diseminadas a nivel internacional, denominadas clones de alto riesgo, y que han sido cruciales en la expansión de la resistencia a nivel mundial (179). La técnica de MLST permite tipificar molecularmente nuestras cepas y compararlas con los clones epidémicos y ambientales distribuidos al rededor del mundo (76,180). Hasta el 13 de diciembre de 2020 habían 3572 ST registrados en la base de datos PubMLST. Entre los clones

de alto riesgo diseminados por todo el mundo, los secuenciotipos ST111, ST175 y ST235 son las predominantes, normalmente asociadas con cepas MDR, resistentes a carbapenémicos y/o productoras de MBL (77,181,182).

El 66,7% (n=82) de los aislados de la colección FQ y el 85,3% (n=46) de BNFQ fueron clasificados como MDR/XDR. Como se mencionó anteriormente, en nuestro estudio encontramos una alta prevalencia de aislados pertenecientes al clon epidémico de alto riesgo ST175 en la colección de BNFQ (n=39, 52%), pero también, aunque en menor medida entre los aislados de FQ (n=14, 11,4%). Otro de los clones epidémicos de alto riesgo encontrados en ambas colecciones fue el ST111, presente en 6 aislados (8%) de un único paciente con BNFQ y en un aislado de un paciente con FQ. La mayoría de estos aislados presentaban perfiles MDR/XDR y eran resistentes a carbapenémicos, especialmente a imipenem. El ST235 no fue encontrado en ningún aislado de la población estudiada.

Según la base de datos PubMLST, hay ST presentes en al menos 3 continentes, conocidos como ST intercontinentales, los cuales son importantes desde el punto de vista clínico-epidemiológico dada su diseminación global. En este trabajo se identificaron los ST intercontinentales ST17, ST155, ST179, ST198, ST252, ST253, ST274, ST308, ST313, ST446, ST455, ST560 y ST569. Los clones ST17 y ST253 son lo más abundantes entre *P. aeruginosa* a nivel mundial, siendo identificados tanto en cepas clínicas humanas y animales, como en cepas ambientales. Por lo general el ST17 no es frecuente en cepas de pacientes de FQ, lo que sugiere un limitado potencial de transmisión (76,183). Consistente con esta afirmación, en nuestro estudio encontramos un solo aislado perteneciente al ST17 (13-3150), caracterizado como MDR, procedente de un paciente con BNFQ.

El secuenciotipo ST253, propio de la cepa *P. aeruginosa* PA14, fue el más comúnmente encontrado entre los aislados de FQ, junto con el antes mencionado clon de alto riesgo ST175, representado en las dos colecciones de aislados de *P. aeruginosa* aquí analizadas. El ST253 está también considerado un clon de alto riesgo y se suele encontrar con similar frecuencia tanto en infecciones humanas agudas como crónicas (184). El llamado clon epidémico internacional ST274 (complejo clonal CC274), fue el segundo más representado (junto con el ST175) en la colección de aislados de FQ. El ST274-CC274, aunque no está considerado un clon de alto riesgo, se aísla frecuentemente de pacientes con FQ, pero también de otras patologías no relacionadas con la FQ (177). Los secuenciotipos ST253 y ST274 se han descrito en aislados de *P. aeruginosa* tanto sensibles como resistentes a carbapenémicos (185). En concordancia con

esto, todos los aislados de nuestro estudio pertenecientes al ST274 fueron resistentes o intermedios a imipenem, meropenem y doripenem. Los 27 aislados pertenecientes al ST253 fueron resistentes o intermedios a imipenem, 8 de estos aislados fueron resistentes o intermedios a meropenem y 11 a doripenem (Tabla 27).

Tabla 27. Resistencia a carbapenémicos de los aislados pertenecientes a los clones ST274 y ST253

Aislado	ST	IMP		MER		DOR	
14-2158	274	8	R	8	I	8	I
14-2184	274	64	R	64	R	>64	R
14-2375	274	64	R	64	R	>64	R
14-2378	274	32	R	16	R	32	R
15-4070	274	>64	R	32	R	32	R
15-4414 A	274	32	R	32	R	32	R
15-4414 B	274	>64	R	64	R	32	R
15-4414 C	274	>64	R	64	R	32	R
15-4414 D	274	32	R	16	R	16	R
15-4584	274	>64	R	64	R	64	R
15-4623	274	>64	R	64	R	64	R
15-4652	274	>64	R	64	R	32	R
15-4749	274	0,125	I	0,25	I	0,25	I
15-5000	274	8	R	4	I	4	I
14-2430	253	0,125	I	0,06	S	0,06	S
08-6072	253	≤0,06	I	0,125	S	≤0,06	S
08-6073	253	1	I	2	S	1	S
11-0708	253	0,5	I	0,125	S	0,125	S
11-1195	253	0,5	I	0,25	S	0,25	S
11-1196	253	16	R	8	I	4	I
12-0129	253	8	R	2	S	2	S
12-1127	253	16	R	4	I	4	I
12-1128	253	32	R	32	R	16	R
12-1159	253	2	I	2	S	1	S
12-1251	253	16	R	32	R	16	R

Aislado	ST	IMP		MER		DOR	
12-1345	253	1	I	1	S	1	S
12-1346	253	16	R	4	I	16	R
12-1575	253	64	R	4	I	8	I
12-1634	253	32	R	2	S	8	I
12-1662	253	32	R	2	S	8	I
12-1802	253	64	R	32	R	32	R
12-5088 R	253	16	R	4	I	4	I
12-6265	253	0,5	I	2	S	2	S
12-6304	253	0,5	I	2	S	2	S
13-0828	253	0,5	I	1	S	0,5	S
13-1575	253	2	I	1	S	4	I
13-0950	253	0,25	I	0,25	S	0,125	S
13-2772	253	0,25	I	0,125	S	0,125	S
12-5984	253	1	I	0,25	S	0,06	S
13-4215	253	1	I	0,5	S	0,5	S
13-1058	253	2	I	0,5	S	0,5	S

IMP: Imipenem, MER: Meropenem, DOR: Doripenem, S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente.

Otros de los clones de alto riesgo detectados en nuestro estudio fue el ST155, en seis aislados de un paciente con FQ. Según la base de datos PubMLST (153), las cepas pertenecientes al ST155 se aíslan tanto de muestras clínicas como ambientales y se encuentran ampliamente diseminadas por el mundo, incluyendo Australia, Canadá, Francia, Rusia, Senegal y España. Un estudio reciente reveló que las cepas pertenecientes este clon eran resistentes a carbapenémicos (imipenem y meropenem), betalactámicos (piperacilina, ceftazidima y cefepime), aminoglucósidos (gentamicina y tobramicina) y ciprofloxacino, sin embargo sensibles a aztreonam, ceftazidima/avibactam y colistina (186). En concordancia con lo descrito, nuestros aislados del ST155 fueron sensibles a colistina y resistentes a ciprofloxacino, sin embargo, fueron intermedios a aztreonam, al igual que a los betalactámicos e imipenem. De estos 6 aislados, 4 fueron sensibles a meropenem y 5 a gentamicina, mientras que todos fueron sensibles a tobramicina (en rojo en la Tabla 28).

Tabla 28. CMI ($\mu\text{g/ml}$) de los aislados pertenecientes al ST155

Aislado	AZT	FEP	CAZ	PIP	IMP	MER	GEN	TOB	CIP	COL
13-3298	<0,125/I	8/I	0,125/I	0,5/I	2/I	0,125/S	2/S	0,125/S	0,5/I	0,5/S
13-3363	0,5/I	32/R	1/I	1/I	4/I	0,25/I	16/R	2/S	1/R	2/S
13-3423	1/I	16/R	2/I	8/I	4/I	0,5/S	8/S	2/S	1/R	2/S
13-3477	0,5/I	4/I	0,25/I	1/I	1/I	0,125/S	0,5/S	0,06/S	2/R	0,5/S
13-3753	0,25/I	1/I	0,25/I	0,5/I	1/I	0,125/S	0,25/S	0,06/S	4/R	0,125/S
13-5627	0,25/I	2/I	0,125/I	1/I	2/I	0,25/I	2/S	<0,06/S	1/R	0,25/S

*AZT: Aztreonam, FEP: Cefepime, CAZ: Ceftazidima, PIP: Piperacilina, IMP: Imipenem, MER:

Meropenem, GEN: Gentamicina, TOB: Tobramicina, CIP: Ciprofloxacino, COL: Colistina.

**S: Sensible, I: Intermedio, R: Resistente.

Hasta hace poco el ST308 no se consideraba un clon de alto riesgo debido a la poca frecuencia de brotes en pacientes, sin embargo, hoy en día se le considera como un clon de alto riesgo productor de MBL de tipo GES, IMP y VIM. Esto se debe a la detección de contaminaciones con cepas resistentes a carbapenémicos en instalaciones hospitalarias, lo que crea un reservorio para la contaminación a pacientes. Durante 3 años se detectó un brote de cepas MDR, productoras de IMP-8 en la unidad de hematología oncológica en un hospital alemán. De igual manera, en un hospital francés se detectó un brote en pacientes durante 5 años que persistió en el ambiente durante 4 más, causando infecciones esporádicas (187,188). Entre los aislados de nuestro estudio, se encontraron 2 (13-1574 y 13-6203) pertenecientes al clon ST308, ambos con un fenotipo MDR y resistentes a carbapenémicos.

Los clones ST179, ST252, ST560, ST569, ST313, ST198, ST446 y ST455 se han descrito con anterioridad en muestras clínicas, como orina, sangre y esputo de pacientes con FQ y BNFQ y lavados broncoalveolares (según la base de dato PubMLST). Los secuenciotipos ST252, ST560 y ST313 se han encontrado además en ríos, piscinas o ambientes húmedos (189). Nuestros resultados mostraron que los ST252, ST560 y ST313 fueron característicos de pacientes con BNFQ. El ST252 se encontró en un aislado (13-5570) con fenotipo modR, el ST560 englobó 2 aislados con fenotipos modR (12-2600) y MDR (12-5422), y el ST313 fue característico de 6 aislados (13-6556, 13-6586, 13-6692, 13-6711, 13-6745 y 14-0035) MDR. El ST569 se encontró en 4 aislados (12-6547, 14-2559, 14-2563 y 15-4983) con fenotipo MDR procedentes de dos pacientes con FQ.

El clon de alto riesgo ST179 fue común a ambas colecciones. Agrupó los aislados 12-7069, 13-1991, 13-2914 y 13-4112, caracterizados como multiS, 13-2025, 15-7136, 12-2603 y 12-3870, caracterizados como modR, y 14-2595 y 15-7350 caracterizados como MDR. El aislado 14-1716, catalogado como modR y proveniente de un paciente de FQ, perteneció al ST198, y el aislado 12-5709, catalogado como MDR y proveniente de un paciente de FQ, perteneció al clon de alto riesgo ST446. Finalmente, el clon ST455 englobó los aislados 12-0805, 12-2730, 13-2507 y 13-5486, provenientes de un paciente de FQ.

Uno de los hallazgos interesantes de este trabajo fue la descripción por primera vez un secuenciotipo nuevo, el ST3449, en un único paciente con FQ. Este ST agrupaba los aislados 12-5802, 12-5808, 12-6355, 12-6466 y 12-6494, pertenecientes al pulsotipo G y con un perfil de resistencia MDR, a excepción del aislado 12-6466, caracterizado como modR. Todos estos aislados a pesar de haberse encontrado en un único paciente y ser colectados de manera consecutiva en un período de tiempo muy corto, mostraron una gran diferencia de fenotipos entre ellos, que iban desde diferente morfología colonial, capacidad de producción de biofilm, diferencias en la pigmentación, producción de hemólisis, así como en sus perfiles de resistencia a los antibióticos. Todo esto corrobora lo mencionado anteriormente sobre la gran diversidad de cepas que pueden existir dentro de un mismo clon en un determinado nicho como es el pulmón del paciente con FQ.

❖ **Análisis del resistoma de *P. aeruginosa***

Tras largos tratamientos con antibióticos en pacientes con FQ, *P. aeruginosa* desarrolla resistencia a la mayoría de estos. Además, estos tratamientos prolongados conllevan a la selección de cepas hipermutadoras que, de manera indirecta, favorecen esta resistencia. La secuenciación masiva permite determinar el resistoma mutacional de *P. aeruginosa* y entender la evolución de los mecanismos de resistencia (34). Por ello, uno de nuestros objetivos fue secuenciar el genoma completo de aislados de *P. aeruginosa* representativos de las dos colecciones estudiadas. Para llevar a cabo este análisis se seleccionaron 79 aislados que abarcaban los diferentes pulsotipos y secuenciotipos encontrados en la población estudiada y se detectó la presencia de genes de resistencia adquiridos y mutaciones en genes intrínsecos que confieren resistencia a un amplio rango de antibióticos.

La hiperproducción de AmpC por mutaciones en los genes reguladores *ampD*, *ampDh2*, *ampDh3* y *ampR*, en PBP (principalmente PBP4), es la causa más frecuente en

resistencia a betalactámicos, incrementando los valores de CMI de ceftazidima, cefepime, piperacilina y aztreonam (141,169,190,191).

Al igual que lo descrito por Cabot y colaboradores (141), todos los aislados pertenecientes al ST175, mostraron una secuencia de *ampC* idéntica a la de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1. T₁₀₅A fue la sustitución aminoacídica mayoritaria entre los aislados resistentes a betalactámicos, sin embargo, Berrazeg y colaboradores (192) demostraron que esta sustitución, junto con G₂₇D, R₇₉Q, L₁₇₆R, V₂₀₅L y G₃₉₁A, encontradas en los aislados de este estudio y descritas en la Tabla 14, no se relacionaban con la resistencia a betalactámicos. En los aislados 08-6073, 11-1196, 12-1127, 12-1159, 12-1251, 12-1345, 12-1346, 12-1802, 13-1575, 12-5984, 13-4215 y 13-1058, pertenecientes al ST253, y 12-3148, perteneciente al ST312, se encontró la sustitución Q₁₅₅R en AmpC, relacionada con la resistencia a betalactámicos, según lo descrito por Subedi y colaboradores (193). En los aislados 13-2077, 13-3189, 13-4111, pertenecientes al ST1249, 12-3148, perteneciente al ST312, 13-6203, perteneciente al ST308 y 14-0035, perteneciente al ST313, se encontró la sustitución V₃₅₆I en AmpC, relacionada con la resistencia a betalactámicos, según lo descrito por Berrazeg y colaboradores (192). La mutación V₂₃₉A en AmpC se relaciona con una alta resistencia a ceftazidima en cepas clínicas (194), y se encontró en los aislados 13-2507 (ST455) y 13-5486 (ST455), ambos con valores de CMI ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$. AmpC estuvo ausente en los aislados de FQ 12-6304, 13,0950 y 13-2772 con secuenciotipo ST253 y no susceptibles a betalactámicos y carbapenémicos.

La inactivación de AmpD y sus homólogos AmpDh2 y AmpDh3 se debe, por lo general, a inserciones o deleciones puntuales que alteran el marco de lectura y a codones de parada prematuros. El gen *ampD* estuvo ausente en 17 aislados de nuestro estudio. En 44 aislados se encontraron cambios aminoacídicos, siendo G₁₄₈A y D₁₈₃Y los más frecuentes, sin embargo estos polimorfismos se han visto en cepas salvajes, y por lo tanto no se relacionan con la sobreexpresión de *ampC* (141). En los aislados 13-5524, 13-1070, 13-1791, 13-5832, 13-5857 y 14-0867, pertenecientes al ST175, se encontró el polimorfismo T₁₃₉M, descrito con anterioridad como responsable de la sobreexpresión de AmpC (167). En el aislado 12-5984, perteneciente al ST253, se encontró la deleción de los primeros 7 nucleótidos en *ampDh2*, y en 14-1716 y 14-0035 se encontraron las sustituciones V₈₉D y G₅₉D, sin embargo, no hay evidencia que los relacione con la sobreexpresión de AmpC. La inserción de un nucleótido de citosina entre las posiciones 42 y 43 alteró el marco de lectura de *ampDh3* en los aislados 12-1127 y 12-1346, ambos pertenecientes al ST253. Se encontraron diversos polimorfismos en AmpDh3

de los cuales no encontramos evidencia en la literatura que los relacione con la sobreexpresión de AmpC, por lo que se requieren estudios adicionales que nos permitan determinar su papel en la resistencia a betalactámicos. El polimorfismo mayoritario fue A₂₁₉T, encontrado en 38 aislados, pertenecientes a los ST17 (n=1), ST111 (n=2), ST155 (n=4), ST175 (n=14), ST179 (n=6), ST198 (n=1), ST252 (n=1), ST260 (n=2), ST293 (n=1), ST447 (n=1), ST455 (n=3), ST2360 (n=1) y ST3449 (n=1). Otras sustituciones encontradas fueron D₂₃₅G en los aislados 07-2043, 11-4059, 12-1371 y 12-1767, pertenecientes al ST443, A₃₇T en 12-5970, perteneciente al ST447, D₇₅G en los aislados 12-2600 y 12-5422, pertenecientes al ST560, R₁₈₀L en el aislado 15-6548, perteneciente al ST379 y V₁₉M en el aislado 14-0919, perteneciente al ST293.

En 31 aislados, de los 79 analizados, encontramos mutaciones en AmpR, siendo las sustituciones E₁₁₄A, G₂₈₃E y M₂₈₈R, descritas en la Tabla 14, las más frecuentes. En los estudios de Subedi y colaboradores, estas mutaciones estaban presentes en todos los aislados resistentes a betalactámicos, a excepción de uno, sensible a cefepime y ceftazidima, con valores de CMI=4 µg/ml y CMI=2 µg/ml (193). Cabe destacar que ese estudio se llevó a cabo en el año 2016, año en el que el EUCAST agrupaba esos puntos dentro de la categoría sensible, sin embargo, a día de hoy, el EUCAST recoge esos valores como intermedios (195). Es por ello, que podríamos suponer que estas mutaciones estén implicadas en la sobreexpresión de AmpC, y, por ende, contribuyan a la resistencia a betalactámicos. Según lo descrito por Cabot y colaboradores (26,167), la mutación G₁₅₄R en AmpR incrementa drásticamente la expresión basal de *ampC*, confiriendo resistencia a betalactámicos. Esta mutación es propia de cepas multirresistentes pertenecientes al clon ST175, y se ha visto que en combinación con la inactivación de la porina OprD, por un codón de parada prematuro en la posición 142, incrementa la persistencia de cepas XDR del clon ST175 en hospitales españoles (196). El aislado 12-6599 presentó ambos polimorfismos, a la vez que estaba catalogado como MDR y pertenecía al clon ST175.

Mas allá de la presencia de betalactamasas, las PBP juegan un papel importante en la resistencia a betalactámicos, particularmente las alteraciones en el gen *ftsI*, codificante de PBP3. PBP3 es una proteína de alto peso molecular con actividad transpeptidasa, y según estudios *in vivo* en pacientes de FQ e *in vitro*, esta proteína está bajo una constante presión mutacional, con sustituciones específicas en sus dominios, como R₅₀₄C/H y F₅₃₃L, que impiden el enlace PBP-betalactámico (34,167,194,196). En los aislados 13-5486, perteneciente al ST455, 13-5524, 14-3192, 13-1070, 13-1456, 13-1791, 14-3875, 12-6599, 13-5832, 13-5857 y 14-0867, pertenecientes al ST175, se encontró la sustitución R₅₀₄C. Las mutaciones en *dacB*, codificante

de PBP4, se relaciona con la sobreexpresión de AmpC. En 15 aislados pertenecientes al ST253 se encontró la sustitución Q₁₅₆H y en 7 aislados con los secuenciotipos ST274 (n=2), ST198 (n=1), ST569 (n=3) y ST252 (n=1) se encontró la sustitución A₃₉₄P, sin embargo no se relacionan con la hiperexpresión de AmpC (197). En los aislados 12-0805, 13-2507, 13-5486, con secuenciotipo ST455, y 13-3753, secuenciotipo ST155, se encontraron las sustituciones T₂₀A, V₆₆A, T₄₀₈A y G₄₄₄D en DacB, de las cuales no tenemos evidencia de su papel en la resistencia a betalactámicos.

Se encontraron también polimorfismos en otras PBP de alto (PBP1a, PBP1b, PBP2) y bajo (PBP5 y PBP6/7) peso molecular, descritas con anterioridad en la Tabla 15, pero su relación con la resistencia a betalactámicos aún requiere ser demostrada (196).

Entre las betalactamasas descritas en *P. aeruginosa* se encuentran las tipo OXA (oxacilinasas), llamadas así inicialmente por su elevada capacidad hidrolítica sobre oxacilina y cloxacilina. En nuestro estudio hemos detectado la presencia del gen *bla*_{OXA-50} en 69 aislados, pertenecientes a los ST17 (n=1), ST111 (n=2), ST155 (n=4), ST175 (n=13), ST179 (n=5), ST198 (n=1), ST252 (n=1), ST253 (n=7), ST260 (n=2), ST274 (n=2), ST293 (n=1), ST308 (n=1), ST312 (n=1), ST313 (n=1), ST379 (n=2), ST443 (n=4), ST446 (n=1), ST447 (n=1), ST455 (n=3), ST560 (n=2), ST569 (n=3), ST1249 (n=3), ST1399 (n=1), ST2238 (n=5), ST2360 (n=1), ST3449 (n=1). Se ha visto que la oxacilinasas OXA-50 no contribuye significativamente a la resistencia a betalactámicos, sin embargo tiene un efecto leve en la hidrólisis de cefalosporinas (cefepime), penicilinas y carbapenémicos (imipenem y en menor medida meropenem) (198). Entre los aislados portadores de OXA-50 detectados en este estudio se encontraban cepas tanto resistentes, como con intermedias a los agentes antimicrobianos antes mencionados. Las oxacilinasas OXA-395, OXA-396, OXA-486 y OXA-488, pertenecientes a la familia de OXA-50 (199), fueron detectados en 3, 15, 3 y 14 aislados, respectivamente. Por otra parte, OXA-46, una oxacilinasas de la familia de OXA-2 con actividad hidrolítica sobre cefalosporinas y penicilinas (200), fue detectada en los aislados 14-0116 (resistente a cefepime, ceftazidima y piperacilina) y 13-2025 (resistente a cefepime e intermedio a ceftazidima y piperacilina), pertenecientes a los clones de alto riesgo ST111 y ST179, respectivamente.

Los carbapenémicos son los antibióticos betalactámicos con el espectro de actividad más amplio, a pesar de ello, con el paso de los años se ha observado un incremento en el número de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a estos antibióticos. Las mutaciones que sufre la porina OprD son la causa más frecuente de resistencia a carbapenémicos, fundamentalmente

a imipenem y en menor medida a meropenem y doripenem (43,141,167,172,194). OprD es una proteína de 420 aminoácidos, compuesta por 16 láminas beta antiparalelas y 8 *loops*. Los *loops* L2 y L3 están implicados en el paso de imipenem, por lo que alteraciones en estas regiones pueden suponer la resistencia a este antibiótico. Un total de 24 aislados (Tabla 16), tanto resistentes como intermedios a carbapenémicos, presentaron mutaciones en estas regiones (T₁₀₃S, K₁₁₅T, F₁₇₀L), sin embargo, estos polimorfismos ya se habían descrito con anterioridad en cepas sensibles y resistentes a imipenem (48,172,201). No todas las alteraciones en OprD están implicadas en la resistencia a imipenem. Según lo descrito por Epp y colaboradores (47), si bien el acortamiento del *loop* L7 produce un ensanchamiento de la porina, permitiendo el paso de meropenem e incrementando la sensibilidad al mismo, esta alteración se ha encontrado también en cepas resistentes a este antibiótico (48,172,201). En concordancia con esta afirmación, 33 aislados (Tabla 29) presentaron el acortamiento de L7, de los cuales 7 presentaron valores de CMI para meropenem superiores a 32 µg/ml.

