



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
Factores de virulencia de Pseudomonas aeruginosa de origen clínico, animal, alimentario y ambiental
Autor/es
Gabriela Chichón de la Fuente
Director/es
Yolanda Sáenz Domínguez y María López Martínez
Facultad
Facultad de Ciencia y Tecnología
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico
2023-2024



Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* de origen clínico, animal, alimentario y ambiental, tesis doctoral de Gabriela Chichón de la Fuente, dirigida por Yolanda Sáenz Domínguez y María López Martínez (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.

Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

TESIS DOCTORAL

2024

Programa de Doctorado en *CIENCIAS BIOMÉDICAS Y BIOTECNOLÓGICAS POR
LA UNIVERSIDAD DE LA RIOJA Y LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA*

FACTORES DE VIRULENCIA DE

Pseudomonas aeruginosa

**DE ORIGEN CLÍNICO, ANIMAL, ALIMENTARIO Y
AMBIENTAL**

Gabriela Chichón de la Fuente

Director/a: Yolanda Sáenz Domínguez

Director/a: María López Martínez



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**



**Universidad
Zaragoza**



Dra. **YOLANDA SÁENZ DOMÍNGUEZ**, Investigador Principal del Área de Microbiología Molecular del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR)

Dra. **MARÍA LÓPEZ MARTÍNEZ**, Investigador posdoctoral del Área de Microbiología Molecular del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR)

Por la presente declaran que,

La memoria titulada **“FACTORES DE VIRULENCIA DE *Pseudomonas aeruginosa* DE ORIGEN CLÍNICO, ANIMAL, ALIMENTARIO Y AMBIENTAL”**, que presenta Dña. Gabriela Chichón de la Fuente, Graduada en Biología, ha sido realizada en el Área de Microbiología Molecular del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja, bajo su dirección, y reúne las condiciones exigidas para optar al título de Doctor.

Lo que hacen constar en Logroño, a 27 de marzo de 2024.

Fdo.: Dra. Yolanda Sáenz Domínguez

Fdo.: Dra. María López Martínez

A todos los que han hecho este viaje al conocimiento *de*
Pseudomonas aeruginosa mucho más emocionante.

La primera vez que pisé Logroño fue ese 10 de octubre de 2018. Comenzaba esta aventura en *nuestro punto de partida...* 42,4574°N – 2,4333°W. Yo no sabía que, al otro lado de esas puertas de espejo, que tanto juego han dado, iba a conocer a mi familia riojana. Esa que me iba a acompañar en el viaje más emocionante de mi vida. Os invito desde estas líneas a que sintáis la emoción de una joven lebrela que maduró en barrica riojana durante los años en que se desarrolló esta tesis.

En primer lugar, dar las gracias a la consejería de desarrollo económico e innovación del Gobierno de La Rioja, por concederme la beca de doctorado y la oportunidad de que este sueño se hiciera realidad y a la Fundación Rioja Salud por darme cobijo durante todos estos años.

Gracias a mis directoras de tesis, a la **Dra. Yolanda Sáenz Domínguez**, jefa del grupo de Microbiología Molecular del CIBIR por abrirme su laboratorio para que pudiera trabajar y aprender con ella y con su gran equipo, y su despacho para todo aquello que he podido necesitar. Y a la **Dra. María López Martínez** por todo lo que me ha ayudado en este camino, a unos pocos metros o a cientos de km, siempre te he sentido cerca, guiando mis pasos. A ambas, gracias, por tener la energía necesaria para conseguir acabar todo esto a pesar de los cambios que la vida nos ha propuesto.