Tabla 29. Aislados resistentes a carbapenémicos con mutaciones que afectan los *loops* L2, L3 y L7 en la porina OprD

Aislado	ST	CMI (µg/ml)			Loop afectado
		IMP	MER	DOR	
14-2158	274	8	8	8	L7
14-2184	274	64	64	>64	L7
14-0294	2238	4	1	1	L2, L3
14-0421	2238	2	2	2	L2, L3
14-0652	2238	1	0,5	0,5	L2, L3
14-3223	2238	2	0,5	1	L2, L3
14-3362	2238	1	0,25	1	L2, L3
08-6073	253	1	2	1	L2, L3
11-1196	253	16	8	4	L2, L3
12-1127	253	16	4	4	L2, L3
12-1159	253	2	2	1	L2, L3
12-1251	253	16	32	16	L2, L3
12-1345	253	1	1	1	L2, L3
12-1346	253	16	4	16	L2, L3
12-1802	253	64	32	32	L2, L3

Aislado	ST	CMI ($\mu\text{g/ml}$)			Loop afectado
		IMP	MER	DOR	
07-2043	443	8	4	4	L7
11-4059	443	2	0,125	0,125	L7
12-1371	443	2	0,5	2	L7
12-1767	443	1	0,25	0,5	L7
12-0560	175	0,25	0,06	0,125	L7
12-5803	175	0,5	0,5	1	L7
08-0034	111	4	0,5	0,5	L7
14-2595	179	4	1	0,5	L7
15-7136	179	32	4	8	L7
12-0805	455	32	16	16	L2, L3
13-3298	155	2	0,125	0,25	L7
13-3423	155	4	0,5	1	L7
13-3753	155	1	0,125	0,25	L7
13-5627	155	2	0,25	1	L7
12-6353	260	1	0,25	0,125	L7
13-0950	253	0,25	0,25	0,125	L2, L3
13-2772	253	0,25	0,125	0,125	L2, L3
12-5984	253	1	0,25	0,06	L2, L3
14-0919	293	0,25	0,25	0,06	L7
12-6494	3449	4	2	2	L7
12-5709	446	16	4	2	L2, L3
13-0865	260	>64	>64	64	L7
14-2563	569	0,5	0,25	0,25	L7
15-7690	379	8	2	1	L2, L3
15-0788	1399	0,5	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	L2, L3
12-2603	179	16	2	1	L7
12-3870	179	1	0,06	0,125	L7
13-1070	175	32	32	32	L7
13-1456	175	32	32	32	L7
13-1791	175	8	8	8	L7
12-3148	312	4	0,125	0,5	L7

Aislado	ST	CMI ($\mu\text{g/ml}$)			Loop afectado
		IMP	MER	DOR	
13-4215	253	1	0,5	0,5	L2, L3
13-5570	252	2	0,5	0,25	L7
12-7117	175	1	1	1	L7
13-1058	253	2	0,5	0,5	L2, L3
12-2600	560	2	0,25	0,25	L7
12-5422	560	2	32	0,25	L7
13-6203	308	8	16	8	L2, L3
12-5970	447	16	8	32	L2, L3
13-3150	17	1	2	0,25	L7
13-5832	175	32	64	32	L7
14-0867	175	64	64	>64	L7

*IMP: Imipenem, MER: Meropenem, DOR: Doripenem

De igual manera, todas los polimorfismos encontrados en OprD y agrupados en los patrones G1A-G1J, descritos en la Tabla 16 del apartado de Resultados, ya se habían descrito con anterioridad en cepas sensibles y resistentes a carbapenémicos (172,201,202), por lo que no explican la resistencia de los aislados de este estudio a estos antibióticos.

En los 18 aislados descritos en la Tabla 30 se detectaron codones de parada prematuros derivados de la inserción y deleción de nucleótidos que alteraron el marco de lectura del gen y de la sustitución de nucleótidos. Entre ellos, el codón de parada prematuro en la posición 142, encontrado en el aislado 12-6599, es característico del clon de alto riesgo ST175 (172,196). Estos polimorfismos podrían explicar la resistencia a imipenem de estos aislados.

Tabla 30. Aislados donde se encontraron polimorfismos que llevaron a codones de parada prematuros en OprD

Aislado	ST	CMI ($\mu\text{g/ml}$)			Codones de parada
		IMP	MER	DOR	
15-0495	2360	32	8	16	Δ_{380} tg. STOP (193)
12-6304	253	0,5	2	2	aac \rightarrow taa. STOP (219)
13-1575	253	2	1	4	Ins ₆₃₅₋₆₃₅ g. STOP (219)
10-5351	175	0,25	0,06	0,125	tgg \rightarrow tag. STOP (138)
13-2025	179	4	1	0,5	Ins ₂₉₋₃₀ c. STOP (17)
15-7350	179	32	16	16	cag \rightarrow tag STOP (340)
13-2507	455	32	16	16	$\Delta_{634-639}$ ggccgcta. STOP (240)
13-5486	455	8	4	8	tgg \rightarrow tga. STOP (417)
13-5524	175	16	64	32	Δ_{199} c. STOP (96)
12-6547	569	4	2	0,5	tgg \rightarrow tga. STOP (417)
14-3192	175	32	32	16	Ins ₁₀₆₄₋₁₀₆₅ cctacggcgttctgcct. STOP (371)
15-4983	569	32	8	8	tgg \rightarrow tga. STOP (417)
15-6548	379	16	4	4	gga \rightarrow tga. STOP (431)
14-3875	175	32	16	16	gat \rightarrow taa. STOP (371)
14-0116	111	8	8	4	Ins ₆₇₀₋₆₇₁ c. STOP (264)
12-6599	175	32	32	32	caa \rightarrow taa. STOP (142)
14-0035	313	16	32	8	tgg \rightarrow tga. STOP (138)
13-5857	175	16	64	32	Δ_{199} c. STOP (96)

*IMP: Imipenem, MER: Meropenem, DOR: Doripenem, Δ : Delección, Ins: Inserción, IMP: Imipenem, MER: Meropenem, DOR: Doripenem, STOP: Codón de parada prematuro

**Los nucleótidos se representan en letras minúsculas (a,t,c,g)

Los aminoglucósidos son de vital importancia en el tratamiento de infecciones pulmonares en pacientes con FQ, administrándose junto con betalactámicos. De los 79 aislados secuenciados, 34 fueron resistentes a aminoglucósidos. Uno de los mecanismos de resistencia a estos antibióticos es la inactivación de los mismos mediante procesos enzimáticos (203). Según lo descrito por Poole en 2005 (203), gentamicina es sustrato para las acetiltransferasas de tipo AAC(3)-I y AAC(6')-II y, tobramicina y amikacina para las de tipo AAC(6')-I. Asimismo, describió que la nucleotidiltransferasa de tipo ANT(2'')-I inactiva

gentamicina y tobramicina. Finalmente, la fosfotransferasa APH(3'')-IIb se relaciona con un ligero aumento en la resistencia a amikacina (204,205). Tal y como se representa en verde en la Figura 55, la acetiltransferasa AAC(3)-Ib se encontró en 5 aislados (ST175, ST308 y ST111) resistentes a gentamicina, AAC(6')-Ib se encontró en 8 aislados (ST111, ST175, ST179, ST253 y ST308), 5 de los cuales fueron resistentes a tobramicina y amikacina, y AAC(6')-IIId en 2 aislados (ST111 y ST308) resistentes a gentamicina. En 14 aislados (ST175), resistentes a gentamicina y tobramicina, se encontró la nucleotidiltransferasa ANT(2'')-Ia y la fosfotransferasa APH(3'')-IIb estuvo presente en los 34 aislados, 16 de los cuales fueron resistentes a amikacina. Finalmente se encontraron las enzimas de tipo ANT(3'')-I y APH(6)-Id, sin embargo gentamicina, tobramicina y amikacina no son sustratos para ellas, con lo que su presencia no se relaciona con la resistencia a los mismos (203,204,206).

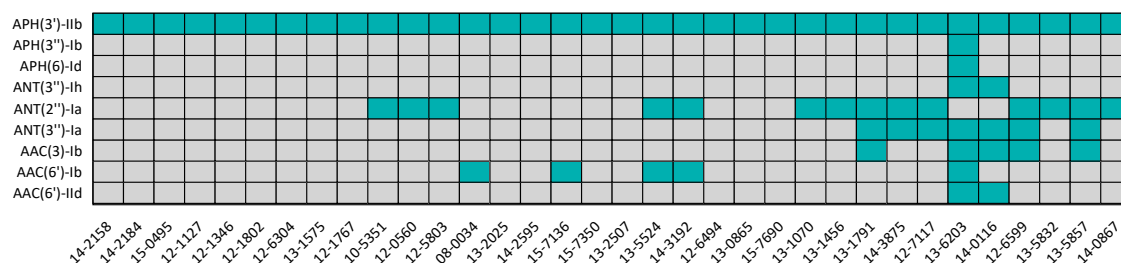


Figura 55. Distribución de AME entre los aislados de *P. aeruginosa* resistentes a aminoglucósidos

En los aislados 14-2184, perteneciente al clon epidémico ST274 y 13-2025, 14-2595, 15-7350 y 13-2507, pertenecientes al clon de alto riesgo ST179, se encontraron las sustituciones Y₅₅₂C y T₆₇₁A en el factor de elongación FusA1 y la sustitución G₆₉₅A en el factor de elongación FusA2 en los 34 aislados resistentes a aminoglucósidos. Estas mutaciones estaban descritas en el trabajo de López-Causapé y colaboradores como responsables de niveles elevados de resistencia a aminoglucósidos en cepas de FQ (177).

La inactivación de las oxidoreductas NuoG y DsbM y de las proteínas ribosomales RplB y RplY pueden incrementar la resistencia a aminoglucósidos, sin embargo, no hay aún evidencia de este hecho *in vivo*, además, los polimorfismos encontrados en los aislados de este trabajo ya se habían descrito con anterioridad en cepas salvajes, por lo que su presencia no se relaciona con la resistencia a estos antibióticos (38,194,207).

Los 79 aislados secuenciados fueron resistentes a fluoroquinolonas y el análisis de mutaciones en las subunidades GyrA, GyrB, ParC y ParE de la región QRDR, reveló ciertos polimorfismos responsables de dicha resistencia, ya descritos con anterioridad por varios autores (167,177,196,208–210). Según lo descrito en la Tabla 18 del apartado de Resultados, en 70 de los aislados se encontraron las sustituciones D₈₇N, T₈₃I/A y G₈₁C en GyrA. En 20 de estos aislados encontramos además la delección de 2 aminoácidos (serina y ácido glutámico) en las posiciones 912 y 913, y la inserción de un aminoácido de leucina entre las posiciones 135 y 136 en el aislado 13-3298, perteneciente al clon de alto riesgo ST155, sin embargo, no hemos encontrado evidencia en la literatura de su papel en la resistencia a fluoroquinolonas. En el aislado 13-2025, perteneciente al clon de alto riesgo ST179, la sustitución de un nucleótido de guanina por uno de timina ocasionó un codón de parada prematuro en la posición 922. En 18 aislados se encontraron las sustituciones aminoacídicas S₄₆₆T/Y y E₄₆₈E/D/G. ParC presentó las mutaciones E₉₁K y S₈₇L/W en 36 aislados y se encontró la mutación S₄₅₇E en ParE en 31 aislados.

Del Barrio-Tofiño y colaboradores (196) aseguraban en sus estudios que la combinación de las mutaciones T₈₃I/A y D₈₇N en GyrA y S₈₇L/W en ParC era propia de aislados pertenecientes al clon de alto riesgo ST175 y con elevados niveles de resistencia a fluoroquinolonas. En los 13 aislados, descritos en la tabla a continuación, se encontró dicha combinación, pertenecían al ST175 y 12 de estos presentaron valores de CMI para levofloxacin y ciprofloxacino superiores a 32 µg/ml.

Tabla 31. Mutaciones en GyrA y ParC en aislados pertenecientes al clon del alto riesgo ST175

Aislado	ST	CMI (µg/ml)		ParC	GyrA
		LEV	CIP		
12-0560	175	4	4	S ₈₇ W	T ₈₃ I, D ₈₇ N
12-5803	175	>32	>32	S ₈₇ W	T ₈₃ I, D ₈₇ N
08-0034	111	>32	>32	S ₈₇ W	T ₈₃ I, D ₈₇ N
13-5524	175	>32	>32	S ₈₇ W	T ₈₃ I, D ₈₇ N
14-3192	175	>32	>32	S ₈₇ W	T ₈₃ I, D ₈₇ N
13-1070	175	>32	>32	S ₈₇ W	T ₈₃ I, D ₈₇ N
13-1456	175	>32	>32	S ₈₇ W	T ₈₃ I, D ₈₇ N
13-1791	175	>32	>32	S ₈₇ W	T ₈₃ I, D ₈₇ N

Aislado	ST	CMI ($\mu\text{g/ml}$)		ParC	GyrA
		LEV	CIP		
14-3875	175	>32	>32	S ₈₇ W	T ₈₃ I, D ₈₇ N
12-7117	175	>32	>32	S ₈₇ W	T ₈₃ I, D ₈₇ N
12-6599	175	>32	>32	S ₈₇ W	T ₈₃ I, D ₈₇ N
13-5832	175	>32	>32	S ₈₇ W	T ₈₃ I, D ₈₇ N
13-5857	175	>32	>32	S ₈₇ W	T ₈₃ I, D ₈₇ N
14-0867	175	>32	>32	S ₈₇ W	T ₈₃ I, D ₈₇ N

*LEV: Levofloxacin, CIP: Ciprofloxacin

Se identificó la presencia del gen *crpP* en el cromosoma de 54 aislados. La proteína CrpP inhibe la acción de ciprofloxacin mediante su fosforilación (73). En los aislados 13-2025 (ST179), 13-3298 (ST155), 13-3423 (ST155), 13-3753 (ST155), 13-5627 (ST155), 12-5984 (ST253), 14-2563 (ST569), 12-3148 (ST312), 14-0116 (ST111), 14-0035 (ST313) y 12-5970 (ST447), se encontraron las sustituciones aminoacídicas A₄T, S₅P, E₆D, R₂₀K, D₂₃H, F₃₂Y, I₄₂L en CrpP, sin embargo no hay evidencia de que estas interfieran con la función fosforiladora de la proteína, lo que se serían necesarios estudios adicionales que indiquen su papel en el funcionamiento de esta proteína.

Las polimixinas se consideran antibióticos de último recurso, y aunque el porcentaje de cepas resistentes es relativamente bajo (<5%), en estos últimos años la resistencia ha aumentado debido a su uso frecuente, en particular de la colistina, para tratar infecciones nosocomiales y de pacientes con FQ (34). Se estudiaron las mutaciones en los TCS (PmrAB, PhoPQ, ParRS, CprRS y ColRS) en los 20 aislados con resistencia a colistina encontrados durante el estudio, descritos en la Tabla 19 del apartado de Resultado, sin embargo, dichas mutaciones ya habían sido descritas con anterioridad tanto en cepas sensibles como resistentes a colistina, con lo cual su implicación en la resistencia a las polimixinas quedaría descartada (34,211–214).

Si bien la fosfomicina no se considera como un antibiótico antipseudomónico, en la última década ha aumentado su uso en el tratamiento de infecciones urinarias y en combinación con otros antibióticos para tratar infecciones por cepas MDR/XDR de *P. aeruginosa*. Los mecanismos de resistencia a este antibiótico aún no son claros, sin embargo la inactivación de transportador GlpT es clave en la resistencia a este antibiótico (34,215). Los 8

aislados (14-2184, 14-1716, 13-1575, 13-2025, 13-1791, 12-3148, 14-0116, 12-6599 y 13-3150), de un total de 37 resistentes a fosfomicina, presentaron sustituciones aminoacídicas en GlpT, sin embargo solo se encontró evidencia de los cambios T₃₃₆P y T₂₁₁P, presentes en los aislados 13-1791 y 12-6599, pertenecientes al clon ST175, como responsables de dicha resistencia (34,215). En los aislados 12-7117 y 13-6203, pertenecientes a los clones ST175 y ST308, respectivamente, y con valores de CMI >512 µg/ml, se encontraron inserciones y deleciones de aminoácidos (Ins₂₀₂₋₂₀₃GVAV, Δ₅₄₋₅₉YLIEDG) que podrían alterar el funcionamiento del transportador, sin embargo, no hemos encontrado mutaciones similares a estas en GlpT en la literatura. Otro de los mecanismos de resistencia a fosfomicina es la modificación de su estructura por la metaloenzima FosA, una glutatión S-transferasa dependiente de Mn²⁺ y K⁺, la cual confiere resistencia a fosfomicina en bacterias gramnegativas mediante la conjugación del antibiótico con glutatión (216,217), encontrada en 29 aislados de este estudio, con valores de CMI ≥256 µg/ml.

Otra consideración relevante es el papel que desempeñan los sistemas o bombas de eflujo en la resistencia de *P. aeruginosa* a distintos antibióticos. La sobreexpresión del sistema MexAB-OprM compromete la acción de fluoroquinolonas, penicilinas, cefalosporinas y meropenem (6). Tras analizar los componentes estructurales de esta bomba (MexA, MexB y OprM), observamos inserciones y deleciones de nucleótidos en las secuencias de ADN, que trajeron como consecuencia alteraciones en el marco de lectura de los genes y provocaron las mutaciones en las proteínas, descritas en la Tabla 32, de las que no encontramos evidencia en la literatura, sin embargo, los aislados en las que se encontraron son sensibles a meropenem (a excepción del 13-6203) por lo que podrían asociarse con un mal funcionamiento de la bomba.

Tabla 32. Mutaciones en los componentes estructurales del sistema de eflujo MexAB-OprM en aislados de *P. aeruginosa*

Aislado	CMI	MexA	MexB	OprM
	MER (µg/ml)			
14-0294	1	Δ ₂₇ S	I ₉₅₈ L	wt
14-0421	2	Δ ₂₇ S	I ₉₅₈ L	wt
14-0652	0,5	Δ ₂₇ S	I ₉₅₈ L	wt
14-3223	0,5	Δ ₂₇ S	I ₉₅₈ L	wt
14-3362	0,25	Δ ₂₇ S	I ₉₅₈ L	wt
15-0495	8	S ₁₃₀ R	Δ ₄₆₀ c. STOP (198)	wt

Aislado	CMI MER ($\mu\text{g/ml}$)	MexA	MexB	OprM
12-0560	0,06	wt	wt	cag \rightarrow tag. STOP (165)
12-5803	0,5	wt	wt	cag \rightarrow tag. STOP (165)
08-0034	0,5	wt	wt	cag \rightarrow tag. STOP (165)
07-2043	4	wt	Δ_{200} P	wt
11-4059	0,125	wt	Δ_{200} P	wt
12-1371	0,5	wt	Δ_{200} P	wt
12-1767	0,25	wt	Δ_{200} P	wt
13-5486	4	wt	Ins ₃₄₇₋₃₄₈ c. STOP (174)	wt
13-3298	0,125	wt	Δ_{663} V	wt
13-3423	0,5	wt	Δ_{663} V	wt
13-3753	0,125	wt	Δ_{663} V	wt
13-5627	0,25	wt	Δ_{498} K, Δ_{663} V	wt
15-6548	4	Ins ₉₀₂₋₉₀₃ a	wt	wt
15-0788	$\leq 0,06$	P ₉₆ L	Δ_{36-40} PAIAP	wt
13-2077	0,5	Ins ₇₉₀₋₇₉₁ g	I ₁₈₆ V, S ₁₀₄₁ E, V ₁₀₄₂ A	wt
13-3189	8	Ins ₇₉₀₋₇₉₁ g	I ₁₈₆ V, S ₁₀₄₁ E, V ₁₀₄₂ A	wt
13-4111	1	Ins ₇₉₀₋₇₉₁ g	I ₁₈₆ V, S ₁₀₄₁ E, V ₁₀₄₂ A	wt
13-1058	0,5	Ins ₉₄₋₉₅ gccgc. STOP (43)	wt	wt
13-6203	16	wt	Δ_{488} L	wt

*MER: Meropenem, Δ : Delección, Ins: Inserción, STOP: Codón de parada prematuro

**wt: Secuencia igual a la de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1

***En letra minúscula se representan las mutaciones referentes a nucleótidos y en mayúscula las referentes a aminoácidos

Por otro lado, la inactivación mutacional de los reguladores MexR, NalC y NalD conlleva a la sobreexpresión de la bomba MexAB-OprM y con ello a la resistencia a betalactámicos (170,193). En la Tabla 20 de apartado de Resultados se describen las mutaciones encontradas en estos reguladores en los aislados analizados. No encontramos evidencia en la literatura que relacione las inserciones y deleciones de aminoácidos encontradas en NalC, con la sobreexpresión de MexAB-OprM. En los aislados 14-0294, 14-0421, 14-0652, 14-3223, 14-3362, pertenecientes al ST2238, encontramos la delección de los aminoácidos LLSE en las posiciones 139-142. Sin embargo, esos aislados presentan mutaciones en los componentes estructurales de la bomba, mencionadas unos párrafos más arriba (Tabla 32), y que suponíamos que podrían favorecer a la sensibilidad a meropenem. Estos aislados

son resistentes a betalactámicos y fluoroquinolonas, cuya resistencia, en este caso, podría deberse a la presencia de PDC-3 y las oxacilinasas OXA-50 y OXA-396, en el caso de betalactámicos, y probablemente a la sobreexpresión del sistema MexEF-OprN, del cual se hablará unos párrafos más abajo.

Por otro lado, en los aislados 12-6547, 14-2563, 15-4983, pertenecientes al ST569 se encontró la inserción de un aminoácido de isoleucina entre las posiciones 66 y 67 (Tabla 20), de la que desconocemos su efecto sobre el funcionamiento de NaIC. Estos aislados fueron resistentes a fluoroquinolonas y betalactámicos. La resistencia a fluoroquinolonas la asociamos a mutaciones en GyrA, concretamente T₈₃A, y, la resistencia a betalactámicos la asociamos a la presencia de PDC-5 y la oxacilinasas OXA-50. En el supuesto caso en que la inserción del aminoácido de isoleucina interviniera en la sobreexpresión de MexAB-OprM, este podría ser un mecanismo complementario de resistencia a estos antibióticos.

En el aislado 13-6203, perteneciente al clon ST308 encontramos la delección de los aminoácidos ERGRQ en las posiciones 10-14 de NaIC. Si bien, no encontramos evidencia en la literatura que explique su efecto en el funcionamiento de NaIC, podríamos suponer esta mutación como un indicio de la resistencia a meropenem, a la vez que complementaría la resistencia a betalactámicos, posiblemente debida a la presencia de PDC-7 y las oxacilinasas OXA-50 y OXA-488.

En lo referente al regulador NaID, en el aislado 12-1802, perteneciente al ST253 se encontró la delección de los aminoácidos LFDP en las posiciones 183-186. De esta mutación tampoco hemos encontrado evidencia en la literatura que la relacione con la sobreexpresión de MexAB-OprM. Este aislado es resistente a betalactámicos y fluoroquinolonas, y la resistencia a estos antibióticos la atribuimos a la presencia de PDC-9 y la oxacilinasas OXA-488, así como a la sustitución D₈₇N en GyrA. En el supuesto caso de que dicha delección tuviera un efecto en la sobreexpresión de la bomba, este podría ser un mecanismo adicional de resistencia a estos antibióticos. Cabe mencionar que en NaIC y NaID se encontraron sustituciones aminoacídicas (Tabla 20), sin embargo no se relacionan con la sobreexpresión de MexAB-OprM (177,218).

Finalmente, inserciones, delecciones y cambios en nucleótidos en la secuencia de *mexR*, conllevaron a codones de parada prematuros en MexR, descritos en la Tabla 20 del apartado de Resultados, en los aislados 15-0495 (ST2360), 13-2025 (ST179), 12-6599 (ST175) y 13-3150

(ST17). La posible sobreexpresión de MexAB-OprM por la inactivación de este regulador junto con la presencia de PDC (1, 3, 5 y 8), las oxacilinasas OXA-46 y OXA-50, y mutaciones en GyrA (Tabla 18) explicarían la resistencia de estos aislados a betalactámicos y fluoroquinolonas.

La sobreexpresión de la bomba MexCD-OprJ conlleva a un incremento en la resistencia a fluoroquinolonas. Los cambios aminoacídicos encontrados, en este trabajo, en los componentes estructurales MexC, MexD y la porina OprJ ya se habían descrito con anterioridad en otros estudios y no se relacionaban con la sobreexpresión del sistema (34,177,196). Sin embargo, sustituciones nucleotídicas en las secuencias de *mexD* y *oprJ* de los aislados 15-0495 (ST2360), 11-1196 (ST253) y 12-1802 (ST253), derivaron en codones de parada prematuros en MexD y OprJ, y, en los aislados 13-0950 (ST253) y 13-2772 (ST253) *mexC* y *oprJ* estuvieron ausentes. A pesar de que estas mutaciones pudieran provocar la inactivación de la bomba, o ausencia de esta, y con ello, evitar la expulsión de los antibióticos, estos aislados mostraron resistencia a fluoroquinolonas, la cual atribuimos a mutaciones en GyrA (T₈₃L, D₈₇N y G₈₁C).

La inactivación mutacional del represor NfxB conlleva a la sobreexpresión del sistema MexCD-OprJ (34,177). Varios autores han descrito mutaciones que inactivan este represor (219–222), entre ellas las descritas en la Tabla 33, encontradas en 19 aislados de este estudio. Además, en los aislados 11-1196 y 12-1802 se encontró la inserción de una prolina entre las posiciones 105-106, cuyo efecto en la actividad de NfxB aún debe ser investigada.

Tabla 33. Mutaciones en NfxB

Aislado	CMI (µg/ml)		ST	NfxB
	LEV	CIP		
08-6073	2	0,5	253	R ₂₁ H, D ₅₆ G
11-1196	8	2	253	R ₂₁ H, D ₅₆ G, Ins ₁₀₅₋₁₀₆ P
12-1127	2	1	253	R ₂₁ H, D ₅₆ G
12-1159	8	4	253	R ₂₁ H, A ₃₀ T, D ₅₆ G
12-1251	16	32	253	R ₂₁ H, D ₅₆ G
12-1345	8	2	253	R ₂₁ H, D ₅₆ G
12-1346	2	4	253	R ₂₁ H, D ₅₆ G
12-1802	8	2	253	R ₂₁ H, D ₅₆ G, Ins ₁₀₅₋₁₀₆ P

Aislado	CMI ($\mu\text{g/ml}$)		ST	NfxB
	LEV	CIP		
12-6304	16	4	253	R ₂₁ H, D ₅₆ G
13-1575	4	8	253	R ₂₁ H, D ₅₆ G
12-6547	4	2	569	R ₈₂ L
12-5984	0,25	$\leq 0,03$	253	R ₂₁ H, D ₅₆ G
14-2563	2	1	569	R ₈₂ L
15-4983	2	0,5	569	R ₈₂ L
13-2077	0,06	0,06	1249	R ₂₁ H, D ₅₆ G
13-3189	0,125	0,125	1249	R ₂₁ H, D ₅₆ G
13-4111	0,5	0,25	1249	R ₂₁ H, D ₅₆ G
13-4215	0,5	0,5	253	R ₂₁ H, D ₅₆ G
13-1058	4	1	253	R ₂₁ H

*LEV: Levofloxacin, CIP: Ciprofloxacin, Ins: Inserción

La activación del MexEF-OprN favorece la resistencia a fluoroquinolonas, imipenem y meropenem (6). MexT y MexS actúan como activadores del sistema MexEF-OprN.

En 67 aislados, de los 79 secuenciados, se encontró la delección de 8 bp (ccagccgg) entre las posiciones 237-244 de la secuencia nucleotídica de *mexT*, relacionada con un activador MexT funcional (223). En este estudio la resistencia a fluoroquinolonas y carbapenémicos la asociamos a mutaciones en las regiones QRDR, a la inactivación de la porina OprD, principalmente, por lo que la activación de este sistema, en los 67 aislados, sería un mecanismo de resistencia complementario.

Por el contrario, en los aislados 14-0294 (ST2238), 14-0421 (ST2238), 14-0652 (ST2238), 14-3223 (ST2238), 14-3362 (ST2238), 12-0805 (ST455), 13-2507 (ST455), 13-5486 (ST455), 14-0919 (ST293), 12-7117 (ST175) y 13-3150 (ST17) se encontraron codones de parada prematuros e inserciones de nucleótidos en la secuencia de *mexT* (Ins₅₇₄₋₅₇₅g, Δ_{621} C, $\Delta_{238-257}$ ccagccgccatcagcggc), las cuales suponemos que alteren el funcionamiento del activador, y con ello el sistema MexEF-OprN no se exprese. Así mismo, estos 11 aislados poseen la sustitución D₂₄₉N en MexS, relacionada con un activador funcional (224), además de otras sustituciones como A₃₇V, P₁₁₅L, G₂₂₄A, A₅₆D y A₂₅₈V, de las cuales desconocemos su efecto en el funcionamiento de este regulador, por lo que no es posible afirmar que la resistencia a

fluoroquinolonas, imipenem y meropenem, en estos aislados, se deba a la sobreexpresión de la bomba MexEF-OprN, pero si podemos asociar la resistencia a imipenem y meropenem con la presencia de la oxacilinasasa OXA-50, y codones de parada prematuros en OprD, estos últimos en los aislados 13-2507 y 13-5486. Finalmente, la resistencia a fluoroquinolonas de estos 11 aislados, podría en un supuesto caso, deberse a mutaciones que activen el sistema MexXY-OprM. La sobreexpresión de este sistema no solo favorece la resistencia de *P. aeruginosa* a fluoroquinolonas, sino también a aminoglucósidos y cefepime (54). En los 79 aislados secuenciados encontramos las sustituciones aminoacídicas K₃₂₉Q, L₃₃₁V, D₃₄₆H y W₃₅₈R en MexX y T₅₄₃A, Q₈₄₀E, I₅₃₆V, G₅₈₉A, N₁₀₃₆T, G₂₈₇S, E₁₅₂D en MexY, las cuales no se relacionan con la expresión de la bomba (177). En la Tabla 34 se describen las mutaciones en MexX y MexY de las que no se encontró evidencia por el momento, y que requieren de estudios adicionales que revelen su papel en la expresión de este sistema.

Tabla 34. Mutaciones en MexX y MexY

Aislado	ST	MexX	MexY
14-2184	274		M ₃₄₇ T
14-0294	2238		I ₆ T
14-0421	2238		I ₆ T
14-0652	2238		I ₆ T
14-3223	2238		I ₆ T
14-3362	2238		I ₆ T
15-0495	2360	G ₂₉₂ S	R ₃₀₄ C
08-6073	253		Q ₁₀₃₉ R
11-1196	253		Q ₁₀₃₉ R
12-1127	253		T ₂₃₂ A, Q ₁₀₃₉ R
12-1159	253		Q ₁₀₃₉ R
12-1251	253		Q ₁₀₃₉ R
12-1345	253		Q ₁₀₃₉ R
12-1346	253		Q ₁₀₃₉ R
12-1802	253		Q ₁₀₃₉ R
14-1716	198		F ₂₉ S, A ₇₇₂ T
12-6304	253	R ₅₉ H	V ₃₇₃ A, Q ₁₀₃₉ R
13-1575	253		V ₃₇₃ A, Q ₁₀₃₉ R
07-2043	443	L ₂₂ M, D ₁₃₅ Y	Q ₂₈₂ R

Aislado	ST	MexX	MexY
11-4059	443	L22M, D135Y	Q282R, V299A
12-1371	443	L22M, D135Y	Q282R
12-1767	443	L22M, D135Y	Q282R
10-5351	175		S476P
13-2025	179		G530S
15-7136	179		V942A
15-7350	179		V942A
12-0805	455		D628H
13-2507	455		A87V, A258V, D628H, H638R, V942A, V979M
13-5486	455		A258V, D628H, H638R, V942A, V979M
13-3298	155		D428N
13-3423	155		D428N
13-3753	155		D428N
13-5627	155		D428N
12-6547	569		N210S, Q843P
12-6353	260		G1002A
13-0950	253		Q1039R
13-2772	253		Q1039R
12-5984	253		P9S, Q1039R
14-0919	293		P1032S
12-6494	3449		A992T
13-0865	260		G1002A
14-2563	569	A27T	N210S, Q843P
15-4983	569	A27T	N210S, Q843P
13-2077	1249	A15T, E25D, E26K, A28P, D29E, G31E, T33A, A34T, E35D, R46K, A153S, K161R, K236Q, R338H, I349V, D384G	
13-3189	1249	A15T, E25D, E26K, A28P, D29E, G31E, T33A, A34T, E35D, R46K, A153S, K161R, K236Q, R338H, I349V, D384G	
13-4111	1249	A15T, E25D, E26K, A28P, D29E, G31E, T33A, A34T, E35D, R46K, A153S, K161R, K236Q, R338H, I349V, D384G	
12-3148	312	V309I	
13-4215	253		Q1039R
13-5570	252		E688V

Aislado	ST	MexX	MexY
12-2600	560	G ₃₄₄ D	
12-5422	560	G ₃₄₄ D	
14-0116	111		G ₅₃₀ S
14-0035	313		Q ₁₀₃₉ R
12-5970	447		Q ₂₈₂ R, V ₉₈₀ I

En los aislados 13-1058 (ST253), 12-2600 (ST560) y 12-5422 (ST560), sensibles a aminoglucósidos, se encontraron codones de parada prematuros en MexY. Según Masuda y colaboradores, la delección del operón *mexXY* incrementa la sensibilidad de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 a tetraciclina, eritromicina y gentamicina (61).

La expresión del sistema MexXY-OprM es un mecanismo de resistencia a aminoglucósidos poco común en aislados clínicos de *P. aeruginosa*, sin embargo predomina en aislados procedentes de pacientes con FQ (225). Esta expresión se debe a mutaciones en *mexZ*, identificado como el gen con mayor frecuencia de mutación en estos aislados (225,226). De acuerdo con esto, entre los 79 aislados secuenciados, 34 fueron resistentes a aminoglucósidos y presentaron mutaciones en *mexZ* (Tabla 20 del apartado de Resultados), a excepción de 6, cuya secuencia fue idéntica a la de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1. Las sustituciones aminoacídicas A₁₄₄T, L₁₃₈R, G₅₀D y G₁₉₅E, descritas con anterioridad por otros autores como responsables de la inactivación de MexZ (141,167,177,227), estuvieron presentes en los aislados de este estudio, explicando así su resistencia a aminoglucósidos. Según Guénard y colaboradores (227), las mutaciones G₅₀D y G₁₉₅E en MexZ impiden su unión con MexXY y relacionan la mutación G₁₉₅E con cepas pertenecientes al ST175 (Tabla 35).

Tabla 35. Mutaciones en MexZ que impiden su unión con MexX-MexY

Aislado	ST	MexZ
12-0560	175	G ₁₉₅ E
12-5803	175	G ₁₉₅ E
08-0034	111	G ₁₉₅ E
13-5524	175	G ₁₉₅ E
13-3298	155	G ₅₀ D
13-3423	155	G ₅₀ D

Aislado	ST	MexZ
13-3753	155	G ₅₀ D
13-5627	155	G ₅₀ D
14-3192	175	G ₁₉₅ E
13-1070	175	G ₁₉₅ E
13-1456	175	G ₁₉₅ E
13-1791	175	G ₁₉₅ E
14-3875	175	G ₁₉₅ E
12-7117	175	G ₁₉₅ E
12-6599	175	G ₁₉₅ E
13-5832	175	G ₁₉₅ E
13-5857	175	G ₁₉₅ E
14-0867	175	G ₁₉₅ E

En la Tabla 36 se presentan mutaciones en MexZ encontradas entre los 79 aislados, de las cuales no encontramos evidencia en la literatura, por lo que desconocemos su implicación en la inactivación de MexZ.

Tabla 36. Mutaciones en MexZ

Aislado	ST	MexZ
14-2158	274	Δ_{34} M
14-0294	2238	$\Delta_{103-106}$ QRVL
14-0421	2238	$\Delta_{103-106}$ QRVL
14-0652	2238	$\Delta_{103-106}$ QRVL
14-3223	2238	$\Delta_{103-106}$ QRVL
14-3362	2238	$\Delta_{103-106}$ QRVL
15-0495	2360	$\Delta_{136-140}$ FGLRQ
12-6547	569	$\Delta_{nt\ 438-453}$ acgcggcgaactgccg
14-2563	569	$\Delta_{nt\ 438-453}$ acgcggcgaactgccg
15-4983	569	$\Delta_{nt\ 438-453}$ acgcggcgaactgccg
12-2600	560	$\Delta_{nt\ 484}$ t
12-5422	560	$\Delta_{nt\ 484}$ t
15-6548	379	$\Delta_{nt\ 645}$ C

Aislado	ST	MexZ
08-6073	253	N ₁₈₆ S
12-1251	253	N ₁₈₆ S
10-5351	175	L ₁₆₆ P
13-0950	253	N ₁₈₆ S
13-2772	253	N ₁₈₆ S
12-5984	253	N ₁₈₆ S
15-0788	1399	L ₁₇₄ P
13-2077	1249	T ₃₁ N, G ₆₈ A, Q ₆₉ R, N ₇₆ R, R ₇₈ D, F ₁₃₆ L, Q ₁₄₀ L, E ₁₄₆ A, R ₁₄₇ Q, I ₁₆₁ V, I ₁₇₀ V, D ₁₈₂ N, M ₁₉₁ L, L ₁₉₆ I, S ₂₀₁ G, Y ₂₀₄ H, L ₂₀₇ R, D ₂₀₉ E
13-3189	1249	T ₃₁ N, G ₆₈ A, Q ₆₉ R, N ₇₆ R, R ₇₈ D, F ₁₃₆ L, Q ₁₄₀ L, E ₁₄₆ A, R ₁₄₇ Q, I ₁₆₁ V, I ₁₇₀ V, D ₁₈₂ N, M ₁₉₁ L, L ₁₉₆ I, S ₂₀₁ G, Y ₂₀₄ H, L ₂₀₇ R, D ₂₀₉ E
13-4111	1249	T ₃₁ N, G ₆₈ A, Q ₆₉ R, N ₇₆ R, R ₇₈ D, F ₁₃₆ L, Q ₁₄₀ L, E ₁₄₆ A, R ₁₄₇ Q, I ₁₆₁ V, I ₁₇₀ V, D ₁₈₂ N, M ₁₉₁ L, L ₁₉₆ I, S ₂₀₁ G, Y ₂₀₄ H, L ₂₀₇ R, D ₂₀₉ E
13-4215	253	N ₁₈₆ S
13-6203	308	G ₈₉ S
14-0116	111	G ₁₃₇ D
14-0035	313	L ₁₉₉ R

*Δ: Delección. Las letras en mayúscula representan mutaciones referidas a aminoácidos y en minúscula a nucleótidos

Para concluir, podemos afirmar que la resistencia a aminoglucósidos en los aislados de *P. aeruginosa* secuenciados se debe a la presencia de AME, mutaciones en los factores de elongación y a la sobreexpresión de la bomba MexXY-OprM, mientras que la resistencia a betalactámicos se debe a la hiperproducción de AmpC, a la presencia de PDC y oxacilinasas y a la pérdida de la porina OprD. Las mutaciones en las regiones QRDR, la presencia del gen *crpP* en el cromosoma bacteriano y la sobreexpresión de la bomba MexCD-OprJ explican la resistencia a fluoroquinolonas en los aislados de este estudio, y las mutaciones en el transportador GlpT, así como la presencia de la enzima FosA, explican la resistencia a fosfomicina. Sin embargo, no fue posible explicar la resistencia de los aislados a colistina, pues

FQ con aislados donde predomina el genotipo *exoS* sobre *exoU*, a la vez que destaca la presencia universal de *exoT* y *exoY*. De manera similar ocurrió en la colección aislada de pacientes con BNFQ (228–232). En la Figura 57 se representa la distribución de los efectores en los 79 aislados secuenciados.

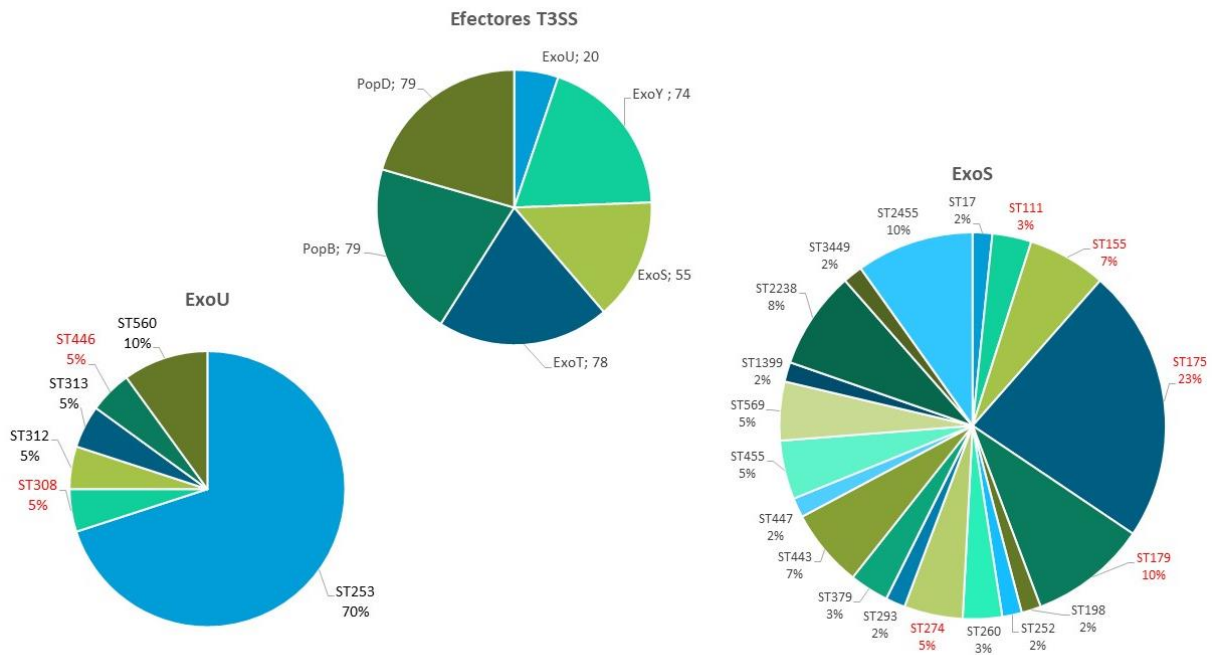


Figura 57. Presencia de efectores del T3SS en los 79 aislados de *P. aeruginosa* secuenciados

Gracias a los estudios de secuenciación masiva, se ha observado que los aislados de *P. aeruginosa* procedentes tanto de clínica como de ambiente, se agrupan en tres grandes grupos: *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* PA14 y *P. aeruginosa* PA7, diferenciándoles por su virulencia y toxicidad. La mayoría de los aislados suelen clasificarse dentro de los dos primeros grupos, caracterizados por presentar ambos el mecanismos T3SS; aunque *P. aeruginosa* PAO1 presenta un genotipo *exoU*/*exoS*⁺/*exoY*⁺/*exoT*⁺, y *P. aeruginosa* PA14 es *exoU*⁺/*exoS*⁻/*exoY*⁺/*exoT*⁺. Sin embargo, el tercer grupo de aislados similares a *P. aeruginosa* PA7, llamados “outliers”, carece del locus del T3SS, pero en su genoma está codificado un sistema de secreción (Two-Partner Secretion System) ExlAB (228–232). Todos los aislados secuenciados fueron *exoU*⁺ o *exoS*⁺, a excepción de 13-2077, 13-3189, 13-4111, pertenecientes al ST1249 y 12-1159, perteneciente al ST253, que no presentaban estos dos efectores. Dentro del grupo de *P. aeruginosa* PAO1 se encontraron 53 aislados, englobados en diversos clones, incluyendo los clones de alto riesgo ST111, ST155, ST175 y ST175 (Figura 57, en rojo). Dentro del grupo de *P.*

aeruginosa PA14 se encontraron 20 aislados, agrupados mayoritariamente en el ST253. Ningún aislado perteneció al grupo de PA7 ni fue portador del sistema de secreción ExlAB.

Subedi y colaboradores discuten en su estudio la relación existente entre la resistencia a antibióticos (betalactámicos y fluoroquinolonas) y la presencia de los genes *exoU* y *exoS* en aislados de *P. aeruginosa* (193), y, al igual que otros autores, mencionan que aquellos aislados portadores de *exoU* son más resistentes a antibióticos que aquellos portadores de *exoS* (233,234). Estos autores afirmaban que las mutaciones E₁₁₄A, G₂₈₃E y M₂₈₈R en AmpR eran exclusivas de aislados *exoU*⁺ (193). Tras analizar el resistoma de los 79 aislados secuenciados en nuestro estudio, observamos que 26 tenían estas mutaciones, sin embargo, en discordancia con lo descrito por estos autores, se encontraron tanto en aislados *exoU*⁺ (n=16), como *exoS*⁺ (n=6) y *exoU/exoS*⁻ (n=4). De manera similar, en ese estudio se asociaba la presencia de *exoU* con mutaciones en GyrA y ParC, relacionados con la resistencia a fluoroquinolonas (193). En concordancia con esto, de los 20 aislados secuenciados que portaban el gen *exoU*, 18 de ellos presentaron mutaciones en estas regiones, entre ellas las sustituciones T₈₃I, D₈₇N y G₈₁C en GyrA, y S₈₇L en ParC. La presencia de estas mutaciones en aislados *exoU*⁺ sugiere la posibilidad de que estas cepas puedan evolucionar en los ambientes hospitalarios, donde se utilizan altas concentraciones de fluoroquinolonas para tratar infecciones por *P. aeruginosa* (193). Adicionalmente, en el estudio de Subedi y colaboradores se detectaron mutaciones en ParE y GyrB, concretamente las sustituciones A₄₇₃V y E₄₆₈D (193), esta última encontrada en 4 aislados *exoS*⁺ de nuestro estudio.

El translocón PopB-PopD, juega un papel clave, no solo a nivel estructural, sino a nivel de virulencia, induciendo una cascada inflamatoria. PopB-PopD se libera al medio celular y se ancla a la membrana citoplasmática, formando un poro que permite el paso de iones K⁺, lo que conlleva a la activación del inflammasoma y a la liberación de interleuquinas (IL-1β). Asimismo se demostró mediante estudios en *G. mellonella* que, si bien la activación del translocón es de por sí un factor de virulencia, en ausencia de los efectores del T3SS, la capacidad de virulencia disminuye (235). Este translocón se encontró en los 79 aislados secuenciados.

Junto con el T3SS, el sistema de secreción tipo VI (T6SS) es de gran importancia en la virulencia de *P. aeruginosa*, pues favorece su supervivencia frente a otros microorganismos tanto en nichos ambientales, como en células hospedadoras (236,237). En lo que refiere a efectores del T6SS, si bien, los 79 aislados secuenciados eran portadores de un gran número de proteínas efectoras de este sistema, observamos una clara ausencia de PldA. (Figura 41 del

apartado de Resultados). Según Wilderman y colaboradores no todas las cepas de *P. aeruginosa* portan *pldA*, puesto que este gen es parte de un elemento genético móvil de aproximadamente 7 kb (238). En nuestro estudio observamos que la presencia de PldA predominó entre los aislados de BNFQ (40%) frente a los de FQ (26%), en concordancia con lo descrito por Boulant y colaboradores (239).

Las fosfolipasas C (PLC) son uno de los numerosos factores de virulencia de *P. aeruginosa*. Se ha visto que in vitro incrementa la adherencia de *P. aeruginosa* a las células epiteliales y son citotóxicas en diferentes tipos celulares, e in vitro, causan necrosis tisular. *P. aeruginosa* posee dos genes codificantes de PLC, *plcN* y *plcH*. A diferencia de *plcN*, *plcH* tiene actividad hemolítica (240), y se encontró en el 100% de los aislados de pacientes con BNFQ y en el 95,9% de los aislados de FQ, todos ellos hemolíticos.

Analizado el resistoma y viruloma, se realizó un estudio in silico del serotipo de estos 79 aislados. Los serotipos O:4, O:6, O:10, O:11 y O:12 son los más frecuentes en infecciones nosocomiales por *P. aeruginosa* (241,242). En este estudio predominaron los serotipos O:4, O:6 y O:10. En la Tabla 37 se describe la relación encontrada entre el perfil de resistencia, presencia de efectores de los sistemas de secreción tipo III y VI y el serotipo.