Gracias a todo mi equipo de investigación, MicB es mucho más que lo que aparece en el organigrama, a la **Dra. Beatriz Rojo**, por todo lo que me has enseñado (riojanismos aparte), por tu constancia, confidencias y risas diarias. A **Paula Toledano**, mi grupo burbuja, mi COMPAÑERA, mi mano izquierda del laboratorio y mi salvación en más de una liada, sabes que sin tí esto no hubiera sido posible, te echo demasiado de menos. Pero, como he dicho, MicB es mucho más: ingenieros que hacen la vida más divertida, **Ignacio** y **Ana** sois mis *DOCs* y eso une muchísimo; compañeros en prácticas que nunca dejaban de sorprenderte y de los que no dejábamos de aprender...; las compañeras de estancias y todas las historias que dejan... **Evi**, **Meha** y muchos más... Y no puedo olvidarme del gran legado que dejó **Lidia Ruiz** mi “yo” antes de que yo existiera, es difícil darte en un lugar de estos agradecimientos, has marcado las bases y has sido un apoyo desde el principio hasta el final. Siempre seremos MicB.

El *cuarto del fondo* debe tener un espacio muy importante, pues lo ha tenido en este viaje, ese lugar en el que los buenos días se daban antes de amanecer y las buenas noches mucho después de haber anochecido, ese cuarto que tenía un poco de todo, menos una ventana. La paz que transmite **Estefanía**, los consejos insuperables de **María Izco** y la ayuda inestimable de **Lydia Álvarez-Erviti**, hacen de *Neuro* la mejor pareja de baile que MicB puede tener en esta aventura. Pero por ese pasillo, o por el *office*, también pasaba mucha más gente de la que no me puedo (ni quiero) olvidar: **Elvira**, **Soraya**, **Arancha**, **Patricia**, **Emma**, **Pablo**, **Ana Palomar**,

Nacho, María Iñiguez, Paula y Sonia Santibáñez, Carmencita, Elena, Raquel... todos habéis aportado un granito de arena, o un rico bombón, para que este viaje haya sido más dulce.

La **Dra. María de Toro** debe tener un espacio reservado y especial, cuanto he aprendido de ti y lo sigo haciendo... sé que no he sido la mejor alumna de bioinformática pues, entre otras cosas, “me falta mucho que leer”, si me hubiera leído la mitad de lo que me ha mandado por Twitter la *influencer* @Miss_Salmonella, si me hubiera lanzado a la piscina de la programación y de otras tantas cosas... pero... puedo prometerte... que brindaremos con un buen combinado de los años 20 y, como siempre, terminaremos hablando de la vida científica, pues la vida, desde el prisma de las 4 letras, es única.

Elegir un orden en el que exponer a tantos compañeros de viaje y aventuras es lo más complicado de esto, pero si alguien o algo ha llevado el timón de mi aventura riojana ha sido, sin ninguna duda, mi *Fashion closet*, esa fría y tenebrosa sala del secuenciador que tantas veces me ha ayudado a reconducir el rumbo cuando tenía cualquier problema, la mirada dulce y la mirada macarra, la cordura y la locura norteña, que lo mismo un día vamos de *Juanis*, que escapamos de una isla desierta, que encontramos mariquitas o mariposas con significados increíbles o te hacen el mejor retrato de tu vida, que intentamos patinar o nos hinchamos en el *Burgerheim*, que nos fotografiamos en una alpaca o en el *Riu*, que aparecen en la mejor charanga de mi vida o que me toca hacer de chofer de alto postín en fechas señaladas. **María PILAR Bea... Estefanía...** sois lo más bonito de este viaje.

A mis vecinos de Acequia, 13... todo lo que pueda decir de lo que me cuidasteis se quedaría escaso. Deli, Paula, Angelines, Carlota... la definición de “vecino” se queda pequeña a vuestro lado. A mis caseros, vuestra *moceta* no os va a olvidar nunca...

Pero en este viaje no iba a estar solo mi familia riojana... Como dijo una persona muy especial el día de mi boda, “con lágrimas en los ojos, Gabriela dijo que no podía estar en dos sitios a la vez” y es que nunca pensé que esos 315Km que marcaba el GPS (y Spotify) fueran a influir tanto en mi vida ya que a ambos lados de ese trayecto la vida de esta autora iba cogiendo una nueva forma.