Tabla 37. Perfiles de resistencia, efectores de T3SS y T6SS y serotipos

Aislado	Serotipo	ST	Perfil de Resistencia	Efectores T3SS			Efectores T6SS			
				ExoU	ExoS	PldA	Tle3	Tse6	Tse8	TseF
10-5351	O:4	175	modR	-	+	-	+	+	+	+
12-0560		175	MDR	-	+	-	+	+	+	-
12-5803		175	MDR	-	+	-	+	-	+	+
12-6599		175	MDR	-	+	-	+	+	+	+
12-7117		175	MDR	-	+	-	+	+	+	+
13-1070		175	MDR	-	+	-	+	+	+	+
13-1456		175	MDR	-	+	-	+	+	+	+
13-1791		175	XDR	-	+	-	+	+	+	+
13-5524		175	MDR	-	+	-	+	+	+	+
13-5832		175	MDR	-	+	-	+	+	+	+
13-5857		175	MDR	-	+	-	+	+	+	+
14-0867		175	MDR	-	+	-	+	+	+	+

Aislado	Serotipo	ST	Perfil de Resistencia	Efectores T3SS			Efectores T6SS			
				ExoU	ExoS	PldA	Tle3	Tse6	Tse8	TseF
14-3192		175	MDR	-	+	-	+	-	+	+
14-3875		175	MDR	-	+	-	+	+	+	+
07-2043		443	MDR	-	+	-	+	+	+	+
11-4059		443	modR	-	+	-	+	-	+	+
12-1767		443	MDR	-	+	-	+	-	+	+
12-2603		179	modR	-	+	-	+	+	+	+
12-3870		179	modR	-	+	-	+	+	+	+
12-6353		260	multiS	-	+	-	+	-	+	+
12-6494		3449	MDR	-	+	-	+	+	+	+
13-0865		260	MDR	-	+	-	+	+	+	+
13-2025		179	modR	-	+	-	+	+	+	+
13-3298		155	modR	-	+	-	+	+	+	+
13-3423		155	modR	-	+	-	+	+	+	+
13-3753		155	modR	-	+	-	+	+	+	+
13-5627	O:6	155	modR	-	+	-	+	+	+	+
14-0294		2238	MDR	-	+	-	+	+	+	+
14-0421		2238	MDR	-	+	-	+	+	+	+
14-0652		2238	modR	-	+	-	+	+	+	+
14-2595		179	MDR	-	+	-	+	+	+	+
14-3223		2238	modR	-	+	-	+	+	+	+
14-3362		2238	multiS	-	+	-	+	+	+	+
15-0495		2455	MDR	-	+	-	+	+	-	-
15-0788		1399	modR	-	+	-	-	+	+	+
15-6548		379	MDR	-	+	-	-	-	+	+
15-7136		179	XDR	-	+	-	+	+	+	+
15-7350		179	MDR	-	+	-	+	+	+	+
08-6073		253	MDR	+	-	+	+	+	+	+
11-1196		253	MDR	+	-	+	+	+	+	+
12-1127		253	MDR	+	-	+	+	+	+	+
12-1159		253	modR	-	-	+	+	+	+	+
12-1251	O:10	253	MDR	+	-	-	+	-	+	+
12-1345		253	modR	+	-	+	+	+	+	+
12-1346		253	MDR	+	-	+	+	+	+	+
12-1371		443	modR	-	+	-	+	-	+	+
12-1802		253	MDR	+	-	+	+	+	+	+

Aislado	Serotipo	ST	Perfil de Resistencia	Efectores T3SS			Efectores T6SS			
				ExoU	ExoS	PldA	Tle3	Tse6	Tse8	TseF
12-5984		253	modR	+	-	+	+	+	+	+
12-6304		253	modR	+	-	+	+	-	-	+
13-0950		253	modR	+	-	+	+	+	-	-
13-1058		253	modR	+	-	+	+	+	+	+
13-1575		253	MDR	+	-	+	+	+	+	+
13-2077		1249	multiS	-	-	+	+	+	+	+
13-2772		253	multiS	+	-	+	+	-	-	-
13-3189		1249	modR	-	-	+	+	+	+	+
13-4111		1249	modR	-	-	+	+	+	+	+
13-4215		253	multiS	+	-	+	+	+	+	+
12-5709	O:11	446	MDR	+	-	+	-	+	+	+
13-6203		308	MDR	+	-	+	+	+	+	+
08-0034	O:12	111	MDR	-	+	-	-	+	+	+
14-0116		111	XDR	-	+	-	+	+	+	+

En concordancia con los descrito por diversos autores (241–243), el serotipo O:4 se relaciona con cepas MDR/XDR pertenecientes al clon de alto riesgo ST175, propio de un genotipo *exoS*⁺ al igual que el serotipo O:6. Los aislados pertenecientes al serotipo O:10 fueron, en su mayoría, *exoU*⁺, a excepción de los 4 aislados mencionados con anterioridad como *exoS*⁻/*exoU*⁻, y con el ST253. El serotipo O:11 se relaciona con el clon de alto riesgo ST308 y agrupó 2 aislados MDR y *exoU*⁺. El serotipo O:12 es propio del clon de alto riesgo ST111 y englobó 2 aislados MDR/XDR y *exoS*⁺. En concordancia con lo descrito por Thrane y colaboradores (158), los serotipos O:4, O:11 y O:12 englobaron aislados pertenecientes a clones de alto riesgo (en rojo). En lo referente al T6SS, pudimos establecer una relación entre las lipasas PldA y Tle3 con los serotipos y el perfil de resistencia. Como se observa en la Tabla 37, la ausencia de PldA se relacionó con los serotipos O:4, O:6 y O:12 y con los clones de alto riesgo ST111, ST155, ST179 y ST175. Por el contrario, la ausencia de PldA se relacionó con los serotipos O:11 y O:12. No encontramos relación entre Tse6, Tse8 y TseF con los serotipos o efectores del T3SS.

Los estudios en el modelo animal *G. mellonella* revelaron que los aislados pertenecientes a los clones ST2238, ST198, ST111, ST155, ST260, ST175, ST293, ST3449, ST446, ST569, ST179, ST253, ST252, ST447 y ST17 englobaron los 24 aislados más virulentos en este modelo (11 pertenecientes a la colección de FQ y 13 a la de BNFQ). Estos aislados presentaban

un genotipo *exoS⁺/pIdA⁻*, a excepción de los ST446 (12-5709) y ST253 (13-4215), que presentaban un genotipo *exoU⁺/pIdA⁺*. De manera similar, se estableció una relación entre la virulencia en modelo animal y celular. Los aislados que provocaban daño celular severo y a la vez causaban una alta mortalidad en el modelo de *G. mellonella*, eran *exoS⁺*. No observamos una relación entre la presencia del resto de efectores del T6SS con la virulencia en modelos animal y celular.

Otro de los factores de virulencia estudiados fue la formación de biofilm. Los 79 aislados fueron productores de biofilm, predominando el biofilm fuerte en 75 de ellos. Se observó que el 22,8% de las cepas produjo más biofilm que la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1. Una vez cuantificado el biofilm observamos que los valores de biofilm formado no se correspondían con el valor de la lectura del cristal violeta. Esto puede deberse en parte a que en la matriz del biofilm no solo hay ADN bacteriano, sino también exopolisacáridos y secreciones bacterianas, por tanto, es posible que un aislado a baja densidad celular tenga la capacidad de producir un biofilm fuerte, y viceversa. Los aislados provenientes de pacientes con FQ formaron una mayor cantidad de biofilm que aquellos aislados de la colección BNFQ. Uno de los principales componentes del biofilm es el alginato, cuya producción por *P. aeruginosa* es frecuente en los pulmones de pacientes de FQ y se controla por el operón *algACD*, donde *algD* regula la biosíntesis de alginato y la transcripción de las proteínas Alg (244). Todos los aislados fueron *algD⁺*, lo que confirma su capacidad productora de biofilm. La proteasas Mep72 y AprA son específicas de cepas productoras de biofilm, tienen similitud a nivel genómico y bioquímico y se diferencian en su secreción. AprA es secretada a través del T1SS mientras que Mep72 es secretada a través del sistema Xcp del T2SS (245). Los genes *aprA*, *mep72* y los codificantes del sistema Xcp (*xcpPQRSTUVWXYZ*) estuvieron presentes en los 79 aislados de este estudio.

La actividad diolsintasa de *P. aeruginosa* es responsable de la conversión del ácido oleico en las oxilipinas 10-HOME y 7,10-DiHOME. Los genes responsables de esta actividad están codificados en el operón formado por PA2077 y PA2078. Las oxilipinas inhiben la movilidad swimming y swarming pero inducen la movilidad twitching de *P. aeruginosa*, promoviendo la habilidad de la bacteria para formar biofilm *in vitro* e *in vivo* (98,99). Martínez y colaboradores (98) estudiaron el efecto de las oxilipinas en la capacidad de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 para formar biofilm y observaron que a medida que aumentaba la concentración de ácido oleico, incrementaba la capacidad de esta cepa para formar biofilm. Nuestros resultados concuerdan con lo descrito por este autor. Si bien, no todos los aislados

de ambas colecciones presentaban actividad diolsintasa, observamos que, en aquellos con dicha actividad, la formación de biofilm aumentaba en presencia de ácido oleico.

Otra de las características de *P. aeruginosa* relacionadas con la virulencia, analizadas en este estudio, fue la movilidad. En cepas de pacientes con FQ la movilidad se inhibe por la interacción con la mucina del hospedador, favoreciendo así la formación de biofilm. Una de las razones que explican la inhibición de la movilidad es que la proteína flagelar FliD, localizada en la punta del filamento se une a la mucina y restringe la rotación del flagelo, impidiendo el movimiento celular. La interacción FliD-mucina puede ser uno de los mecanismo de la célula para evitar la movilidad y facilitar la adherencia en un solo paso (246). En este trabajo observamos que bajos rangos de movilidad en los aislado pertenecientes a los clones ST175 y ST111. Además, los aislados del ST175 fueron FliD⁻, mientras que los del ST111 fueron FliD⁺. Por otro lado, los aislados con secuenciotipo ST253 y ST274 mostraron rangos de movilidad mayores, sin embargo, eran FliD⁺. Este hecho contradice lo expuesto unas líneas más arriba, sin embargo, la movilidad bacteriana es un mecanismo complejo que no puede explicarse únicamente por la presencia o ausencia de genes.

El quorum sensing (QS) interviene en la regulación de diversos factores de virulencia. Se estudió la presencia de los sistemas Las y Rhl en los 79 aislados secuenciados, y observamos que 14 aislados carecían del sistema Rhl y 77 aislados carecían del regulador LasR. La ausencia de LasR no altera la virulencia de *Pseudomonas*, pues el sistema Rhl puede compensar su efecto. Sin embargo, se ha visto que la ausencia de ambos sistemas implica la no expresión de la elastasa LasB, y con ello la disminución de la capacidad productora de biofilm (247–249). Curiosamente, los 14 aislados carentes del sistema Rhl pertenecían al ST175, el cual se asocia a cepas poco virulentas, con perfiles de resistencia MDR/XDR, secretoras de ExoS y ExoY, con baja movilidad y secreción de pigmentos. Entre estas 14 cepas predominó el perfil de resistencia MDR, el 100% presentaron el genotipo *exoS*⁺/*exoY*⁺ y bajos rangos de movilidad. Estos hallazgos se correlacionan con estudios previos que sugieren que la adquisición de mecanismos de resistencia compromete el fitness bacteriano y disminuye la virulencia (250).

Recientemente se describió que la delección de *lasR* conlleva a cambios severos en el fenotipo de las cepas con una alta importancia clínica. Las cepas con esta mutación se caracterizan por tener una morfología colonial específica, que incluye colonias planas con un tono iridiscente en la superficie. Estos mutantes también incrementan la actividad de betalactamasas, irrumpiendo en el tratamiento antibiótico y favoreciendo la pronta

adaptación de *P. aeruginosa* al ambiente pulmonar y el próximo desarrollo de un fenotipo mucoso, además de inducir una respuesta inflamatoria exagerada (251,252).

El T6SS es una nanomáquina bacteriana utilizada para inyectar efectores en células eucariotas o procariotas, además de manipular la respuesta inmune de la célula hospedadora y ser un factor clave en la competencia interbacteriana. De hecho, los microorganismos que poseen este sistema tienen ventaja dentro de una comunidad polimicrobiana (253,254), sin embargo, nuestros resultados indican que no es imprescindible su activación para que *P. aeruginosa* se imponga sobre otros microorganismos, pues como se puede apreciar en las gráficas de la Figura 49 del apartado de Resultados, la expresión del T6SS durante la competitividad parece ser cepa-dependiente, ya que las cepas *P. aeruginosa* PAO1 y Pae221 respondieron de manera diferente pese a ser la misma especie y estar en las mismas condiciones de competitividad. Mientras que el T6SS de *P. aeruginosa* PAO1 se sobreexpresa al competir con *B. cenocepacia* y *A. xylosoxidans*, el de *P. aeruginosa* Pae221 se reprime o se mantiene en niveles basales, aunque en ambos casos es *P. aeruginosa* quien supera a las otras especies competidoras.

❖ Influencia de los elementos traza en la expresión del T6SS

Como se mencionó con anterioridad, en los pulmones de pacientes con FQ se ha observado un incremento en las concentraciones de metales traza, como hierro, cobre y zinc (255). Otro de nuestros objetivos a la hora de estudiar el T6SS fue ver el efecto de estos elementos a concentraciones fisiológicas en la expresión del T6SS de aislados de pacientes con FQ. Cada aislado respondió de manera diferente ante la presencia de metales en el medio de cultivo, por lo que podríamos deducir que el efecto de dichos metales en la expresión del T6SS es cepa-dependiente.

Los sistemas H2 y H3-T6SS se inducen bajo condiciones limitadas de hierro. Muchos patógenos sobreviven en ambientes carentes de hierro, donde la transcripción de genes está regulada por hierro a través de la proteína reguladora Fur. En *P. aeruginosa* se han determinado dos cajas Fur (Fur box) en las regiones promotoras del H2-T6SS, y la transcripción de este sistema está reprimida por la presencia de hierro. En condiciones de disponibilidad de hierro se forma un complejo Fur-Fe²⁺ que se une a determinadas regiones del ADN situadas en las cajas Fur, que se encuentran entre las regiones -35 y -10 de los genes regulados por hierro. Esta unión impide el paso físico de la ARN polimerasa y con ello la transcripción génica (256).

En discordancia con esta afirmación, en los aislados 12-6353, 12-1251 y 12-1371 se observó expresión de estos sistemas en presencia de hierro. Tras comparar las secuencias de las cajas Fur de estos aislados con la caja estándar de *P. aeruginosa* PAO1 observamos diferencias entre ellas (Figura 58), lo que podría impedir su unión con el complejo Fur-Fe²⁺.

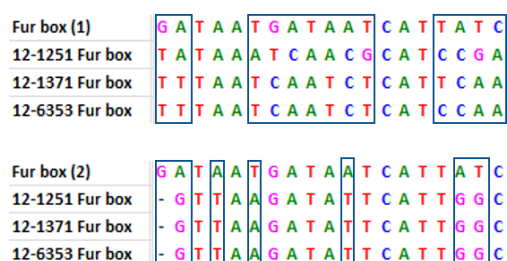


Figura 58. Alineamientos de las secuencias de las cajas Fur

Otro de los factores que intervienen en la captación de hierro es la proteína efectora TseF, secretada por el H3-T6SS. TseF interactúa con el sistema Pqs para captar hierro a través del receptor FptA y transportarlo en vesículas a través de la porina OprF (136). No se detectaron alteraciones en FptA ni en OprF, sin embargo, si se encontraron sustituciones de aminoácidos en TseF en los aislados 12-1251, 12-6353 y 12-1371, sin embargo, no podemos afirmar a ciencia cierta que estas alteraciones se relacionen con una deficiencia en la captación y transporte de hierro, por lo que son necesarios estudios complementarios de proteómica para confirmar su papel en la expresión del T6SS

En el 2019 Han y colaboradores (137) describieron que bajo condiciones limitadas de hierro se induce la expresión del sistema H2-T6SS. El regulador transcripcional CueR interviene en la homeostasis de cobre en *P. aeruginosa* y actúa como un regulador negativo de H2-T6SS, sin afectar a los sistemas H1 y H3-T6SS. La delección o alteraciones que inactiven CueR se traducen en un aumento en los niveles de Hcp2 y HsiA2, sin embargo, no se detectaron variaciones en las secuencias de CueR en comparación con la de la cepa control *P. aeruginosa* PAO1. En discordancia con lo descrito por estos autores, observamos expresión en el sistema H2-T6SS de los aislados de este estudio en presencia de cobre. CueR se une a las secuencias de ADN incluidas en las regiones promotoras de *hsiA2* y *hcp2* (CueR binding site) indicadas en la Figura 59. Tras comparar estas secuencias con las de los aislados clínicos, observamos ciertas variaciones en todos los aislados, a excepción del 12-6353, la cuales podrían impedir la unión de CueR, induciendo así la actividad del H2-T6SS.

CueR binding site (hsiA2)	A A T A G G A A A A T T C C C A A A G A G G A A T G T C C T G T T
14-3223 CueR binding site	A A T A G G A A A A T G A T T T T C A T T G A A G T C T G C G C G C
12-1251 CueR binding site	A A T A G G A A A A T T T A T G A G T T T G T A G T T A A G C A C T
12-1371 CueR binding site	A A T A G G A A A A T G A T T T T C A T T G A A G T C T G C G C G C
12-6353 CueR binding site	A A T A G G A A A A T T C C C A A A G A G G A A T G T C C T G T T

CueR binding site (hcp2)	T C C G A G A G A G T G C G C A A C T T T T T G C A A G C G G T G C G C A A A A A G T T G C G C A A
14-3223 CueR binding site	T C C G A G A G A G T G C G C A A C T T T T T G C A A G C G G T G C G C A A A A A G T T G C G C A A
12-1251 CueR binding site	T C C G A G A G A G T G C G C A A C T T T T T G C A A G C G G T G C G C A A A A A G T T G C G C A A
12-1371 CueR binding site	T C C G A G A G A G T G C G C A A C T T T T T G C A A G C G G T G C G C A A A A A G T T G C G C A A
12-6353 CueR binding site	T C C G A G A G A G T G C G C A A C T T T T T G C A A G C G G T G C G C A A A A A G T T G C G C A A

Figura 59. Alineamiento de los sitios de unión de CueR a las regiones promotoras del H2-T6SS

La porina OprC actúa como un canal de paso de la azurina (Azu), una proteína transportadora de cobre secretada por el H2-T6SS. De haber mutaciones que alteren la funcionalidad de esta porina, su unión con el complejo Azu-Cu²⁺ no se llevará a cabo y por tanto el sistema H2-T6SS se activará (137). Tras comparar la secuencias de OprC de los aislados clínicos con la secuencia de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 se encontraron las sustituciones aminoacídicas V₁₉₈I en el aislado 14-3223 y S₄₀₁N en el 12-6353, que podrían alterar el funcionamiento de la porina, aunque son necesarios estudios complementarios de mutagénesis que nos permitan determinar el impacto exacto de estas alteraciones.

Un ambiente rico en zinc induce la activación del H1-T6SS, sin embargo, en el aislado 12-6353 observamos la represión de este. La captación de zinc está mediada por el gen *zur*, el cual tiene 8 sitios de unión distribuidos a lo largo del cromosoma de *P. aeruginosa* (257–259). No se detectaron variaciones en las secuencias de este sitio de unión en las cepas clínicas con respecto al de la cepa de referencia. Se requieren estudios complementarios de proteómica que permitan conocer a fondo los reguladores que intervienen en la captación y expulsión de zinc y así establecer una relación entre la activación del T6SS y la presencia de este metal.

Como ya se ha explicado con anterioridad, el H1-T6SS juega un papel importante en la producción de toxinas y competitividad interbacteriana. Según Jones y colaboradores, la inducción de este sistema solo ocurre bajo una ruta Gac/Rsm funcional, y demostraron que a concentraciones subinhibitorias de kanamicina, no solo se favorecía la formación de biofilm, sino que se inducía la expresión de genes del H1-T6SS en la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAK (92). Tras estudiar el efecto de gentamicina, como otro antibiótico del grupo de aminoglucósidos utilizado en la clínica, observamos que había tanto expresión como represión de los genes del H1-T6SS en los aislados clínicos de nuestro estudio, lo que contradice lo

descrito por estos autores. Ho y colaboradores (134), observaron la activación del sistema H1-T6SS bajo la acción de polimixina B. Nuevamente observamos comportamientos independientes en los aislados clínicos, donde el 13-3298 mostraba altos niveles de expresión en *hcp1*, mientras que en el resto de los aislados, incluyendo la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1, este gen estaba reprimido.

Dentro de las limitaciones de este trabajo se encuentran la falta de estudios de proteómica y transcriptómica, que permitirían identificar otros mecanismos responsables de la patogenicidad y variabilidad de la expresión génica entre los aislados. Estudios de mutagénesis nos permitirían conocer el impacto de las mutaciones encontradas en los genes de resistencia a antibióticos, así como el efecto de los determinantes de virulencia en la patogenicidad de *P. aeruginosa*. No obstante, La caracterización de ambas colecciones es un paso previo y necesario para modelos más sofisticados que permitan entender la patogénesis de estas enfermedades.

CONCLUSIONES

1. Colistina fue el antibiótico más eficaz entre los aislados de FQ (72,3% de aislados sensibles) y amikacina lo fue entre los aislados de BNFQ (80% de aislados sensibles). Todos los aislados fueron intermedios/resistentes a aztreonam, cefepime, ceftazidima, piperacilina, piperacilina-tazobactam, imipenem, levofloxacino y ciprofloxacino. En ambas colecciones predominó un fenotipo MDR (59% de aislados de la colección de FQ y 75% de la colección de BNFQ).
2. Ambas colecciones se caracterizaron por su policlonalidad, encontrándose clones de alto riesgo (ST111, ST155, ST175, ST179, ST308, ST446), epidémicos (ST274) e intercontinentales (ST17, ST198, ST252, ST253, ST313, ST455, ST560 y ST569).
3. Se describe por primera vez el ST3449 en cepas con fenotipo predominante MDR, aisladas de un único paciente.
4. Los serotipos predominantes en ambas colecciones fueron O:4, O:6, O:10, O:11 y O:12. Estos serotipos se relacionan con aislados de *P. aeruginosa* en infecciones nosocomiales.
5. El resistoma mutacional de los aislados estuvo formado por numerosas mutaciones y polimorfismos, muchos de los cuales no habían sido previamente descritos en la literatura, y cuya implicación en la resistencia debe ser aún determinada.
6. La resistencia a aminoglucósidos en los aislados de *P. aeruginosa* secuenciados se debe a la presencia de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, mutaciones en los factores de elongación y a la sobreexpresión de la bomba MexXY-OprM.
7. La resistencia a betalactámicos se debe a la hiperproducción de AmpC, a la presencia de PDC y oxacilinasas y a la pérdida de la porina OprD. No se encontraron carbapenemasas en los aislados secuenciados.
8. Las mutaciones en las regiones QRDR, la presencia del gen *crpP* en el cromosoma bacteriano y la sobreexpresión de la bomba MexCD-OprJ explican los altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas en los aislados secuenciados.

9. las mutaciones en el transportador GlpT, así como la presencia de la enzima FosA, explican la resistencia a fosfomicina de los aislados de *P. aeruginosa* secuenciados. No fue posible explicar la resistencia de los aislados a colistina según las mutaciones encontradas.
10. Se identificó un amplio rango de genes de virulencia en ambas colecciones de aislados. Los aislados de BNFQ se caracterizaban por tener un mayor número de genes de virulencia que los aislados de FQ. El genotipo *exoS* predominó sobre *exoU*, lo que indica la prevalencia de aislados invasivos.
11. Se encontró una estrecha relación entre los serotipos O:4, O:6 y O:12 con el genotipo *exoS*⁺/*pldA*⁻ y O:11 con el genotipo *exoU*⁺/*pldA*⁺. Los serotipos O:4, O:10 y O:12 se relacionaron con los secuenciotipos ST175, ST253 y ST111, respectivamente. Los aislados con serotipos O:6 y O:11 pertenecían a distintos ST. El serotipo O:4 fue propio de aislados multirresistentes.
12. Se demostró que las cepas con actividad diolsintasa en presencia de ácido oleico sobreexpresaban el operón PA2077-PA2078, lo cual estaba directamente relacionado con un aumento en la producción de biofilm en *P. aeruginosa* debido al efecto de las oxilipinas.
13. Los aislados pertenecientes a los secuenciotipos ST198, ST293, ST1399, ST446, ST3449, ST111 (colección FQ) y ST312, ST313, ST252 y 447 (colección BNFQ) mostraron una alta virulencia en el modelo animal.
14. La expresión del T6SS en presencia de hierro, cobre, zinc y concentraciones subinhibitorias de gentamicina e imipenem, resultó ser cepa-dependiente.