A **ÁLVARO**, la primera persona a la que le conté llorando de emoción que me iba a Logroño a hacer la tesis, lo catalogué de *locura*. Y tú, sensato como siempre me propusiste una *locura aún más grande...*, un *descolocamiento* más, GRACIAS POR SER MI COMPAÑERO DE VIDA (y aunque aún suene muy fuerte, el marido perfecto). Te quiero y doy las gracias por la paciencia que has tenido en este viaje. Yo sé que compartir a *Ru* con 275 *Pseudomonas* no ha tenido que ser fácil, pero finalmente aquí está el resultado de tantas historietas que te he querido explicar, tantas horas encerrada en el cuarto y tantos planes pospuestos por cumplir esta *locura*, este “viaje al conocimiento de *Pseudomonas aeruginosa*” que ahora llega a puerto como algo NUESTRO.

Pero esta maduración en barrica riojana no hubiera podido existir sin unas bases científicas, sin las personas que sembraron las uvas con las que hacer este vino y es la familia del Ramón y Cajal. Mil gracias a la **Dra. Rosa del Campo**, mi madre científica, nunca tendré palabras de agradecimiento para todo lo que has hecho por mí al abrirme camino en este mundo y al no dejarme nunca que escape de él. A **Juande**, el biólogo que rompió las barreras del “ser biólogo” y nos enseñó que el saber no tiene límites, a **Marta Cobo** que me enseñó a sembrar *pseudos* en una placa, a **Marta Hernández** que me instruyó a sobrevivir en ciencia, a **Ana Rizos**, como me ha encantado leerte y citarte en este trabajo; a **Bea**, la autora de la primera tesis que yo vi, leí y asistí y a **Carla Lopez-Causapé**, que me hizo soñar con este momento y que desde *pubmed* ha acompañado en la sombra todo este viaje. A todo *microRyC* que siempre me habéis cuidado como aquella niña que no sabía “quién iba a hablar de su libro” y aquí está el resultado del suyo, que, aunque esté lejos, este trabajo también es vuestro y sé que lo apreciaréis como habéis hecho con cada pequeña cosa que os he ido contando.

Y hablando de ciencia, no me puedo olvidar de mi *micropiña*, gracias a esas dos personitas con las que la distancia no existe y que montamos un Microcongreso cada vez que suena el teléfono, para actualizar nuestras vidas, nuestras tesis... Gracias **Lara y Elena**.

Gracias por supuesto a mis amigos... **Lebreles**, cómo ha cambiado la vida en estos años... y como hay cosas que no cambian nunca... Gracias por hacer que cada vuelta a casa fuera mucho más que una vuelta a casa. **Botargas**, que arreglabais mi mundo tantas y tantas noches de viernes. **Galleguiños**, gracias por ilusionaros, por ver TVE si es necesario y, sobre todo, por hacerme sentir una más cada vez que podemos escaparnos. **Compañeros de trabajo, de pádel, de cañas, o de ratos varios...** que os habéis convertido en amigos y en apoyo en la recta final de este viaje. Y, lo que nunca pensé que escribiría aquí... gracias a mis **alumnos**, por dejar que las “*Pseudomonas alucinógenas*” entraran tantas veces en clase... A todos los que este viaje os haya quitado un poco (o mucho) tiempo, gracias por intentar entenderme, todos vosotros habéis contribuido a que esta *locura* llegue a su fin.

Y gracias, a mi familia, a **TODA MI FAMILIA**, no puedo expresar con palabras el apoyo que me habéis dado todos, creo que os he dejado para el final porque merecéis tener un espacio único, y es que habéis sufrido y disfrutado de este viaje a partes iguales. En especial a **Rosa** (ahora si puedo ponerme oficialmente la bata de Dra. Chichón) y **Luis** (gracias por los dispositivos de grabación de la motilidad y las alertas de Orbita Laika), a **Marcos, Noe, Raúl y Cynthia**, y a los nuevos miembros: **Elsa, David, Ainara, Jorge, Óliver y Aimar**, habéis crecido mucho más deprisa de lo que yo avanzaba esta tesis... este es el resultado de las ausencias a tantos cumpleaños que no os supe explicar. A **Gloria y Janeth** por la ilusión con la que preguntáis siempre por mis avances científicos, a **Mariví, Alda, Sherelda, Adriana y Nicolás**, a todos, espero que esta tesis os haga comprender un poco más mis *bichitos*.

Gracias a mi nueva familia, al abuelo **Pepe** por mostrar orgulloso el *nuevecuatrouno* en la cafetería, a **Carmelo** por brindar con *Ontañón* cada avance de esta tesis, a **María José** por toda la paciencia, comprensión y ayuda en este camino, a **Zaca** por sus rápidas e intensas llamadas y, mucho ánimo, mucha suerte y muchísima energía a **Adela**, el doctorado es una aventura maravillosa, disfrútala muchísimo.

A mis padres, gracias de corazón. **Mamá**, una parte de mí piensa que este sueño es nuestro sueño y que finalizo algo que alguna vez tu habías soñado. Sin las torrijas de esta recta final no hubiera acabado. **Goyo**, mi referente en la perseverancia, por enseñarme a luchar hasta no poder más, por pensar que puedo lograrlo TODO, y trasmitirmelo... y, como no, por acompañarme en los mejores momentos que esta etapa deja en *La Laurel*.

A **Guillermo**, espero que el faro que dijiste que te alumbraba te señale siempre el lado más bonito de la vida y no te deje estrellarte nunca. El universo no tiene límites y tú tampoco...

A mis abuelos **Eladia** y **Vidal**, que orgullosos que estaríais de ver a vuestra nieta “comiéndose el mundo”. A mi abuela **Vicenta** que vivió solo la parte “mala” de la distancia y lo que disfrutaba ella dándome todos los consejos para una ama de casa novata... y, como no, en especial, a **Rufino**, si alguien me hubiera dicho cuando empecé esta aventura que todos los días a las 20:15 Logroño y Pedrezuela iban a tener esta conexión... no me lo hubiera creído. Y más increíble todavía me parece que vaya a dedicarte esta tesis a tus casi 99 años... Y, es que eres lo mejor de este mundo y me das toda la energía necesaria para cumplir mis metas en la vida.

Y no podría acabar este documento sin mencionar a la persona que desde arriba ha guiado todos mis logros académicos, siempre creíste en mí y me impulsaste a conseguir todo. Gracias, **Tío Javi**, esto siempre ha sido por y para ti.

Gracias a ti también, lector, por tener curiosidad por este libro. Espero que este viaje al conocimiento de *Pseudomonas aeruginosa* sea tan emocionante como lo ha sido escribirlo.

Gabriela Chichón.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	17
LISTA DE FIGURAS	21
LISTA DE TABLAS	27
LISTA DE ANEXOS	29
LISTA DE PUBLICACIONES	31
RESUMEN	33
INTRODUCCIÓN	39
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
2. Resistencia a los antibióticos	43
2.1 Mecanismos de resistencia antimicrobiana en <i>P. aeruginosa</i>	49
2.1.1 Resistencias intrínsecas	50
Permeabilidad de la membrana externa	51
Sistemas de expulsión	52
Enzimas modificadoras de antibióticos	54
2.1.2 Resistencias adquiridas	55
Mutaciones en genes cromosómicos	55
Trasferencia horizontal de genes	57
3. Factores de virulencia	60
3.1 <i>Quorum sensing</i> : sistema de comunicación celular	61
3.1.1 Sistema Las	63
3.1.2 Sistema Rhl	64
3.1.3 Sistema Pqs	64
3.1.4 Sistema IQS	65
3.2 Biofilm	65
3.2.1 Composición del biofilm	66
3.2.2 Proceso de formación del biofilm	68
3.3 Pigmentos	69
3.3.1 Pioverdina: adquisición del hierro	70
3.3.2 Piocianina	72
3.3.3 Piorrubina	74
3.4 Proteasas	74