REFERENCIAS

1. Diggle SP, Whiteley M. Microbe profile: *Pseudomonas aeruginosa*: Opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiol (United Kingdom)*. 2020;166(1):30–3.
2. 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).
3. Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SF, Shao J, Tompkins RG, Ausubel FM. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science (80-)*. 1995;268(5219).
4. Roy PH, Tetu SG, Larouche A, Elbourne L, Tremblay S, Ren Q, et al. Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS One*. 2010;5(1).
5. Freschi L, Vincent AT, Jeukens J, Emond-Rheault JG, Kukavica-Ibrulj I, Dupont MJ, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on Its Population Structure, Horizontal Gene Transfer, and Pathogenicity. *Genome Biol Evol*. 2019;11(1).
6. Gómez Alvarez C, Leal Castro A, Pérez de González M de, Navarrete Jiménez M. Mecanismos de resistencia en *pseudomonas aeruginosa*: entiendo a un peligroso enemigo. *Rev Fac Med*. 2005;
7. Gellatly SL, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis*. 2013;
8. Bush L, Schmidt C, Perez Maria. Infecciones por *Pseudomonas* y patógenos relacionados - Enfermedades infecciosas. *Manual MSD*. 2016.
9. Başak Çoruh. *Manual MSD - Bronquiectasias* [Internet]. 2019. Available from: www.msmanuals.com
10. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. Vol. 15, *Clinical Microbiology Reviews*. 2002. p. 194–222.
11. Bhagirath AY, Li Y, Somayajula D, Dadashi M, Badr S, Duan K. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulm Med*. 2016;16(1).
12. Blanchard AC, Waters VJ. Microbiology of Cystic Fibrosis Airway Disease. *Semin Respir Crit Care Med*. 2019;40(6).
13. Frayman KB, Armstrong DS, Grimwood K, Ranganathan SC. The airway microbiota in early cystic fibrosis lung disease. *Pediatr Pulmonol*. 2017;52(11).
14. Aquino R, Gonzáles E, Samaniego S, Rivera J, Cedeño V, Urbina Y, et al. Caracterización molecular de bacterias patógenas de las vías respiratorias de pacientes peruanos con fibrosis quística. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2017;
15. Smith DJ, Anderson GJ, Bell SC, Reid DW. Elevated metal concentrations in the CF

- airway correlate with cellular injury and disease severity. *J Cyst Fibros*. 2014;13(3).
16. Caille O, Rossier C, Perron K. A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2007;189(13).
 17. Winstanley C, O'Brien S, Brockhurst MA. *Pseudomonas aeruginosa* Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. *Trends in Microbiology*. 2016.
 18. Sousa AM, Pereira MO. *Pseudomonas Aeruginosa* diversification during infection development in cystic fibrosis Lungs-A review. *Pathogens*. 2014.
 19. Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017.
 20. Alós J-I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;
 21. Alarma por la resistencia a antimicrobianos: situación actual y desafíos. *Rev MEDICA DEL URUGUAY*. 2017;
 22. Zaman S Bin, Hussain MA, Nye R, Mehta V, Mamun KT, Hossain N. A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*. 2017;
 23. Martínez-Martínez L, Calvo J. Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: Causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;
 24. Larrosa MN, Benito N, Cantón R, Canut A, Cercenado E, Fernández-Cuenca F, et al. From CLSI to EUCAST, a necessary step in Spanish laboratories. Vol. 38, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Elsevier Doyma; 2020. p. 79–83.
 25. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, 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;
 26. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, et al. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;
 27. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*. 2016.
 28. WHO. WHO priority pathogens list for R&D of new antibioticse. <http://www.who.int/en/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. 2017.

29. Calvo J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;
30. Gobernado M. Fosfomicina. *Revista Espanola de Quimioterapia.* 2003.
31. Alós JI. Quinolonas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;
32. Vignoli R, Seija V. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. In: *Temas de bacteriología y virología médica.* 2008. p. 649–62.
33. Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Journal of the Royal Society of Medicine, Supplement.* 2002.
34. López-Causapé C, Cabot G, del Barrio-Tofiño E, Oliver A. The versatile mutational resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology.* 2018.
35. Troncoso C, Pavez M, Santos A, Salazar R, Barrientos Díaz L. Implicancias estructurales y fisiológicas de la célula bacteriana en los mecanismos de resistencia antibiótica. *Int J Morphol.* 2017;
36. Bandyopadhyaya A, Kesarwani M, Que YA, He J, Padfield K, Tompkins R, et al. The Quorum Sensing Volatile Molecule 2-Amino Acetophenon Modulates Host Immune Responses in a Manner that Promotes Life with Unwanted Guests. *PLoS Pathog.* 2012;
37. Díez-Aguilar M, Cantón R. New microbiological aspects of fosfomicin. *Revista española de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia.* 2019.
38. El'Garch F, Jeannot K, Hocquet D, Llanes-Barakat C, Plésiat P. Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(3).
39. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. Vol. 5, *Frontiers in Microbiology.* 2014.
40. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews.* 2009.
41. Tamber S, Ochs MM, Hancock REW. Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2006;
42. Ochs MM, Bains M, Hancock REW. Role of putative loops 2 and 3 in imipenem passage through the specific porin OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;
43. Gutiérrez O, Juan C, Cercenado E, Navarro F, Bouza E, Coll P, et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;
44. Huang H, Jeanteur D, Pattus F, Hancock REW. Membrane topology and site-specific

- mutagenesis of *Pseudomonas aeruginosa* porin OprD. *Mol Microbiol*. 1995;
45. Attr e I. *P. aeruginosa* type vi secretion machinery: Another deadly syringe. In: *Pseudomonas: Volume 7: New Aspects of Pseudomonas Biology*. 2015.
 46. 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. *International Journal of Medical Microbiology*. 2012.
 47. Epp SF, K hler T, Plésiat P, Mich a-Hamzehpour M, Frey J, Pechère JC. C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;
 48. 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).
 49. Samanta S, Scorciapino MA, Ceccarelli M. Molecular basis of substrate translocation through the outer membrane channel OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *Phys Chem Chem Phys*. 2015;17(37).
 50. Dean CR, Goldberg JB. *Pseudomonas aeruginosa* galU is required for a complete lipopolysaccharide core and repairs a secondary mutation in a PA103 (serogroup O11) wbpM mutant. *FEMS Microbiol Lett*. 2002;210(2).
 51. Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2015;
 52. Neves PR, Mamizuka EM, Levy CE, Lincopan N. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: An endemic problem in Brazil. *J Bras Patol e Med Lab*. 2011;
 53. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - A phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*. 2009.
 54. De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ, Srikumar R, Ceri H, Poole K, et al. Multidrug efflux pumps: Expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;
 55. Purssell A, Poole K. The NfxB repressor of the mexCD-oprJ multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol (United Kingdom)*. 2013;
 56. Poole K, Gotoh N, Tsujimoto H, Zhao Q, Wada A, Yamasaki T, et al. Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB -type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* . *Mol Microbiol*. 1996 Aug;21(4):713–25.
 57. Maseda H, Uwate M, Nakae T. Transcriptional regulation of the mexEF-oprN multidrug

- efflux pump operon by MexT and an unidentified repressor in nfxC-type mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett. 2010;
58. Köhler T, Epp SF, Curty LK, Pechère JC. Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 1999;
 59. Sobel ML, Neshat S, Poole K. Mutations in PA2491 (mexS) promote MexT-dependent mexEF-oprN expression and multidrug resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2005;
 60. Uwate M, Ichise Y, Shirai A, Omasa T, Nakae T, Maseda H. Two routes of MexS-MexT-mediated regulation of MexEF-OprN and MexAB-OprM efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Immunol. 2013;
 61. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Contribution of the MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2000;
 62. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Mexxy multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. Frontiers in Microbiology. 2012.
 63. López Velandia DP, Torres Caycedo MI, Prada Quiroga CF. Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. Univ y Salud. 2016;
 64. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2011.
 65. Martínez Rojas DDV. Betalactamasas tipo AmpC: Generalidades y métodos para detección fenotípica. Rev Soc Venez Microbiol. 2009;
 66. Nicolau CJ, Oliver A. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;
 67. Bonnin RA, Bogaerts P, Girlich D, Huang TD, Dortet L, Glupczynski Y, et al. Molecular characterization of OXA-198 carbapenemase-producing *pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2018;62(6).
 68. Zincke D, Balasubramanian D, Silver LL, Mathee K. Characterization of a carbapenem-hydrolyzing enzyme, PoxB, in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(2).
 69. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the max. Front Microbiol. 2011;
 70. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist Updat. 2010;13(6):151–71.
 71. Vaziri F, Peerayeh SN, Nejad QB, Farhadian A. The prevalence of aminoglycoside-

- modifying enzyme genes (aac (6')-I, aac (6')-II, ant (2'')-I, aph (3')-VI) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinics*. 2011;
72. Teixeira B, Rodulfo H, Carreño N, Guzmán M, Salazar E, Dedonato M. Aminoglycoside resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cumana, Venezuela. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2016;
 73. Chávez-Jacobo VM, Hernández-Ramírez KC, Romo-Rodríguez P, Pérez-Gallardo RV, Campos-García J, Félix Gutiérrez-Corona J, et al. CrpP is a novel ciprofloxacin-modifying enzyme encoded by the *pseudomonas aeruginosa* pUM505 plasmid. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(6).
 74. Wong A, Kassen R. Parallel evolution and local differentiation in quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 2011.
 75. Doi Y, Arakawa Y. 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. *Clin Infect Dis*. 2007;
 76. Parkins MD, Somayaji R, Waters VJ. Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis. Vol. 31, *Clinical microbiology reviews*. 2018.
 77. Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Zamorano L, Juan C, et al. Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(11).
 78. Paz-Zarza VM, Mangwani-Mordani S, Martínez-Maldonado A, Álvarez-Hernández D, Solano-Gálvez SG, Vázquez-López R. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Rev Chil infectología*. 2019;
 79. Chen L, Yang J, Yu J, Yao Z, Sun L, Shen Y, et al. VFDB: A reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res*. 2005;
 80. Alhazmi A. *Pseudomonas aeruginosa* – Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms. *Int J Biol*. 2015;7(2).
 81. Bucior I, Pielage JF, Engel JN. *Pseudomonas aeruginosa* Pili and Flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. *PLoS Pathog*. 2012;
 82. Lasa I, Del Pozo JL, Penadés JR, Leiva J. Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2005.
 83. Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. Vol. 5, *Future Microbiology*. 2010. p. 1663–74.
 84. Alav I, Sutton JM, Rahman KM. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(8).

85. Harmsen M, Yang L, Pamp SJ, Tolker-Nielsen T. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2010.
86. Fazli M, Almlad H, Rybtke ML, Givskov M, Eberl L, Tolker-Nielsen T. Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *Environmental Microbiology*. 2014.
87. Whitney JC, Whitfield GB, Marmont LS, Yip P, Neculai AM, Lobanov YD, et al. Dimeric c-di-GMP is required for post-translational regulation of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*. 2015;
88. Wei Q, Leclercq S, Bhasme P, Xu A, Zhu B, Zhang Y, et al. Diguanylate cyclases and phosphodiesterases required for basal-level c-di-GMP in *Pseudomonas aeruginosa* as revealed by systematic phylogenetic and transcriptomic analyses. *Appl Environ Microbiol*. 2019 Nov;85(21).
89. Baraquet C, Murakami K, Parsek MR, Harwood CS. The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the Pel operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Res*. 2012;
90. Merighi M, Lory S. Second messenger c-di-GMP signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Pseudomonas*. 2006.
91. Sonnleitner E, González N, Haas D. Small RNAs of *Pseudomonas* spp. In: *Pseudomonas*. 2006.
92. Jones C, Allsopp L, Horlick J, Kulasekara H, Filloux A. Subinhibitory concentration of kanamycin induces the *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system. *PLoS One*. 2013;
93. Azam MW, Khan AU. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. Vol. 24, *Drug Discovery Today*. 2019.
94. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*. 2014;
95. Venturi V. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2006.
96. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*. 2014;6(1).
97. Asfahl KL, Schuster M. Additive effects of quorum sensing anti-activators on *Pseudomonas aeruginosa* virulence traits and transcriptome. *Front Microbiol*. 2018;8(JAN).
98. Martínez E, Campos-Gómez J. Oxylipins produced by *Pseudomonas aeruginosa* promote

- biofilm formation and virulence. *Nat Commun.* 2016;7.
99. Martínez E, Cosnahan RK, Wu M, Gadila SK, Quick EB, Mobley JA, et al. Oxylipins mediate cell-to-cell communication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Commun Biol.* 2019;2(1).
 100. Filloux A. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An essay on diversity, evolution, and function. Vol. 2, *Frontiers in Microbiology.* 2011.
 101. Pena RT, Blasco L, Ambroa A, González-Pedrajo B, Fernández-García L, López M, et al. Relationship between quorum sensing and secretion systems. *Frontiers in Microbiology.* 2019.
 102. Green ER, Meccas J. Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol Spectr.* 2016;
 103. Bocian-Ostrzycka KM, Grzeszczuk MJ, Banaś AM, Jagusztyn-Krynicka EK. Bacterial thiol oxidoreductases — from basic research to new antibacterial strategies. Vol. 101, *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2017.
 104. Natale P, Brüser T, Driessen AJM. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane-Distinct translocases and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes.* 2008.
 105. Burdette LA, Leach SA, Wong HT, Tullman-Ercek D. Developing Gram-negative bacteria for the secretion of heterologous proteins. Vol. 17, *Microbial Cell Factories.* 2018.
 106. Py B, Loiseau L, Barras F. An inner membrane platform in the type II secretion machinery of Gram-negative bacteria. *EMBO Rep.* 2001;
 107. Korotkov K V., Sandkvist M, Hol WGJ. The type II secretion system: Biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nature Reviews Microbiology.* 2012.
 108. Galle M, Carpentier I, Beyaert R. Structure and Function of the Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protein Pept Sci.* 2013;13(8).
 109. Francis MS, Amer AAA, Milton DL, Costa TRD. Site-directed mutagenesis and its application in studying the interactions of T3S components. In: *Methods in Molecular Biology.* 2017.
 110. Horna G, Amaro C, Palacios A, Guerra H, Ruiz J. High frequency of the *exoU*⁺/*exoS*⁺ genotype associated with multidrug-resistant “high-risk clones” of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Peruvian hospitals. *Sci Rep.* 2019;9(1).
 111. Jones C, Hachani A, Manoli E, Filloux A. An *rhs* gene linked to the second type VI secretion cluster is a feature of the *pseudomonas aeruginosa* strain PA14. *J Bacteriol.* 2014;196(4).
 112. Bleves S, Viarre V, Salacha R, Michel GPF, Filloux A, Voulhoux R. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. Vol. 300,

- International Journal of Medical Microbiology. Elsevier GmbH; 2010. p. 534–43.
113. Barret M, Egan F, Fargier E, Morrissey JP, O’Gara F. Genomic analysis of the type VI secretion systems in *Pseudomonas* spp.: Novel clusters and putative effectors uncovered. *Microbiology*. 2011;157(6).
 114. Bernal P, Llamas MA, Filloux A. Type VI secretion systems in plant-associated bacteria. Vol. 20, *Environmental Microbiology*. 2018.
 115. Chen L, Zou Y, She P, Wu Y. Composition, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological Research*. 2015.
 116. Russell AB, Peterson SB, Mougous JD. Type VI secretion system effectors: Poisons with a purpose. Vol. 12, *Nature Reviews Microbiology*. 2014. p. 137–48.
 117. Ho BT, Dong TG, Mekalanos JJ. A view to a kill: The bacterial type VI secretion system. Vol. 15, *Cell Host and Microbe*. Cell Press; 2014. p. 9–21.
 118. Förster A, Planamente S, Manoli E, Lossi NS, Freemont PS, Filloux A. Coevolution of the ATPase ClpV, the sheath proteins TssB and TssC, and the accessory protein TagJ/HsiE1 distinguishes type VI secretion classes. *J Biol Chem*. 2014;
 119. Cianfanelli FR, Monlezun L, Coulthurst SJ. Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. *Trends in Microbiology*. 2016.
 120. Jiang F, Waterfield NR, Yang J, Yang G, Jin Q. A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion phospholipase D effector targets both prokaryotic and eukaryotic cells. *Cell Host Microbe*. 2014;
 121. SecReT6 [Internet]. Available from: <https://db-mml.sjtu.edu.cn/SecReT6/index.php>
 122. LaCourse KD, Peterson SB, Kulasekara HD, Radey MC, Kim J, Mougous JD. Conditional toxicity and synergy drive diversity among antibacterial effectors. *Nat Microbiol*. 2018;
 123. Wettstadt S, Filloux A. Manipulating the type VI secretion system spike to shuttle passenger proteins. *PLoS One*. 2020;15(2).
 124. Hachani A, Allsopp LP, Oduko Y, Filloux A. The VgrG proteins are “à la carte” delivery systems for bacterial type VI effectors. *J Biol Chem*. 2014;289(25).
 125. Nolan LM, Cain AK, Manoli E, Sainz-Polo MA, Dougan G, Mavridou DAI, et al. Discovery of a *Pseudomonas aeruginosa* Type VI secretion system toxin targeting 1 bacterial protein synthesis using a global genomics approach 2 3.
 126. Pissaridou P, Allsopp LP, Wettstadt S, Howard SA, Mavridou DAI, Filloux A. The *Pseudomonas aeruginosa* T6SS-VgrG1b spike is topped by a PAAR protein eliciting DNA damage to bacterial competitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;
 127. Wettstadt S, Lai EM, Filloux A. Solving the Puzzle: Connecting a Heterologous *Agrobacterium tumefaciens* T6SS Effector to a *Pseudomonas aeruginosa* Spike

- Complex. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10.
128. Whitney JC, Beck CM, Goo YA, Russell AB, Harding BN, De Leon JA, et al. Genetically distinct pathways guide effector export through the type VI secretion system. *Mol Microbiol.* 2014;
 129. Sana TG, Berni B, Bleves S. The T6SSs of *Pseudomonas aeruginosa* strain pao1 and their effectors: Beyond bacterial-cell targeting. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2016.
 130. Bernard CS, Brunet YR, Gueguen E, Cascales E. Nooks and crannies in type VI secretion regulation. *Journal of Bacteriology.* 2010.
 131. Silverman JM, Brunet YR, Cascales E, Mougous JD. Structure and Regulation of the Type VI Secretion System. *Annu Rev Microbiol.* 2012;
 132. Brencic A, McFarland KA, McManus HR, Castang S, Mogno I, Dove SL, et al. The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Mol Microbiol.* 2009;
 133. Lin JS, Pissaridou P, Wu HH, Tsai MD, Filloux A, Lai EM. TagF-mediated repression of bacterial type VI secretion systems involves a direct interaction with the cytoplasmic protein Fha. *J Biol Chem.* 2018;
 134. Ho BT, Basler M, Mekalanos JJ. Type 6 secretion system-mediated immunity to type 4 secretion system-mediated gene transfer. *Science (80-).* 2013;342(6155).
 135. Burtnick MN, Brett PJ. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* Cluster 1 Type VI Secretion System Gene Expression Is Negatively Regulated by Iron and Zinc. *PLoS One.* 2013;8(10).
 136. Lin J, Zhang W, Cheng J, Yang X, Zhu K, Wang Y, et al. A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. *Nat Commun.* 2017;8.
 137. Han Y, Wang T, Chen G, Pu Q, Liu Q, Zhang Y, et al. A *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system regulated by CueR facilitates copper acquisition. *PLoS Pathog.* 2019;15(12).
 138. Medeiros AA, O'Brien TF, Wacker WEC, Yulug NF. Effect of salt concentration on the apparent in-vitro susceptibility of *pseudomonas* and other gram-negative bacilli to gentamicin. *J Infect Dis.* 1971;124.
 139. Ocampo-Sosa AA, Fernández-Martínez M, Cabot G, Peña C, Tubau F, Oliver A, et al. Draft genome sequence of the quorum-sensing and biofilmproducing *Pseudomonas aeruginosa* strain Pae221, belonging to the epidemic high-risk clone sequence type 274.

- Genome Announc. 2015;3(1).
140. Clinical and Laboratory Standards Institute C. M100- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement An informational supplement for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement M100-S15.\r. 2017.
 141. Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, et al. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(12).
 142. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25(4).
 143. Römling U, Grothues D, Koopmann U, Jahnke B, Greipel J, Tümmler B. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of a *Pseudomonas aeruginosa* pathovar. *Electrophoresis.* 1992;13(1).
 144. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V., Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology.* 1995.
 145. Quijada NM, Rodríguez-Lázaro D, Eiros JM, Hernández M, Valencia A. TORMES: An automated pipeline for whole bacterial genome analysis. *Bioinformatics.* 2019;
 146. 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;
 147. Walker BJ, Abeel T, Shea T, Priest M, Abouelliel A, Sakthikumar S, et al. Pilon: An integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One.* 2014;9(11).
 148. Chaumeil PA, Mussig AJ, Hugenholtz P, Parks DH. GTDB-Tk: A toolkit to classify genomes with the genome taxonomy database. *Bioinformatics.* 2020;36(6).
 149. Seemann T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* 2014;
 150. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, et al. Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics.* 2015;
 151. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. Fasttree: Computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol Biol Evol.* 2009;
 152. Seemann T. roary2svg [Internet]. Available from: <https://github.com/sanger->

pathogens/Roary/blob/master/contrib/roary2svg/roary2svg.pl

153. PubMLST [Internet]. Available from: <https://pubmlst.org/>
154. Seemann T. ABRicate [Internet]. Available from: <https://github.com/tseemann/abricate>
155. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012;
156. McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, et al. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;
157. Carattoli A, Zankari E, Garcíá-Fernández A, Larsen MV, Lund O, Villa L, et al. In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(7).
158. Thrane SW, Taylor VL, Lund O, Lam JS, Jelsbak L. Application of whole-genome sequencing data for o-specific antigen analysis and in silico serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J Clin Microbiol.* 2016;54(7).
159. Azimi S, Kafil HS, Baghi HB, Shokrian S, Najaf K, Asgharzadeh M, et al. Presence of *exoY*, *exoS*, *exoU* and *exoT* genes, antibiotic resistance and biofilm production among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Northwest Iran. *GMS Hyg Infect Control.* 2016;11.
160. Kavanagh K, Reeves EP. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews.* 2004.
161. www.probiotek.com/productos/reactivos/otros/a549gfp-cell-line/.
162. Ramos-Vivas J, Pilares-Ortega L, Remuzgo-Martínez S, Padilla D, Gutiérrez-Díaz JL, Navas-Méndez J. *Rhodococcus equi* human clinical isolates enter and survive within human alveolar epithelial cells. *Microbes Infect.* 2011;13(5).
163. Rybtke MT, Borlee BR, Murakami K, Irie Y, Hentzer M, Nielsen TE, et al. Fluorescence-based reporter for gauging cyclic Di-GMP levels in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(15).
164. Hayashi MN, Diego S, Jolla L. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Vol. 38, *Nucleic acids research.* 2010.
165. Govan JRW, Doherty CJ, Nelson JW, Brown PH, Greening AP, Maddison J, et al. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *Lancet.* 1993;342(8862).
166. García Castellanos T, Castillo Marshal A, Salazar Rodríguez D. Mechanisms of resistance to beta-lactams in Gram-negative bacteria. *Rev Cuba Salud Publica.* 2014;
167. Cabot G, López-Causapé C, Ocampo-Sosa AA, Sommer LM, Domínguez MÁ, Zamorano L, et al. Deciphering the resistome of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* sequence

- type 175 international high-risk clone through whole-genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(12).
168. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the max. *Front Microbiol.* 2011;2(APR).
 169. Tsutsumi Y, Tomita H, Tanimoto K. Identification of novel genes responsible for overexpression of ampC in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(12).
 170. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(12).
 171. Köhler T, Michéa-Hamzehpour M, Henze U, Gotoh N, Curty LK, Pechère JC. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 1997;
 172. Estepa V, Rojo-Bezares B, Azcona-Gutiérrez JM, Olarte I, Torres C, Sáenz Y. Characterisation of carbapenem-resistance mechanisms in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered in a Spanish hospital. *Enfermedades Infecc y Microbiol Clin (English ed).* 2017;35(3).
 173. Jansen G, Mahrt N, Tueffers L, Barbosa C, Harjes M, Adolph G, et al. Association between clinical antibiotic resistance and susceptibility of *Pseudomonas* in the cystic fibrosis lung. *Evol Med Public Heal.* 2016;2016(1):182–94.
 174. FERNÁNDEZ V P, JIMÉNEZ P P. Bronquiectasias: ¿No es más una enfermedad huérfana? *Rev Chil enfermedades Respir.* 2016;32(3).
 175. Pasantes J del PS. BRONQUIECTASIAS: PATÓGENOS MÁS FRECUENTES Y SU SENSIBILIDAD IN VITRO A ANTIMICROBIANOS. *Enfermedades del tórax Sociedad Peruana de Neumología.* 2002;45:14–22.
 176. Pedersen SS, Koch C, Heiby N, Rosendal K. An epidemic spread of multiresistant *pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis centre. *J Antimicrob Chemother.* 1986 Apr;17(4):505–16.
 177. López-Causapé C, Sommer LM, Cabot G, Rubio R, Ocampo-Sosa AA, Johansen HK, et al. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* mutational resistome in an international Cystic Fibrosis clone. *Sci Rep.* 2017;7(1).
 178. García-Castillo M, Del Campo R, Morosini MI, Riera E, Cabot G, Willems R, et al. Wide dispersion of ST175 clone despite high genetic diversity of carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in 16 Spanish hospitals. *J Clin Microbiol.* 2011;49(8).