3.4.1	Exotoxina A (ExoA)	75
3.4.2	Elastasas LasA y LasB	75
3.4.3	AprA	76
3.5	Motilidad: adhesinas	76
3.5.1	Flagelo	77
3.5.2	Pili tipo IV	78
3.6	Lipopolisacárido y proteínas de membrana externa	80
3.7	Sistema de secreción tipo III y sus efectores principales	83
3.7.1	Regulación del T3SS	86
3.8	Exolisina A (ExIA)	87
4.	Elementos genéticos móviles/movilizables	90
5.	Filogenia molecular	94
5.1	PFGE	94
5.2	MLST	95
5.3	Secuenciación del genoma completo (WGS)	98
OBJETIVOS		103
MATERIAL Y MÉTODOS		108
1.	Cepas de <i>P. aeruginosa</i> incluidas en el estudio	108
1.1	Cepas de <i>P. aeruginosa</i> de origen no clínico	108
1.1.1	Cepas de individuos sanos	109
1.1.2	Cepas de animales sanos	109
1.1.3	Cepas de alimentos	109
1.1.4	Cepas de origen ambiental	110
1.2	Cepas de <i>P. aeruginosa</i> de origen clínico	110
1.3	Cepas control de <i>P. aeruginosa</i>	111
2.	Medios de cultivo.	111
2.1	Condiciones de cultivo	112
2.2	Conservación de las cepas	112
3.	Determinación de la sensibilidad a antibióticos.	112
3.1	Antibiograma.	113
3.2	Test sinérgico de doble disco	115
3.3	Dilución en agar	117
4.	Extracción y cuantificación del DNA	118
4.1	Protocolo con resina InstaGene Matrix (BioRad)	118

4.2 Extracción de DNA genómico.	119
5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	120
5.1 PCR para los estudios de virulencia	121
6. Electroforesis en gel de agarosa	124
7. Secuenciación	124
7.1 Secuenciación Sanger	124
7.1.1 Análisis de las secuencias	125
7.2 Secuenciación de genoma completo (WGS)	125
8. Análisis bioinformático	126
8.1 Ensamblaje y anotación	126
8.2 Visualización y comparación de genomas bacterianos	127
8.3 Análisis filogenético	127
8.4 Identificación de genes de resistencia a antibióticos. Resistoma mutacional	128
8.5 Identificación de genes de virulencia	128
8.6 Búsqueda de plásmidos	129
8.7 Análisis del serotipo <i>in silico</i>	129
8.8 Búsqueda de CRISPR-Cas	129
8.9 Comparación estructural de proteínas	129
9. Tipificación molecular	130
9.1 Serotipo	130
9.2 PFGE	130
9.2.1 Preparación de insertos	131
9.2.2 Lisis de insertos	131
9.2.3 Lavado de insertos	131
9.2.4 Digestión enzimática de los insertos	132
9.2.5 Preparación del gel de agarosa	132
9.2.6 Electroforesis	132
9.2.7 Tinción del gel y visualización	132
9.2.8 Análisis de los patrones de PFGE	133
9.3 MLST	133
10. Cuantificación de la producción de biofilm	136
10.1 Cuantificación de la biomasa	137
10.2 Cuantificación de la actividad metabólica dentro del biofilm	138
11. Producción de pigmentos	139
11.1 Recuentos bacterianos para análisis de pigmentos	141

11.2	Cuantificación de la producción de pigmentos	141
11.2.1	Piorrubina y pioverdina	141
11.2.2	Piocianina	142
12.	Actividad elastasa	143
13.	Motilidad	144
13.1	Análisis de las imágenes	146
13.1.1	Análisis manual de las imágenes	146
13.1.2	Análisis automático de las imágenes	147
14.	Análisis de los resultados	148
15.	Construcción de las Figuras.	149
RESULTADOS		153
1.	Caracterización de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> de origen clínico y no-clínico	154
1.1	Fenotipo de resistencia a agentes antipseudomónicos	154
1.2	Tipificación bacteriana	158
1.2.1	Serotipado	158
1.2.2	MLST	161
1.2.3	PFGE	167
1.3	Estudio de factores de virulencia	169
1.4	Formación de biofilm	175
1.5	Análisis de la producción de pigmentos.	179
1.6	Análisis de la actividad elastasa.	184
1.7	Análisis de la motilidad	189
1.8	Análisis de los principales clones encontrados en este estudio.	196
2.	Análisis de la resistencia a fluoroquinolonas: papel del gen <i>crpP</i> y los elementos integrativos y conjugativos móviles (ICEs)	201
2.1	Resistencia a fluoroquinolonas	205
2.2	Mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas	206
2.2.1	Mutaciones cromosómicas en dianas relacionadas con la resistencia a fluoroquinolonas	208
2.2.2	Sobreexpresión de las bombas de expulsión activas	211
2.2.3	Mecanismos transferibles de resistencia a las quinolonas. Presencia de <i>crpP</i>	215
3.	Análisis del clon ST274	223
3.1	Características biológicas	226
3.1.1	Fenotipo de resistencia a agentes antipseudomónicos.	226