179. Oliver A. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* : Role of high-risk clones in multidrug resistance. *Enfermedades Infecc y Microbiol Clin (English ed)*. 2017;35(3).
180. de Sales RO, Migliorini LB, Puga R, Kocsis B, Severino P. A Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2020;11.
181. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. Vols. 21–22, *Drug Resistance Updates*. 2015.
182. Rodrigues YC, Furlaneto IP, Pinto Maciel AH, Garcia Quaresma AJP, de Matos ECO, Conceição ML, et al. High prevalence of atypical virulotype and genetically diverse background among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a referral hospital in the Brazilian Amazon. *PLoS One*. 2020;15(9 September).
183. Cramer N, Klockgether J, Wrasman K, Schmidt M, Davenport CF, Tümmler B. Microevolution of the major common *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14 in cystic fibrosis lungs. *Environ Microbiol*. 2011;13(7).
184. Fischer S, Dethlefsen S, Klockgether J, Tümmler B. Phenotypic and Genomic Comparison of the Two Most Common ExoU-Positive *Pseudomonas aeruginosa* Clones, PA14 and ST235. Langelier C, editor. *mSystems*. 2020 Dec;5(6).
185. Estepa V, Rojo-Bezares B, Torres C, Sáenz Y. Faecal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in healthy humans: Antimicrobial susceptibility and global genetic lineages. *FEMS Microbiol Ecol*. 2014;89(1).
186. Hong JS, Choi N, Kim SJ, Choi KH, Roh KH, Lee S. Molecular Characteristics of GES-Type Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Long-Term Care Facilities and General Hospitals in South Korea. *Microb Drug Resist*. 2020;26(6).
187. Jeanvoine A, Meunier A, Puja H, Bertrand X, Valot B, Hocquet D. Contamination of a hospital plumbing system by persister cells of a copper-tolerant high-risk clone of *Pseudomonas aeruginosa*. *Water Res*. 2019;157.
188. Abdouchakour F, Aujoulat F, Licznar-Fajardo P, Marchandin H, Toubiana M, Parer S, et al. Intraclonal variations of resistance and phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clone ST308: A key to success within a hospital? *Int J Med Microbiol*. 2018;308(2).
189. Petit SMC, Lavenir R, Colinon-Dupuich C, Boukerb AM, Cholley P, Bertrand X, et al. Lagooning of wastewaters favors dissemination of clinically relevant *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Microbiol*. 2013;164(8).
190. Zamorano L, Reeve TM, Deng L, Juan C, Moyá B, Cabot G, et al. NagZ inactivation prevents and reverts β -lactam resistance, driven by AmpD and PBP 4 mutations, in

- Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(9).
191. Moya B, Dötsch A, Juan C, Blázquez J, Zamorano L, Haussler S, et al. β -lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS Pathog*. 2009;5(3).
 192. Berrazeg M, Jeannot K, Ntsogo Enguéné VY, Broutin I, Loeffert S, Fournier D, et al. Mutations in β -Lactamase AmpC Increase Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Antipseudomonal Cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(10).
 193. Subedi D, Vijay AK, Kohli GS, Rice SA, Willcox M. Association between possession of ExoU and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*. 2018;13(9).
 194. Cabot G, Zamorano L, Moyà B, Juan C, Navas A, Blázquez J, et al. Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance and fitness under low and high mutation rates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(3).
 195. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters [Internet]. Available from: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints
 196. Del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Cabot G, Rivera A, Benito N, Segura C, et al. Genomics and susceptibility profiles of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(11).
 197. Aguilera Rossi CG, Gómez-Puertas P, Ayala Serrano JA. In vivo functional and molecular characterization of the Penicillin-Binding Protein 4 (DacB) of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol*. 2016;16(1).
 198. Girlich D, Naas T, Nordmann P. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(6).
 199. Naas T, Oueslati S, Bonnin RA, Dabos ML, Zavala A, Dortet L, et al. Beta-lactamase database (BLDB)—structure and function. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2017;32(1).
 200. Giuliani F, Docquier JD, Riccio ML, Pagani L, Rossolini GM. OXA-46, a new class D β -lactamase of narrow substrate specificity encoded by a blaVIM-1-containing integron from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(5).
 201. Rojo-Bezares B, Estepa V, Cebollada R, de Toro M, Somalo S, Seral C, et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital: Characterization of metallo-beta-lactamases, porin OprD and integrons. *Int J Med Microbiol*. 2014;304(3–

- 4).
202. 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;
 203. Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Vol. 49, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2005.
 204. Hainrichson M, Yaniv O, Cherniavsky M, Nudelman I, Shallom-Shezifi D, Yaron S, et al. Overexpression and initial characterization of the chromosomal aminoglycoside 3'-O-phosphotransferase APH(3')-IIb from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(2).
 205. Islam S, Oh H, Jalal S, Karpati F, Ciofu O, Høiby N, et al. Chromosomal mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15(1).
 206. Nahar N, Asad S, Ahmed T, Setu NI, Kayser MS, Islam MS, et al. In silico assessment of the genotypic distribution of virulence and antibiotic resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Pharm Sci.* 2017;7(7).
 207. Li M, Guan X, Wang X, Xu H, Bai Y, Zhang X, et al. DsbM affects aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by the reduction of OxyR. Vol. 352, *FEMS Microbiology Letters.* 2014.
 208. Bruchmann S, Dötsch A, Nouri B, Chaberny IF, Häussler S. Quantitative contributions of target alteration and decreased drug accumulation to *pseudomonas aeruginosa* fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(3).
 209. Kos VN, Déraspe M, McLaughlin RE, Whiteaker JD, Roy PH, Alm RA, et al. The resistome of *Pseudomonas seudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(1).
 210. Wang YT, Lee MF, Peng CF. Mutations in the quinolone resistance-determining regions associated with ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Southern Taiwan. *Biomarkers Genomic Med.* 2014;6(2).
 211. Barrow K, Kwon DH. Alterations in two-component regulatory systems of *phoPQ* and *pmrAB* are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12).
 212. Schurek KN, Sampaio JLM, Kiffer CRV, Sinto S, Mendes CMF, Hancock REW. Involvement of *pmrAB* and *phoPQ* in polymyxin B adaptation and inducible resistance in non-cystic fibrosis clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*

- 2009;53(10).
213. Snesrud E, Maybank R, Kwak YI, Jones AR, Hinkle MK, McGann P. Chromosomally encoded mcr-5 in colistin-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(8).
 214. Lin J, Xu C, Fang R, Cao J, Zhang X, Zhao Y, et al. Resistance and Heteroresistance to Colistin in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Wenzhou, China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(10).
 215. Castañeda-García A, Rodríguez-Rojas A, Guelfo JR, Blázquez J. The glycerol-3-phosphate permease GlpT is the only fosfomycin transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2009;191(22).
 216. Beharry Z, Palzkill T. Functional analysis of active site residues of the fosfomycin resistance enzyme FosA from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*. 2005;280(18).
 217. Ito R, Mustapha MM, Tomich AD, Callaghan JD, McElheny CL, Mettus RT, et al. Widespread fosfomycin resistance in gram-negative bacteria attributable to the chromosomal fosA gene. *MBio*. 2017;8(4).
 218. Takrami SR, Ranji N, Hakimi F. New Mutations in Ciprofloxacin Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Guilan Province, Northern Iran. *Mol Genet Microbiol Virol*. 2017;32(4).
 219. Campo Esquisabel AB, Rodríguez MC, Campo-Sosa AO, Rodríguez C, Martínez-Martínez L. Mechanisms of resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* less susceptible to cefepime than to ceftazidime. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(12).
 220. Kiser TH, Obritsch MD, Jung R, MacLaren R, Fish DN. Efflux pump contribution to multidrug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmacotherapy*. 2010;30(7).
 221. Jalal S, Wretling B. Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist*. 1998;4(4).
 222. Jalal S, Ciofu O, Høiby N, Gotoh N, Wretling B. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(3).
 223. Maseda H, Saito K, Nakajima A, Nakae T. Variation of the mexT gene, a regulator of the MexEF-OprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;192(1).
 224. Richardot C, Juarez P, Jeannot K, Patry I, Plésiat P, Llanes C. Amino acid substitutions account for most mexS alterations in clinical nfxC mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;

225. Hay T, Fraud S, Lau CHF, Gilmour C, Poole K. Antibiotic Inducibility of the mexXY Multidrug Efflux Operon of *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of the MexZ Anti-Repressor ArmZ. *PLoS One*. 2013;8(2).
226. Jeannot K, Sobel ML, El Garch F, Poole K, Plésiat P. Induction of the mexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction. *J Bacteriol*. 2005;187(15).
227. Guénard S, Muller C, Monlezun L, Benas P, Broutin I, Jeannot K, et al. Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of *pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(1).
228. Feltman H, Schullert G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 2001;147(10).
229. Jain M, Ramirez D, Seshadri R, Cullina JF, Powers CA, Schullert GS, et al. Type III secretion phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains change during infection of individuals with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2004;42(11).
230. Jain M, Bar-Meir M, McColley S, Cullina J, Potter E, Powers C, et al. Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion in cystic fibrosis: a paradigm of chronic infection. *Transl Res*. 2008;152(6).
231. Hu H, Harmer C, Anuj S, Wainwright CE, Manos J, Cheney J, et al. Type 3 secretion system effector genotype and secretion phenotype of longitudinally collected *Pseudomonas aeruginosa* isolates from young children diagnosed with cystic fibrosis following newborn screening. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(3).
232. Wareham DW, Curtis MA. A genotypic and phenotypic comparison of type III secretion profiles of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis and bacteremia isolates. *Int J Med Microbiol*. 2007;297(4).
233. Garey KW, Vo QP, Larocco MT, Gentry LO, Tam VH. Prevalence of type III secretion protein exoenzymes and antimicrobial susceptibility patterns from bloodstream isolates of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *J Chemother*. 2008;20(6).
234. Cho HH, Kwon KC, Kim S, Koo SH. Correlation between virulence genotype and fluoroquinolone resistance in carbapenem-resistant *pseudomonas aeruginosa*. *Ann Lab Med*. 2014;34(4).
235. Dortet L, Lombardi C, Cretin F, Dessen A, Filloux A. Pore-forming activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system translocon alters the host epigenome. *Nat Microbiol*. 2018;3(3).
236. Badr S, Li Y, Duan K. Comparison of the Structure, Regulation and Functions between

- Type Three and Type Six Secretion System in Gram-Negative Bacteria. *J Med Microbiol Diagnosis*. 2016;05(04).
237. Berni B, Soscia C, Djermoun S, Ize B, Bleves S. A type VI secretion system trans-kingdom effector is required for the delivery of a novel antibacterial toxin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2019;10(JUN).
 238. Wilderman PJ, Vasil AI, Johnson Z, Vasil ML. Genetic and biochemical analyses of a eukaryotic-like phospholipase D of *Pseudomonas aeruginosa* suggest horizontal acquisition and a role for persistence in a chronic pulmonary infection model. *Mol Microbiol*. 2001;39(2).
 239. Boulant T, Boudehen Y-M, Filloux A, Plesiat P, Naas T, Dortet L. Higher Prevalence of PldA, a *Pseudomonas aeruginosa* Trans-Kingdom H2-Type VI Secretion System Effector, in Clinical Isolates Responsible for Acute Infections and in Multidrug Resistant Strains. *Front Microbiol*. 2018;
 240. Sage AE, Vasil ML. Osmoprotectant-dependent expression of plcH, encoding the hemolytic phospholipase C, is subject to novel catabolite repression control in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*. 1997;179(15).
 241. Recio R, Sánchez-Diener I, Viedma E, Meléndez-Carmona MÁ, Villa J, Orellana MÁ, et al. Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia isolates in a high-endemicity setting for ST175 and ST235 high-risk clones. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39(4).
 242. Del Barrio-Tofiño E, Sánchez-Diener I, Zamorano L, Cortes-Lara S, López-Causapé C, Cabot G, et al. Association between *Pseudomonas aeruginosa* O-antigen serotypes, resistance profiles and high-risk clones: Results from a Spanish nationwide survey. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74(11).
 243. Berthelot P, Attree I, Plésiat P, Chabert J, De Bentzmann S, Pozzetto B, et al. Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia isolates: Evidence for a possible association between O serotypes and exo genes. *J Infect Dis*. 2003;188(4).
 244. Kamali E, Jamali A, Ardebili A, Ezadi F, Mohebbi A. Evaluation of antimicrobial resistance, biofilm forming potential, and the presence of biofilm-related genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Res Notes*. 2020;13(1).
 245. Passmore IJ, Nishikawa K, Lilley KS, Bowden SD, Chung JCS, Welch M. Mep72, a metzincin protease that is preferentially secreted by biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2015;197(4).
 246. Guttenplan SB, Kearns DB. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. Vol.

- 37, FEMS Microbiology Reviews. 2013.
247. Clay ME, Hammond JH, Zhong F, Chen X, Kowalski CH, Lee AJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutant fitness in microoxia is supported by an Anr-regulated oxygen-binding hemerythrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(6).
 248. Cao H, Xia T, Li Y, Xu Z, Bougouffa S, Lo YK, et al. Uncoupled Quorum Sensing Modulates the Interplay of Virulence and Resistance in a Multidrug-Resistant Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolate Belonging to the MLST550 Clonal Complex. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019;63(4).
 249. McKnight SL, Iglewski BH, Pesci EC. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2000;182(10).
 250. Sánchez-Diener I, Zamorano L, López-Causapé C, Cabot G, Mulet X, Peña C, et al. Interplay among resistance profiles, high-risk clones, and virulence in the *Caenorhabditis elegans Pseudomonas aeruginosa* infection model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(12).
 251. LaFayette SL, Houle D, Beaudoin T, Wojewodka G, Radzioch D, Hoffman LR, et al. Cystic fibrosis–adapted *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing *lasR* mutants cause hyperinflammatory responses. *Sci Adv*. 2015;1(6).
 252. Hoffman LR, Kulasekara HD, Emerson J, Houston LS, Burns JL, Ramsey BW, et al. *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *J Cyst Fibros*. 2009;8(1).
 253. Basler M, Ho BT, Mekalanos JJ. Tit-for-tat: Type VI secretion system counterattack during bacterial cell-cell interactions. *Cell*. 2013;
 254. Filloux A, Hachani A, Bleves S. The bacterial type VI secretion machine: Yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*. 2008.
 255. Gray RD, Duncan A, Noble D, Imrie M, O’Reilly DSJ, Innes JA, et al. Sputum trace metals are biomarkers of inflammatory and suppurative lung disease. *Chest*. 2010;137(3).
 256. Sana TG, Hachani A, Bucior I, Soscia C, Garvis S, Termine E, et al. The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and *fur* and modulates internalization in epithelial cells. *J Biol Chem*. 2012;
 257. Li K, Gifford AH, Hampton TH, O’Toole GA. Availability of zinc impacts interactions between *Streptococcus sanguinis* and *Pseudomonas aeruginosa* in coculture. *J Bacteriol*. 2020;202(2).
 258. Ellison ML, Farrow III JM, Parrish W, Danell AS, Pesci EC. The Transcriptional Regulator Np20 Is the Zinc Uptake Regulator in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*. 2013;8(9).
 259. Pederick VG, Eijkelkamp BA, Begg SL, Ween MP, McAllister LJ, Paton JC, et al. ZnuA and

- zinc homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep*. 2015;5.
260. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(4).
261. Fallah F, Noori M, Hashemi A, Goudarzi H, Karimi A, Erfanimesh S, et al. Prevalence of bla NDM , bla PER , bla VEB , bla IMP , and bla VIM Genes among *Acinetobacter baumannii* Isolated from Two Hospitals of Tehran, Iran . *Scientifica (Cairo)*. 2014;2014.
262. Sandle T, Babenko D, Lavrinenko A, Azizov I, Cheșcă A. The current state of PCR approach in detection and identification of carbapenem hydrolysis β -lactamases genes. *Eur J Parenter Pharm Sci*. 2014;19(1).
263. Mosca A, Miragliotta L, Del Prete R, Tzakis G, Dalfino L, Bruno F, et al. Rapid and sensitive detection of blaKPC gene in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* by a molecular real-time assay. *Springerplus*. 2013;2(1).
264. Mugnaioli C, Luzzaro F, De Luca F, Brigante G, Amicosante G, Rossolini GM. Dissemination of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase genes to unusual hosts. *J Clin Microbiol*. 2005;43(8).
265. Peymani A, Naserpour-Farivar T, Zare E, Azarhoosh K. Distribution of blaTEM, blaSHV, and blaCTX-M genes among ESBL-producing *P. aeruginosa* isolated from Qazvin and Tehran hospitals, Iran. *J Prev Med Hyg*. 2017;58(2).
266. Naas T, Bogaerts P, Bauraing C, Degheldre Y, Glupczynski Y, Nordmann P. Emergence of PER and VEB extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58(1).
267. Wang C, Cai P, Chang D, Mi Z. A *pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum β -lactamase [6]. Vol. 57, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006.
268. Ghotaslou R, Yeganeh Sefidan F, Akhi MT, Asgharzadeh M, Mohammadzadeh Asl Y. Dissemination of Genes Encoding Aminoglycoside-Modifying Enzymes and armA among *Enterobacteriaceae* Isolates in Northwest Iran. *Microb Drug Resist*. 2017;23(7).
269. Eftekhar F, Seyedpour SM. Prevalence of qnr and aac(6')-ib-cr genes in clinical isolates of *klebsiella pneumoniae* from Imam Hussein hospital in Tehran. *Iran J Med Sci*. 2015;40(6).
270. Jesus T De, Gonzalez B. Interplay between gut microbiota and antibiotics. PhD Thesis. 2016.
271. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside

- resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Vol. 57, Microbiological Reviews. 1993.
272. Hidalgo L, Hopkins KL, Gutierrez B, Ovejero CM, Shukla S, Douthwaite S, et al. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in enterobacteriaceae isolated in India and the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(7).
 273. Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(5).
 274. Agnello M, Wong-Beringer A. Differentiation in quinolone resistance by virulence genotype in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One.* 2012;7(8).
 275. Avşar C, Aras ES. Analyses of parC and gyrA mutations in ciprofloxacin-resistant and susceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolated from soil by PCR-RFLP and SSCP method. *J Microbiol Biotechnol Food Sci.* 2018;7(5).
 276. Pirnay JP, Bilocq F, Pot B, Cornelis P, Zizi M, Van Eldere J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS One.* 2009;4(11).
 277. Shaver CM, Hauser AR. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun.* 2004;72(12).
 278. Ertugrul BM, Oryasin E, Lipsky BA, Willke A, Bozdogan B. Virulence genes fliC, toxA and phzS are common among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from diabetic foot infections. *Infect Dis (Auckl).* 2018;50(4).
 279. Savari M, Rostami S, Ekrami A, Bahador A. Characterization of toxin-antitoxin (TA) systems in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Iran. *Jundishapur J Microbiol.* 2016;9(1).
 280. Muhammadi, Shafiq S. Genetic, structural and pharmacological characterization of polymannuronate synthesized by algG mutant indigenous soil bacterium *Pseudomonas aeruginosa* CMG1421. *J Appl Microbiol.* 2019;126(1).
 281. Yue MM, Gong WW, Qiao Y, Ding H. A method for efficient expression of *Pseudomonas aeruginosa* alginate lyase in *Pichia pastoris*. *Prep Biochem Biotechnol.* 2016;46(2).
 282. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12).

ANEXOS

Anexo 1 – Aislados

Tabla A1 – Aislados, colección, pacientes y fuente

Colección	Paciente	Aislado	Fuente	Morfología colonial
	P1	14-2158	Espuito	Fenotipo mucoide. Pigmentación verde
	P1	14-2184	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación amarilla
	P1	14-2375	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas y brillantes. Pigmentación amarilla – verde
	P1	14-2378	Espuito	Fenotipo mucoide sin colonias aisladas. Pigmentación verde. Forma biofilm
	P1	15-4070	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias brillantes. Pigmentación azul – verde
	P1	15-4414 A	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación amarilla
	P1	15-4414 B	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación amarilla
FQ	P1	15-4414 C	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación amarilla
	P1	15-4414 D	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación amarilla
	P1	15-4584	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación amarilla
	P1	15-4623	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación amarilla
	P1	15-4652	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas con bordes rugosos. Pigmentación amarilla
	P1	15-4749	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación amarilla
	P1	15-5000	Espuito	Fenotipo mucoide. Pigmentación verde. Forma biofilm en mayor carga
	P2	14-0294	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas, redondas y brillantes. Color blanco

Colección	Paciente	Aislado	Fuente	Morfología colonial
P2	14-0421	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación verde	
P2	14-0652	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas, redondas y brillantes. Pigmentación amarilla	
P2	14-3223	Espuito	Fenotipo mucoide. Forma biofilm. Pigmentación verde	
P2	14-3362	Espuito	Fenotipo mucoide. Pigmentación verde	
P2	15-0890	Espuito	Fenotipo muy mucoide. Invade toda la placa	
P3	14-2430	Frotis faríngeo	Fenotipo mucoide. Pigmentación marrón	
P4	12-6808	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias redondas. Pigmentación amarilla	
P4	13-1874	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias redondas. Color blanco	
P4	14-2400	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación verde – marrón	
P4	14-2401	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas, redondas y brillantes. Pigmentación amarilla	
P4	14-2402	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas, redondas y brillantes. Pigmentación amarilla	
P4	15-0495	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas con bordes irregulares	
P5	08-6072	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias con bordes irregulares. Pigmentación verde	
P5	08-6073	Espuito	Fenotipo mucoide. Pigmentación verde	
P5	11-0708	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación amarilla – roja	
P5	11-1195	Espuito	Fenotipo no mucoide. Pigmentación verde	
P5	11-1196	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias con bordes irregulares. Pigmentación verde	
P5	12-0129	Espuito	Fenotipo mucoide. Colonias brillantes de color crema	
P5	12-1127	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación roja	

Colección	Paciente	Aislado	Fuente	Morfología colonial
P5	12-1128	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas y brillantes. Pigmentación amarilla – verde	
P5	12-1159	Espuito	Fenotipo mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación roja	
P5	12-1251	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias con punto central elevado. Pigmentación amarilla	
P5	12-1345	Espuito	Fenotipo mucoide, bordes irregulares. Pigmentación amarilla – naranja	
P5	12-1346	Espuito	Fenotipo no mucoide. Pigmentación roja	
P5	12-1575	Espuito	cremosas, color rojo.	
P5	12-1634	Espuito	cremosas, color rojo.	
P5	12-1662	Espuito	cremosas, color rojo.	
P5	12-1802	Aspirado traqueal	Rugosas, secas, punto central elevado.	
P6	14-1716	Espuito	Fenotipo mucoide sin colonias aisladas. Transparente	
P7	12-5088 R	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas y brillantes. Pigmentación amarilla – roja	
P7	12-6265	Espuito	Fenotipo mucoide. Colonias aisladas muy pequeñas. Color beige	
P7	12-6304	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación amarilla	
P7	13-0828	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación verde	
P7	13-1575	Espuito	Fenotipo muy mucoide	
P8	07-2043	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Color blanco	
P8	11-4059	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación verde	
P8	11-5406	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación verde	
P8	12-1371	Espuito	Fenotipo mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación marrón	

Colección	Paciente	Aislado	Fuente	Morfología colonial
	P8	12-1767	Espuito	Fenotipo mucoide. Colonias grandes. Pigmentación marrón
	P8	15-7921	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias marrones continuas con bordes irregulares
	P9	10-5351	Espuito	Fenotipo mucoide. Color beige
	P9	10-6523	Espuito	Fenotipo mucoide. Color beige
	P9	10-6529	Espuito	Fenotipo mucoide. Color beige
	P9	11-0928	Espuito	Fenotipo mucoide. Color beige
	P9	11-2731	Espuito	Fenotipo mucoide. Color beige
	P9	11-5752	Espuito	Fenotipo mucoide. Color beige
	P9	12-0560	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias muy pequeñas. Pigmentación amarilla
	P9	12-1268	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación amarilla
	P9	12-5123	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación amarilla
	P9	12-5803	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias con bordes irregulares. Pigmentación amarilla y marrón
	P9	13-2464	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias redondas. Pigmentación verde
	P10	08-0034	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias con bordes irregulares. Pigmentación verde
	P10	12-7069	Espuito	Fenotipo mucoide. Color beige
	P10	13-1991	Espuito	Fenotipo mucoide. Color beige
	P10	13-2025	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias redondas y pequeñas. Pigmentación verde
	P10	13-2914	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias con punto central elevado. Pigmentación verde
	P10	13-4112	Espuito	Fenotipo mucoide. Color blanco

Colección	Paciente	Aislado	Fuente	Morfología colonial
	P10	14-2595	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias con punto central elevado. Pigmentación verde
	P10	15-7136	Espuito	Fenotipo no mucoide. Color crema
	P10	15-7350	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias blancas continuas
	P11	12-0805	Espuito	Fenotipo no mucoide. Pigmentación amarilla
	P11	12-2730	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias muy pequeñas y brillantes. Pigmentación marrón
	P11	13-2507	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias redondas y brillantes. Pigmentación marrón
	P11	13-5486	Biopsia pulmonar	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas y redondas. Color blanco
	P11	13-5524	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas y brillantes. Pigmentación amarilla
	P11	13-5954	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas y cremosas. Color blanco
	P12	13-3298	Espuito	Fenotipo mucoide. Transparente
	P12	13-3363	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Color crema
	P12	13-3423	Espuito	Fenotipo mucoide. Transparente
	P12	13-3477	Espuito	Fenotipo mucoide. Transparente
	P12	13-3753	Espuito	Fenotipo mucoide. Transparente
	P12	13-5627	Biopsia pulmonar	Fenotipo mucoide. Transparente
	P13	12-6547	Espuito	Fenotipo mucoide. Colonias brillantes. Color crema
	P14	12-6353	Frotis faríngeo	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas. Pigmentación amarilla
	P15	13-0950	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias cremosas. Pigmentación marrón - roja
	P15	13-2772	Espuito	Fenotipo mucoide. Pigmentación amarilla

Colección	Paciente	Aislado	Fuente	Morfología colonial
	P15	14-3192	Lavado broncoalveolar	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas con bordes irregulares. Pigmentación azul
	P16	12-5984	Frotis faríngeo	Fenotipo no mucoide. Colonias brillantes. Pigmentación amarilla
	P17	13-6448 A	Frotis faríngeo	Fenotipo mucoide. Colonias brillantes. Transparente
	P17	13-6448 B	Frotis faríngeo	Fenotipo mucoide. Colonias brillantes. Transparente
	P17	14-0919	Frotis faríngeo	Fenotipo mucoide. Colonias brillantes. Transparente
	P18	12-5802	Espujo	Fenotipo mucoide. Colonias brillantes. Transparente
	P18	12-5805	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas. Pigmentación verde – azul
	P18	12-6355	Espujo	Fenotipo mucoide. Pigmentación verde
	P18	12-6466	Aspirado traqueal	Fenotipo mucoide. Colonias brillantes. Transparente
	P18	12-6494	Aspirado traqueal	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas con bordes irregulares. Pigmentación azul
	P19	12-5709	Frotis faríngeo	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas. Pigmentación amarilla
	P20	13-0865	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación marrón
	P20	13-4024	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas con bordes irregulares. Pigmentación azul
	P20	13-6555	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas con bordes irregulares. Pigmentación azul
	P20	13-6566	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas con bordes irregulares. Pigmentación azul
	P20	14-4165	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas con bordes irregulares. Pigmentación azul
	P21	14-2559	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas y cremosas. Color crema
	P21	14-2563	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas y cremosas. Color crema
	P21	15-4983	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas con bordes irregulares

Colección	Paciente	Aislado	Fuente	Morfología colonial
	P22	15-2469	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias con bordes irregulares. Pigmentación amarilla
	P22	15-2508	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias con bordes irregulares. Color beige
	P22	15-3050	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias con bordes irregulares. Color beige
	P22	15-6548	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias brillantes. Pigmentación amarilla
	P22	15-7463	Espuito	Fenotipo mucoide. Pigmentación verde
	P22	15-7690	Espuito	Fenotipo mucoide. Pigmentación verde
	P22	15-7876	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias con bordes irregulares. Color beige
	P22	15-7915	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias brillantes. Pigmentación marrón
	P22	16-0036	Líquido pleural	Fenotipo no mucoide. Colonias brillantes con bordes rugosos
	P22	16-0287	Biopsia pulmonar	Fenotipo no mucoide. Colonias rugosas y brillantes. Pigmentación verde
	P22	16-0423	Aspirado bronquial	Fenotipo mucoide. Pigmentación verde
	P22	16-0456	Hemocultivo	Fenotipo no mucoide. Colonias brillantes con bordes rugosos
	P23	15-0788	Espuito	Fenotipo mucoide. Transparente
BNFQ	P24	12-2603	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas y brillantes. Pigmentación amarilla
	P24	12-3870	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas. Pigmentación amarilla
	P25	13-2077	Espuito	Fenotipo mucoides. Colonias grandes. Color blanco
	P25	13-3189	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Color blanco
	P25	13-4111	Espuito	Fenotipo mucoide. Color blanco
	P26	13-0541	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias cremosas. Pigmentación amarilla

Colección	Paciente	Aislado	Fuente	Morfología colonial
P26	13-0584	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias redondas y cremosas.	
P26	13-0679	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias cremosas con bordes definidos. Pigmentación amarilla	
P26	13-0772	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias redondas con bordes definidos. Pigmentación amarilla	
P26	13-0821	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias redondas, pequeñas y brillantes. Pigmentación amarilla	
P26	13-0947	Lavado broncoalveolar	Fenotipo no mucoide. Color blanco	
P26	13-1039	Lavado broncoalveolar	Fenotipo no mucoide. Colonias redondas, pequeñas y brillantes. Pigmentación amarilla	
P26	13-1070	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias redondas, pequeñas y brillantes. Pigmentación amarilla	
P26	13-1131	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias redondas, pequeñas y brillantes. Pigmentación amarilla	
P26	13-1224	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias redondas, pequeñas y brillantes. Pigmentación amarilla	
P26	13-1225	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias redondas, pequeñas y brillantes. Pigmentación amarilla	
P26	13-1242	Espuito	Fenotipo mucoide. Colonias redondas y sueltas. Pigmentación amarilla	
P26	13-1295	Espuito	Fenotipo no mucoide. No forma colonias aisladas. Pigmentación amarilla	
P26	13-1456	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias redondas, pequeñas y brillantes. Pigmentación amarilla	
P26	13-1652	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias redondas, pequeñas y con punto central elevado. Pigmentación amarilla	
P26	13-1791	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias redondas, pequeñas y brillantes. Pigmentación amarilla	
P26	13-1811	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas. Pigmentación amarilla	
P26	13-2342	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias redondas. Pigmentación amarilla	
P27	14-3875	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias con bordes irregulares. Color blanco	

Colección	Paciente	Aislado	Fuente	Morfología colonial
	P27	14-3952	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias con punto central elevado. Forma biofilm. Pigmentación amarilla.
	P28	12-4301	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación marrón
	P28	12-4322	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas y brillantes. Pigmentación amarilla
	P29	12-3148	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Color blanco
	P30	14-4018	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias con punto central elevado. Forma biofilm. Pigmentación amarilla.
	P31	13-4215	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas y brillantes. Pigmentación amarilla
	P31	13-5570	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas. Pigmentación amarilla
	P32	12-0881	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias brillantes con bordes irregulares. Pigmentación amarilla
	P32	12-7117	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias con bordes irregulares con punto central elevado. Pigmentación marrón
	P33	13-1058	Espuito	Fenotipo no mucoide. Pigmentación marrón
	P34	12-2600	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Color blanco
	P34	12-5422	Espuito	Fenotipo no mucoide. Pigmentación amarilla
	P34	13-1574	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas y brillantes. Pigmentación amarilla
	P34	13-6203	Espuito	Fenotipo mucoide. Color blanco
	P34	13-6427	Lavado broncoalveolar	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas. Pigmentación verde
	P34	13-6712	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación verde
	P34	13-6750	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias brillantes. Pigmentación verde
	P34	13-6787	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias brillantes y pequeñas. Pigmentación verde

Colección	Paciente	Aislado	Fuente	Morfología colonial
	P34	14-0074	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas y brillantes. Pigmentación verde
	P34	14-0116	Lavado broncoalveolar	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas y brillantes. Pigmentación verde
	P35	12-6580	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas y redondas. Pigmentación amarilla – verde
	P35	12-6599	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas y redondas. Pigmentación amarilla – verde
	P35	12-6783	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias redondas. Pigmentación roja
	P35	12-7136	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias esponjosas con bordes irregulares. Pigmentación verde
	P35	12-7385	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas y redondas. Pigmentación amarilla – verde
	P36	13-6556	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas con punto central elevado. Pigmentación verde
	P36	13-6586	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas. Pigmentación verde
	P36	13-6692	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas con puntos centrales elevados. Pigmentación verde
	P36	13-6711	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas con punto central elevado. Pigmentación verde
	P36	13-6745	Espujo	Fenotipo no mucoide. Pigmentación verde
	P36	14-0035	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas y brillantes. Pigmentación verde
	P37	12-5970	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación verde
	P38	13-0439	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias esponjosas con bordes irregulares. Pigmentación verde
	P38	13-0488	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias con bordes irregulares. Pigmentación amarilla
	P38	13-0527	Espujo	Fenotipo mucoide sin colonias aisladas
	P38	13-0535	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación verde
	P38	13-0698	Espujo	Fenotipo no mucoide. Colonias cremosas con bordes irregulares. Pigmentación amarilla

Colección	Paciente	Aislado	Fuente	Morfología colonial
P38	13-0747	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias con bordes irregulares. Color crema	
P38	13-0796	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias cremosas con bordes irregulares. Pigmentación amarilla	
P39	13-3150	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias esponjosas. Pigmentación verde	
P40	13-5505	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias secas con bordes irregulares. Color beige	
P40	13-5576	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas y brillantes. Pigmentación amarilla	
P40	13-5574	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas. Pigmentación amarilla	
P40	13-5832	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias brillantes con bordes irregulares. Pigmentación amarilla	
P40	13-5857	Espuito	Fenotipo no mucoide. Pigmentación amarilla - marrón	
P40	13-6422	Hemocultivo	Fenotipo no mucoide. Colonias continuas con punto central elevado. Pigmentación amarilla	
P40	13-6710	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación amarilla	
P40	14-0084	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias con punto central elevado. Pigmentación amarilla	
P40	14-0613	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Pigmentación amarilla	
P40	14-0741	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas. Color beige	
P40	14-0867	Espuito	Fenotipo no mucoide. Colonias pequeñas y redondas. Color crema	

Tabla B1 – Selección de aislados secuenciados

Aislado	ST	PFGE	CMI (µg/ml)													
			AZT	FEP	CAZ	PIP	TZP	IMP	MER	DOR	GEN	TOB	AK	LEV	CIP	COL
14-2158	274	K1	8	8	8	16	32	8	8	8	16	4	64	8	16	0,5
14-2184	274	K2	>128	>128	>128	>256	>256	64	64	>64	>64	>64	>128	32	32	8
14-0294	2238	H1	0,5	16	2	256	256	4	1	1	4	1	8	1	0,25	8
14-0421	2238	H2	0,5	8	2	4	4	2	2	2	8	1	8	4	4	0,5
14-0652	2238	H3	0,25	4	1	4	4	1	0,5	0,5	8	1	16	8	8	1
14-3223	2238	H4	2	4	4	8	16	2	0,5	1	2	0,5	8	2	1	2
14-3362	2238	H5	1	4	2	4	16	1	0,25	1	2	0,5	16	1	0,5	1
15-0495	2360	D2	16	64	64	128	128	32	8	16	32	16	64	2	2	2
08-6073	253	W2	8	8	4	32	16	1	2	1	2	0,25	4	2	0,5	4
11-1196	253	W3	4	4	2	16	8	16	8	4	2	0,25	4	8	2	0,5
12-1127	253	W4	32	8	16	128	128	16	4	4	8	1	32	2	1	2
12-1159	253	W6	2	2	0,5	4	4	2	2	1	1	0,13	2	8	4	0,25
12-1251	253	W1	128	16	128	256	256	16	32	16	0,5	0,06	2	16	32	0,25
12-1345	253	W7	8	1	1	1	1	1	1	1	4	1	16	8	2	0,5
12-1346	253	W8	64	8	32	>256	>256	16	4	16	8	2	32	2	4	1
12-1802	253	W5	64	16	16	64	64	64	32	32	64	8	>128	8	2	1

Aislado	ST	PFGE	CMI (µg/ml)													
			AZT	FEP	CAZ	PIP	TZP	IMP	MER	DOR	GEN	TOB	AK	LEV	CIP	COL
14-1716	198	E	16	8	2	8	16	2	1	1	8	1	8	1	1	1
12-6304	253	R2	8	2	2	4	4	0,5	2	2	64	16	128	16	4	1
13-1575	253	R1	4	2	4	64	64	2	1	4	32	32	64	4	8	1
07-2043	443	Z1	4	16	8	128	128	8	4	4	8	2	16	4	2	2
11-4059	443	Z2	2	8	2	16	1	2	0,125	0,125	2	1	8	4	1	1
12-1371	443	Z3	4	32	16	64	64	2	0,5	2	4	0,25	8	4	4	0,25
12-1767	443	Z1	16	16	16	64	64	1	0,25	0,5	16	0,5	16	8	4	1
10-5351	175	A1	1	0,5	1	8	≤0.25	0,25	0,06	0,125	8	8	0,5	4	4	1
12-0560	175	A3	1	0,5	1	8	≤0.25	0,25	0,06	0,125	64	16	0,5	4	4	2
12-5803	175	A2	16	8	32	256	256	0,5	0,5	1	>64	64	4	>32	>32	2
08-0034	111	S	0,5	4	32	128	128	4	0,5	0,5	>64	64	16	>32	>32	8
13-2025	179	J2	0,5	32	2	2	2	4	1	0,5	>64	16	>128	0,5	0,25	2
14-2595	179	J3	0,5	32	2	2	2	4	1	0,5	16	8	128	0,5	0,25	0,5
15-7136	179	J4	64	16	64	256	256	32	4	8	32	4	64	4	2	2
15-7350	179	J5	128	64	128	64	64	32	16	16	>64	8	128	4	1	0,5
12-0805	455	V	64	32	>128	>256	>256	32	16	16	2	0,25	2	32	8	1
13-2507	455	U2	>128	>128	>128	>256	>256	32	16	16	8	2	32	2	0,5	0,25
13-5486	455	U1	>128	>128	>128	>256	>256	8	4	8	0,5	0,5	2	1	0,5	0,5

Aislado	ST	PFGE	CMI (µg/ml)													
			AZT	FEP	CAZ	PIP	TZP	IMP	MER	DOR	GEN	TOB	AK	LEV	CIP	COL
13-5524	175	A4	64	128	64	64	64	16	64	32	>64	64	4	>32	>32	2
13-3298	155	I1	<0,125	8	0,13	0,5	1	2	0,125	0,25	2	0,13	8	4	0,5	0,5
13-3423	155	I2	1	16	2	8	8	4	0,5	1	8	2	16	4	1	2
13-3753	155	I3	0,25	1	0,25	0,5	0,5	1	0,125	0,25	0,25	0,06	1	8	4	0,13
13-5627	155	I3	0,25	2	0,13	1	1	2	0,25	1	2	<0.06	4	2	1	0,25
12-6547	569	N	16	8	4	16	16	4	2	0,5	2	1	4	4	2	8
12-6353	260	Y	8	2	4	8	4	1	0,25	0,125	1	0,25	2	0,25	≤0,03	2
13-0950	253	P	8	16	2	8	8	0,25	0,25	0,125	2	1	4	4	0,5	0,25
13-2772	253	Q	<0,125	1	0,5	<0.125	<0.125	0,25	0,125	0,125	2	0,5	2	0,06	0,03	0,25
14-3192	175	B	64	32	4	16	16	32	32	16	>64	>64	4	>32	>32	8
12-5984	253	X	4	1	1	4	4	1	0,25	0,06	2	0,25	2	0,25	≤0,03	8
14-0919	293	M	8	4	8	8	8	0,25	0,25	0,06	2	0,5	2	0,5	0,06	4
12-6494	3449	G	>128	128	128	>256	256	4	2	2	8	4	16	16	4	2
12-5709	446	C	8	2	1	4	4	16	4	2	2	0,25	4	0,5	0,125	4
13-0865	260	L	128	>128	>128	>256	>256	>64	>64	64	>64	>64	>128	8	2	0,5
14-2563	569	T2	64	16	64	128	>256	0,5	0,25	0,25	4	0,25	8	2	1	0,25
15-4983	569	T1	16	8	16	64	64	32	8	8	4	0,5	4	2	0,5	0,25
15-6548	379	F2	16	8	8	64	0,5	16	4	4	8	0,5	16	4	1	4

Aislado	ST	PFGE	CMI (µg/ml)													
			AZT	FEP	CAZ	PIP	TZP	IMP	MER	DOR	GEN	TOB	AK	LEV	CIP	COL
15-7690	379	F1	128	32	64	256	256	8	2	1	32	4	32	8	4	4
15-0788	1399	AA	0,25	2	0,5	0,5	0,25	0,5	≤0,06	≤0,06	2	1	8	1	1	0,5
12-2603	179	CC1	4	8	4	4	4	16	2	1	4	0,5	8	1	0,5	16
12-3870	179	CC2	0,5	16	2	4	4	1	0,06	0,125	8	0,5	8	0,5	0,25	2
13-2077	1249	LL1	1	2	4	4	4	2	0,5	1	0,5	0,25	2	0,06	0,06	0,25
13-3189	1249	LL2	32	64	64	256	256	16	8	8	1	1	8	0,13	0,13	0,5
13-4111	1249	LL3	16	16	16	32	32	8	1	1	1	0,5	2	0,5	0,25	0,5
13-1070	175	A4	32	64	32	64	64	32	32	32	>64	64	16	>32	>32	8
13-1456	175	A5	32	64	16	32	64	32	32	32	>64	>64	32	>32	>32	2
13-1791	175	A6	8	16	2	8	8	8	8	8	>64	>64	16	>32	>32	16
14-3875	175	A9	32	8	16	8	16	32	16	16	>64	64	8	>32	>32	2
12-3148	312	II	4	2	1	8	32	4	0,125	0,5	4	2	4	8	8	>32
13-4215	253	GG	8	1	4	8	8	1	0,5	0,5	2	1	4	0,5	0,5	2
13-5570	252	EE	8	8	4	4	8	2	0,5	0,25	2	0,5	4	0,25	0,06	8
12-7117	175	A2	16	16	4	16	8	1	1	1	>64	64	8	>32	>32	2
13-1058	253	HH	64	16	32	4	2	2	0,5	0,5	4	1	16	4	1	2
12-2600	560	FF1	16	8	4	8	8	2	0,25	0,25	0,13	0,06	0,25	16	16	1
12-5422	560	FF2	32	8	8	16	16	2	32	0,25	4	0,5	1	16	8	2

Aislado	ST	PFGE	CMI (µg/ml)													
			AZT	FEP	CAZ	PIP	TZP	IMP	MER	DOR	GEN	TOB	AK	LEV	CIP	COL
13-6203	308	NN	32	64	>128	>256	>256	8	16	8	64	32	4	>32	>32	0,25
14-0116	111	MM	8	32	32	128	128	8	8	4	>64	>64	32	32	32	>32
12-6599	175	KK	32	64	64	128	128	32	32	32	>64	>64	16	>32	>32	2
14-0035	313	OO	64	64	128	>256	>256	16	32	8	4	1	16	8	2	1
12-5970	447	JJ	16	4	4	8	8	16	8	32	2	0,5	4	2	0,5	16
13-3150	17	DD	32	4	8	16	16	1	2	0,25	4	1	4	32	16	1
13-5832	175	A4	32	128	16	64	128	32	64	32	>64	>64	8	>32	>32	16
13-5857	175	A8	64	128	64	128	128	16	64	32	>64	>64	8	>32	>32	2
14-0867	175	A7	128	128	128	>256	>256	64	64	>64	>64	>64	16	>32	>32	>32

Tabla C1 – Nomenclatura de los aislados secuenciados

Aislado	Nomenclatura
12-2603	MS3372
12-3870	MS3373
13-2077	MS3374
13-3189	MS3375
13-4111	MS3376
13-1791	MS3377
14-3875	MS3378
12-3148	MS3379
13-4215	MS3380
13-5570	MS3381
12-7117	MS3382
13-1058	MS3383
12-2600	MS3384
12-5422	MS3385
13-6203	MS3386
14-0116	MS3387
12-6599	MS3388
14-0035	MS3389
12-5970	MS3390
13-3150	MS3391
13-5857	MS3392
12-4322	MS4177b
13-0439	MS6059
13-1070	WGAOIA1
13-5832	WGAOIA2
14-0867	WGAOIA3
13-1456	WGAOIA4
13-6203	WGAOR
14-3192	MS3347
13-5524	MS3348

Aislado	Nomenclatura
12-5709	MS3349
15-0495	MS3350
14-1716	MS3351
15-7690	MS3352
15-6548	MS3353
12-6494	MS3354
15-7136	MS3355
12-6304	MS3356
08-0034	MS3357
15-4983	MS3358
14-2563	MS3359
13-1575	MS3360
13-5486	MS3361
12-0805	MS3362
12-5984	MS3363
12-6353	MS3364
15-0788	MS3365
13-2507	MS3366
12-6547	MS3367
13-0865	MS3368
14-0919	MS3369
13-0950	MS3370
13-2772	MS3371
10-5351	MS6053
12-7069	MS6054
12-1159	MS6055
14-2402	MS6056
14-2378	MS6057
14-2430	MS6058
12-1127	PAN3
12-1346	PAN7
12-1251	PAN

Aislado	Nomenclatura
14-2158	PAS
14-0421	WGAOA1
14-0652	WGAOA2
14-3223	WGAOA3
14-3362	WGAOA4
14-0294	WGAOA
11-4059	WGAOBB1
12-1767	WGAOBB2
12-1371	WGAOBB3
07-2043	WGAOBB
13-3423	WGAOCC1
13-5627	WGAOCC3
13-3298	WGAOCC
14-2595	WGAOE1
13-2025	WGAOE2
15-7350	WGAOE3
12-5803	WGAOH2
12-0560	WGAOH3
08-6073	WGAON1
11-1196	WGAON2
12-1802	WGAON4
12-1345	WGAON6
14-2184	WGAOS1

Tabla D1 – Interacción de *P. aeruginosa* con la línea celular A549: Selección de aislados

Aislado	ST	PFGE	CMI (µg/ml)														
			AZT	FEP	CAZ	PIP	PIP+ TZB	IMP	MER	DOR	GEN	TOB	AK	LEV	CIP	COL	FOS
14-2184	274	K1	>128	>128	>128	>256	>256	64	64	>64	>64	>64	>128	32	32	8	>512
14-2378	274	K3	16	8	8	64	64	32	16	32	64	8	64	32	32	2	512
14-0421	2238	H3	0,5	8	2	4	4	2	2	2	8	1	8	4	4	4	>512
14-0652	2238	H1	0,25	4	1	4	4	1	0,5	0,5	8	1	16	8	8	1	512
14-3223	2238	H2	2	4	4	8	16	2	0,5	1	2	0,5	8	2	1	2	512
12-1371	443	AA3	4	32	16	64	64	2	0,5	2	4	0,25	8	4	4	0,25	128
12-5984	253	X	4	1	1	4	4	1	0,25	0,06	2	0,25	2	0,25	≤0,03	8	32
14-0919	293	M	8	4	8	8	8	0,25	0,25	0,06	2	0,5	2	0,5	0,06	4	>512
13-5486	455	U1	>128	>128	>128	>256	>256	8	4	8	0,5	0,5	2	1	0,5	0,5	>512
11-4059	443	AA2	2	8	2	16	1	2	0,125	0,125	2	1	8	4	1	1	32
14-2563	569	T2	64	16	64	128	>256	0,5	0,25	0,25	4	0,25	8	2	1	0,25	256
13-2772	253	Q	<0,125	1	0,5	<0,125	<0,125	0,25	0,125	0,125	2	0,5	2	0,06	0,03	0,5	32
12-5709	446	C	8	2	1	4	4	16	4	2	2	0,25	4	0,5	0,125	4	512
12-6353	260	Z	8	2	4	8	4	1	0,25	0,125	1	0,25	2	0,25	≤0,03	2	8
12-5422	560	GG2	32	8	8	16	16	2	32	0,25	4	0,5	1	16	8	2	256
12-2600	560	GG1	16	8	4	8	8	2	0,25	0,25	0,125	0,06	0,25	16	16	1	512

Aislado	ST	PFGE	CMI ($\mu\text{g/ml}$)														
			AZT	FEP	CAZ	PIP	PIP+ TZB	IMP	MER	DOR	GEN	TOB	AK	LEV	CIP	COL	FOS
13-4215	253	HH	8	1	4	8	8	1	0,5	0,5	2	1	4	0,5	0,5	2	64
12-6547	569	N	16	8	4	16	16	4	2	0,5	2	1	4	4	2	8	>512
13-3150	17	EE	32	4	8	16	16	1	2	0,25	4	1	4	32	16	1	512
14-0035	313	PP	64	64	128	>256	>256	16	32	8	4	1	16	8	2	1	512
13-0950	253	P	8	16	2	8	8	0,25	0,25	0,125	2	1	4	4	0,5	0,25	32
14-0294	2238	H5	0,5	16	2	256	256	4	1	1	4	1	8	1	0,25	8	512
15-4983	569	T1	16	8	16	64	64	32	8	8	4	0,5	4	2	0,5	0,25	64
12-0805	455	V	64	32	>128	>256	>256	32	16	16	2	0,25	2	32	8	1	128

Anexo 2 – Antibióticos

Tabla A2 – Antibióticos utilizados

Antibiótico (Pureza)	Casa comercial
Aztreonam (96.80%)	Discovery Fine Chemicals
Ceftazidime (84.50%)	Sigma Aldrich
Cefepime (86.91%)	Discovery Fine Chemicals
Imipenem Monoydrate (98.40%)	Discovery Fine Chemicals
Meropenem Sodium Carbonate (82.50%)	Discovery Fine Chemicals
Doripenem Monohydrate (>98%)	Sigma Aldrich
Piperacillin Sodium Salt (>95%)	Sigma Aldrich
Tazobactam Sodium (92.40%)	Discovery Fine Chemicals
Gentamicin (67.1%)	Sigma Aldrich
Tobramycin (>90%)	Sigma Aldrich
Amikacin Disulfate salt (71%)	Sigma Aldrich
Levofloxacin Hemihidrato (100%)	Aventis Pharma
Ciprofloxacin (99.90%)	Sigma Aldrich
Colistin (79.08%)	Sigma Aldrich
Fosfomicin Disodium Salt (74.7%)	Sigma Aldrich

Anexo 3 – Cebadores empleados en la amplificación de genes de *P. aeruginosa* y programas de PCR

Tabla A3 – Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados y programa de PCR para la amplificación de genes de resistencia de *P. aeruginosa*

Cebador (5'→3')	Condiciones de PCR
VIM-1 (260) F: ATGGTGTTTGGTCGCATATC R: TGGGCCATTCAGCCAGATC	94°C 3min, (94°C 30sec / 60°C 30sec / 72°C 40sec) x 30, 72°C 2min
IMP-2 (261) F: GAAGGCGTTTATGTTTCATAC R: GTAAGTTTCAAGAGTGATGC	94°C 3min, (94°C 30sec / 60°C 30sec / 72°C 40sec) x 30, 72°C 2min
NDM-1 (262) F: CCATGCGGGCCGTATGAGTGATTG R: TCGCGAAGCTGAGCACCCGATTAG	94°C 3min, (94°C 30sec / 60°C 30sec / 72°C 40sec) x 30, 72°C 2min
OXA-48 (262) F: TGCGTGTATTAGCCTTATCG R: TTTTTCCTGTTGAGCACTTC	94°C 3min, (94°C 30sec / 60°C 30sec / 72°C 40sec) x 30, 72°C 2min
KPC (263) F: TGTCACTGTATCGCCGTC R: TTACTGCCCGTTGACGCC	94°C 3min, (94°C 30sec / 60°C 30sec / 72°C 40sec) x 30, 72°C 2min
CTX-M (264) F: ATGTGCAGYACCGTAARGT R: TGGGTRAARTARGTSACCAGA	94°C 5min, (94°C 30sec / 55°C 30sec / 72°C 1min) x 35, 72°C 7min
TEM (265) F: ATGAGTATTCAACATTTCCG R: CTGACAGTTACCAATGCTTA	94°C 5min, (94°C 30sec / 55°C 30sec / 72°C 1min) x 30, 72°C 7min
SHV (265) F: GGGTTATTCTTATTTGTCGC R: TTAGCGTTGCCAGTGCTC	94°C 5min, (94°C 30sec / 55°C 30sec / 72°C 1min) x 30, 72°C 7min
PSE-1 (43) F: ATGCTTTTATATAAAATGTGTG R: TCAGCGCGACTCTGATGTA	94°C 5min, (94°C 30sec / 55°C 30sec / 72°C 1min) x 30, 72°C 7min

Cebador (5'→3')	Condiciones de PCR
PER-1 (266) F: ATGAATGTCATTATAAAAGC R: AATTTGGGCTTAGGGCAGAA	94°C 5min, (94°C 30sec / 55°C 30sec / 72°C 1min) x 30, 72°C 7min
VEB-1 (266) F: CGACTTCCATTTCCCGATGC R: GGACTCTGCAACAAATACGC	94°C 5min, (94°C 30sec / 55°C 30sec / 72°C 1min) x 30, 72°C 7min
GES-1 (267) F: ATGCGCTTCATTACGCAC R: CTATTTGTCCGTGCTCAGG	95°C 3min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 2min) x 35, 72°C 5min
AAC(3')-IIa (268) F: GGCAATAACGGAGGCGCTTCAAAA R: TTCCAGGCATCGGCATCTCATACG	94°C 5min, (94°C 30sec / 60°C 30sec / 72°C 15sec) x 30, 72°C 7min
AAC(6')-Ib (269) F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTTT	94°C 5min, (94°C 30sec / 60°C 30sec / 72°C 15sec) x 30, 72°C 7min
AAC(6')-IIa (270) F: GAACACTACCTGCCCAGAGC R: TTCTCTCGAAGGCTTGTCGT	94°C 5min, (94°C 30sec / 60°C 30sec / 72°C 15sec) x 30, 72°C 7min
ANT(2'')-Ia (72) F: CGTCATGGAGGAGTTGGACT R: CGCAAGACCTCAACCTTTTC	94°C 5min, (94°C 30sec / 60°C 30sec / 72°C 15sec) x 30, 72°C 7min
APH(3')-VIa (271) F: AAAGCGATCAATGCAAACC R: TATCCGTGATATCGCCATGA	94°C 5min, (94°C 30sec / 60°C 30sec / 72°C 15sec) x 30, 72°C 7min
armA (272) F: CAAATGGATAAGAATGATGTT R: TTATTTCTGAAATCCACT	94°C 5min, (94°C 30sec / 60°C 30sec / 72°C 15sec) x 30, 72°C 7min
rmtA (273) F: CTAGCGTCCATCCTTTCTC R: TTTGCTTCCATGCCCTTGCC	94°C 5min, (94°C 30sec / 60°C 30sec / 72°C 15sec) x 30, 72°C 7min
rmtD (273) F: GAGCGAACTGAAGGAAAAAC R: GAGCACGTAAAACAGCTC	94°C 5min, (94°C 30sec / 60°C 30sec / 72°C 15sec) x 30, 72°C 7min

Cebador (5'→3')	Condiciones de PCR
<i>oprD-Flank</i> (202) F: CGGCTGAGGGGAAAGTCGCC R: TACGCGGTCATTCTCGGGCG	95°C 3min, (95°C 15sec / 64°C 30min / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>parC</i> (210) F: CGAGCAGCCCTATCTGAACTAT R: GAAGGACTTGGGATCGTCCGGA	95°C 3min, (95°C 15sec / 64°C 30min / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>parE</i> (210) F: CGGCGTTCGTCTCGGGCGTGGTGAAGGA R: TCGAGGGCGTAGTAGATCTCCTTGCCGA	95°C 3min, (95°C 15sec / 64°C 30min / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>gyrB</i> (274) F: GCGCGAGATGACCCGCCGCA R: CTGGCGGAAGAAGAAGGTCAACA	95°C 3min, (95°C 15sec / 64°C 30min / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>gyrA</i> (275) F: GACGGCCTGAAGCCGGTGCAC R: GCCCACGGCGATACCGCTGGA	95°C 3min, (95°C 15sec / 64°C 30min / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min

Tabla B3 – Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados y programa de PCR para la amplificación de genes de virulencia de *P. aeruginosa*

Cebador (5'→3')	Condiciones de PCR
<i>exoS</i> (276) F: TCAGGTACCCGGCATTCACTACGCGG R: TCACTGCAGTTCGTGACGTCTTTCTTTA	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>exoU</i> (277) F: AGCGTTAGTGACGTGCG R: GCGCATGGCATCGAGTAACTG	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>exoY</i> (228) F: TCCAAGCTTATGCGTATCGACGGTCATC R: CGTATCGATCCGAGGGGGGTGTATCTGACC	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>exoT</i> (228) F: TCACTGCAGTTCCGCGTGCTCCGACG R: TCAGGTACCTGCTGGTACTCGCCGTT	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min

Cebador (5'→3')	Condiciones de PCR
<i>popB</i> (228) F: TTTGGATCCATGAATCCGATAACGCTTG R: TTTGAATTCTCAGATCGCTGCCGGTCCG	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>lasA</i> (278) F: GCAGCACAAAAGATCCC R: GAAATGCAGGTGCCGGTC	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>aprA</i> (278) F: GTCGACCAGGCGGCGGAGCAGATA R: GCCGAGGCCCGCTAGAGGATGTC	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>toxA</i> (278) F: CTGCGCGGGTCTATGTGCC R: GATGCTGGACGGGTCGAG	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>lasB</i> (278) F: GGAATGAACGAAGCGTTCTCCGAC R: TGGCGTCGACGAACACCTCG	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>plcN</i> (278) F: TCCGTTATCGCAACCAGCCCTACG R: TCGCTGTGAGCAGGTCCAAC	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>plcH</i> (278) F: GCACGTGGTCATCCTGATGC R: GAGATGCAGGTTGCCGTGGA	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>tse3</i> (111) F: GGCACGCAATGCCTTGAT R: GCAGATGTGCAAGAAGGTGATG	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>pscS</i> * F: TGGTGCTGGTCCTGTCGCTG R: ACCACGGCACCTTCAGCAG	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>pscT</i> * F: GGACATCGCCCTACTGATCGG R: CGAGCAGCAGGGCATCGTAG	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>pscU</i> * F: CGGTTTCCTCAGCCTCG R: GGAATTCGTTGCAGCACCGG	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min

Cebador (5'→3')	Condiciones de PCR
<i>exsE</i> * F: AATCGATTTCCGCGGTGCAG R: AGACGCTGCAAGGCCTGCTC	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>Tse4</i> * F: CAACCTGGACACAAGCACGACA R: ATTTACCAGCGTTTCCGGC	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>Tle1</i> * F: GCGGGACATTGGCGAAGAAC R: GCTGGCGGACCGAACTTAGG	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>Tse1</i> * F: AAGGGACGGGCGAGTGGAGT R: GAAATCGTGCCCCAGTTCGG	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>Tse7</i> * F: CCAACGAGGTGTACGCCAACAA R: TCGAATCCGACCACCGCTTC	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>Tle3</i> * F: CAACGCATCCCCTGCTCCA R: GGCCAGCAGACCCATGTGT	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>tplE</i> * F: CACTCTTGTTCAAGACGATCAACCCT R: TCTGGTTTGTCCGAAGAAGCTGC	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>Tse5</i> * F: GAAGACTGGCGGAGCCATTGA R: GCTCCGTTTCAGTCGCTCC	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>Tse6</i> * F: ACCATCGACGGCCAGGTACAG R: GCAGCGCGACCGTGTACATC	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>HigAB</i> (279) F: CTCATGTTTCGATCTGCTTGC R: CAATGCTTCATGCGGCTAC	94°C 5min, (94°C 1min / 52°C 1min / 72°C 1min) x 30, 72°C 5min
<i>algD</i> (280) F: CTTTGGTTTGGGCTATGTGG R: GAACAGCTCGTCGCCATTG	95°C 10min, (94°C 30sec / 53°C 15sec / 72°C 1min) x 30, 72°C 7min

Cebador (5'→3')	Condiciones de PCR
<i>algL</i> (281) F: GAGGAGAATTCGCCGACCTGGTACCCCCGCC R: GAGGAGAATTCACCTCCCCCTTCGCGGCTGAACACC	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>algX</i> (280) F: CTTCTTCACCCACCTGGTG R: GGAAAGGAACTGCTGGTCG	95°C 10min, (94°C 30sec / 53°C 15sec / 72°C 1min) x 30, 72°C 7min
<i>lapA</i> * F: TGCCGGCCAACTTCAGCTATG R: CCTTGACGGTCGACACCACG	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>cupB5</i> * F: CAAGGTCATGGTGGGAGGCG R: GTCCAGGGTGCCGCTGAAGA	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>mucA</i> * F: GGAAACTCTGTCCGCTGTGATGG R: GCCCCCTGCTCTTCGCTGTA	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>lasR</i> * F: TTGGTTGACGGTTTTCTTGAGCTG R: CACCACTGCAACTTCCTTCTCC	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min
<i>fliC</i> (278) F: GGCAGCTGGTTNGCCTG R: GGCCTGCAGATCNCCAA	95°C 5min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 30sec) x 30, 72°C 5min

*Cebadores diseñados para este estudio

Tabla C3 – Secuencia nucleotídica de los cebadores empleados y programa de PCR para la amplificación de genes endógenos de *P. aeruginosa* (282)

Cebador (5'→3')	Condiciones de PCR
<i>mutL</i> F: CCAGATCGCCGCCGGTGAGGT R: CAGCGTCGCATAGAGGAAGTC	95°C 3min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 2min) x 35, 72°C 5min
<i>aroE</i> F: TGGGCCTATGACTGGAAACC R:-TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA	95°C 3min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 2min) x 35, 72°C 5min
<i>nuoD</i> F: CGCACATGTACGGCATCACCT R: CGCCAGGATCGTGTTCTTCA	95°C 3min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 2min) x 35, 72°C 5min
<i>acsA</i> F: ACCTGGGTGACGCCTCGCTGAC R: GACATAGATGCCCTGCCCTTGAT	95°C 3min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 2min) x 35, 72°C 5min
<i>ppsA</i> F: GGTCGCTCGCTCAAGCTAGTGG R: GGGTTCTTCTTCCGGATCGTAG	95°C 3min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 2min) x 35, 72°C 5min
<i>guaA</i> F: CGGCCTCGACGTGTGGATGA R: GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA	95°C 3min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 2min) x 35, 72°C 5min
<i>trpE</i> F: GCGGCCAGGGTCGTGAG R: CCCGGCGCTTGTTGATGGTT	95°C 3min, (95°C 15sec / 60°C 15sec / 72°C 2min) x 35, 72°C 5min

Anexo 4

Tabla A4 – Genes de virulencia – Base de datos VFDB

Categoría	Gen
Actividad antimicrobiana	<i>phzS</i>
	<i>phzM</i>
	<i>phzH</i>
	<i>phzG2</i>
	<i>phzG1</i>
	<i>phzF1</i>
	<i>phzE1</i>
	<i>phzD1</i>
	<i>phzC1</i>
	<i>phzB1</i>
Adherencia	<i>phzA1</i>
	<i>chpA</i>
	<i>chpB</i>
	<i>chpC</i>
	<i>chpD</i>
	<i>chpE</i>
	<i>cupB5</i>
	<i>fimT</i>
	<i>fimU</i>
	<i>fimV</i>
	<i>fleI/flag</i>
	<i>fleN</i>
	<i>fleP</i>
	<i>fleQ</i>
	<i>fleR</i>
	<i>fleS</i>
	<i>flgA</i>
<i>flgB</i>	

Categoría	Gen
	<i>flgC</i>
	<i>flgD</i>
	<i>flgE</i>
	<i>flgF</i>
	<i>flgG</i>
	<i>flgH</i>
	<i>flgI</i>
	<i>flgJ</i>
	<i>flgK</i>
	<i>flgL</i>
	<i>flgM</i>
	<i>flgN</i>
	<i>flhA</i>
	<i>flhB</i>
	<i>flhF</i>
	<i>fliA</i>
	<i>fliC</i>
	<i>fliD</i>
	<i>fliE</i>
	<i>fliF</i>
	<i>fliG</i>
	<i>fliH</i>
	<i>fliI</i>
	<i>fliJ</i>
	<i>fliK</i>
	<i>fliL</i>
	<i>fliM</i>
	<i>fliN</i>
	<i>fliO</i>
	<i>fliP</i>
	<i>fliQ</i>
	<i>fliR</i>

Categoría	Gen
	<i>fliS</i>
	<i>fliT</i>
	<i>lecB</i>
	<i>motA</i>
	<i>motB</i>
	<i>motC</i>
	<i>motD</i>
	<i>motY</i>
	<i>pilA</i>
	<i>pilB</i>
	<i>pilC</i>
	<i>pilD</i>
	<i>pilE</i>
	<i>pilF</i>
	<i>pilG</i>
	<i>pilH</i>
	<i>pilI</i>
	<i>pilJ</i>
	<i>pilK</i>
	<i>pilM</i>
	<i>pilN</i>
	<i>pilO</i>
	<i>pilP</i>
	<i>pilQ</i>
	<i>pilR</i>
	<i>pilS</i>
	<i>pilT</i>
	<i>pilU</i>
	<i>pilV</i>
	<i>pilW</i>
	<i>pilX</i>
	<i>pilY1</i>

Categoría	Gen
	<i>pilY2</i>
	<i>pilZ</i>
	<i>tcpI</i>
	<i>waaA</i>
	<i>waaC</i>
	<i>waaF</i>
	<i>waaG</i>
	<i>waaP</i>
	<i>wbpZ</i>
	<i>wcbR</i>
	<i>wzy</i>
	<i>wzz</i>
	<i>xcpA/pilD</i>
	<i>alg44</i>
	<i>alg8</i>
	<i>algA</i>
	<i>algB</i>
	<i>algC</i>
	<i>algD</i>
	<i>algE</i>
	<i>algF</i>
	<i>algG</i>
Antifagocitosis	<i>algI</i>
	<i>algJ</i>
	<i>algK</i>
	<i>algL</i>
	<i>algP/algR3</i>
	<i>algQ</i>
	<i>algR</i>
	<i>algU</i>
	<i>algW</i>
	<i>algX</i>

Categoría	Gen
	<i>algZ</i>
	<i>mucA</i>
	<i>mucB</i>
	<i>mucC</i>
	<i>mucD</i>
	<i>mucE</i>
	<i>mucP</i>
	<i>aprA</i>
	<i>aprF</i>
	<i>cgs</i>
	<i>clpC</i>
	<i>ctpV</i>
	<i>estA</i>
	<i>katA</i>
	<i>lasA</i>
	<i>lasB</i>
	<i>lapA</i>
	<i>lip1</i>
	<i>lipA</i>
Biosurfactantes y actividad enzimática	<i>lipC</i>
	<i>mep72</i>
	<i>nan1</i>
	<i>nan2</i>
	<i>piv</i>
	<i>plcB</i>
	<i>plcH</i>
	<i>plcN</i>
	<i>plcR</i>
	<i>prpL</i>
	<i>rhIA</i>
	<i>rhIB</i>
	<i>rhIC</i>

Categoría	Gen
	<i>fptA</i>
	<i>fpvA</i>
	<i>hasAP</i>
	<i>mbtH-like</i>
	<i>pchA</i>
	<i>pchB</i>
	<i>pchC</i>
	<i>pchD</i>
	<i>pchE</i>
	<i>pchF</i>
	<i>pchG</i>
	<i>pchH</i>
	<i>pchI</i>
	<i>pchR</i>
	<i>pvcA</i>
	<i>pvcB</i>
	<i>pvcC</i>
	<i>pvcD</i>
	<i>pvdA</i>
	<i>pvdD</i>
	<i>pvdE</i>
	<i>pvdF</i>
	<i>pvdG</i>
	<i>pvdH</i>
	<i>pvdI</i>
	<i>pvdJ</i>
	<i>pvdL</i>
	<i>pvdM</i>
	<i>pvdN</i>
	<i>pvdO</i>
	<i>pvdP</i>
	<i>pvdQ</i>

Captación de hierro

Categoría	Gen
	<i>pvdS</i>
	<i>pvdY</i>
	<i>gacA</i>
	<i>gacS</i>
	<i>hdtS</i>
	<i>lasI</i>
Regulación	<i>lasR</i>
	<i>ptxR</i>
	<i>rhII</i>
	<i>rlhR</i>
	<i>tsr</i>
	<i>clpV1</i>
	<i>dotU1</i>
	<i>exsA</i>
	<i>exsB</i>
	<i>exsC</i>
	<i>exsD</i>
	<i>exsE</i>
	<i>fha1</i>
	<i>hcp1</i>
	<i>hsiA1</i>
Sistemas de secreción y toxinas	<i>hsiB1/vipA</i>
	<i>hsiC1/vipB</i>
	<i>hsiE1</i>
	<i>hsiF1</i>
	<i>hsiG1</i>
	<i>hsiH1</i>
	<i>hsiI1</i>
	<i>icmF1/tssM1</i>
	<i>pcr1</i>
	<i>pcr2</i>
	<i>pcr3</i>

Categoría	Gen
	<i>pcr4</i>
	<i>pcrD</i>
	<i>pcrG</i>
	<i>pcrH</i>
	<i>pcrR</i>
	<i>pcrV</i>
	<i>pldA</i>
	<i>pldB</i>
	<i>popB</i>
	<i>popD</i>
	<i>popN</i>
	<i>ppkA</i>
	<i>pppA</i>
	<i>pscB</i>
	<i>pscC</i>
	<i>pscD</i>
	<i>pscE</i>
	<i>pscF</i>
	<i>pscG</i>
	<i>pscH</i>
	<i>pscI</i>
	<i>pscJ</i>
	<i>pscK</i>
	<i>pscL</i>
	<i>pscN</i>
	<i>pscO</i>
	<i>pscP</i>
	<i>pscQ</i>
	<i>pscR</i>
	<i>pscS</i>
	<i>pscT</i>
	<i>pscU</i>

Categoría	Gen
	<i>tagF/pppB</i>
	<i>tagQ</i>
	<i>tagR</i>
	<i>tagS</i>
	<i>tagT</i>
	<i>tle1</i>
	<i>tle3</i>
	<i>tplE</i>
	<i>tse1</i>
	<i>tse2</i>
	<i>tse3</i>
	<i>tse4</i>
	<i>tse5</i>
	<i>tse6</i>
	<i>tse7</i>
	<i>tssH-5/clpV</i>
	<i>vgrG1a</i>
	<i>vgrG1b</i>
	<i>xcpP</i>
	<i>xcpQ</i>
	<i>xcpR</i>
	<i>xcpS</i>
	<i>xcpT</i>
	<i>xcpU</i>
	<i>xcpV</i>
	<i>xcpW</i>
	<i>xcpX</i>
	<i>xcpY</i>
	<i>xcpZ</i>
	<i>exoS</i>
	<i>exoT</i>
	<i>exoU</i>

Categoría	Gen
	<i>exoY</i>
	<i>cydB</i>
	<i>hcnA</i>
	<i>hcnB</i>
	<i>hcnC</i>
	<i>higA</i>
	<i>higB</i>
	<i>toxA</i>