3.1.2	Formación de biofilm	226
3.1.3	Actividad elastasa y producción de pigmentos	227
3.1.4	Motilidad	228
3.2	Propiedades del genoma de <i>P. aeruginosa</i> ST274 de diferentes orígenes	230
3.2.1	Análisis filogenético	232
3.2.2	Resistoma de las cepas <i>P. aeruginosa</i> pertenecientes al clon ST274.	238
3.2.3	Detección de genes de virulencia y <i>quorum sensing</i> .	246
3.3	Sistema CRISPR-Cas	251
4.	Análisis comparativo de tres clones de alto riesgo	252
4.1	Cepas seleccionadas	252
4.2	Tipificación bacteriana	254
4.2.1	Serotipo	254
4.2.2	Relación clonal	255
4.3	Fenotipo de resistencia a agentes antipseudomónicos.	257
4.4	Virulotipos	259
4.5	Parámetros biológicos	259
4.6	Propiedades del genoma de <i>P. aeruginosa</i> ST175, ST235 y ST973	262
4.6.1	Relación filogenética	263
4.6.2	Serotipo mediante NGS	264
4.6.3	Resistoma	265
4.6.4	Integriones	272
4.6.5	Viruloma	274
4.6.6	Genes implicados en <i>quorum sensing</i>	277
DISCUSIÓN		283
1.	Caracterización de cepas de <i>P. aeruginosa</i> de origen clínico y no-clínico.	284
2.	Análisis de la resistencia a fluoroquinolonas: papel del gen <i>crpP</i> y los elementos integrativos y conjugativos móviles (ICEs)	296
3.	Análisis del clon ST274	301
4.	Análisis comparativo de tres Clones de Alto Riesgo	307
CONCLUSIONES		317
REFERENCIAS		323

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados (Grados Celsius)
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
µm	Micrómetro
AAC	Acetiltransferasas
AMC	Amoxicilina – ácido clavulánico (antibiótico + inhibidor)
AMK	Amikacina (antibiótico)
ANT	Nucleotidiltransferasas
APH	Fosfotransferasas
ATCC	Colección americana de cultivos tipo (<i>American Type Culture Collection</i>)
ATM	Aztreonam (antibiótico)
atm	atmósfera
BHI	Infusión cerebro corazón (<i>Brain Heart Infusion</i>) (medio de cultivo)
BLEE	β-lactamasa de espectro extendido
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CAR	Clones de alto riesgo
CAZ	Ceftazidima
CC	Complejo clonal
CDC	Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos
CIBIR	Centro de Investigación Biomédica de La Rioja
CIP	Ciprofloxacina (antibiótico)
CLSI	Instituto de estandarización clínico y de Laboratorio (<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
cm	Centímetro
CMI	Concentración mínima inhibitoria (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
CPA	Antígeno Polisacárido Común
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAe	DNA extracelular
dNTPs	Desoxinucleótidos
DO	Densidad óptica
DOR	Doripenem (antibiótico)
DTR	Resistencias difíciles de tratar (<i>Difficult-to-treat resistance</i>)
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEE	Espacio Económico Europeo
EF-2	Factor de elongación -2
EGM	Elementos genéticos móviles
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
EPS	Exopolisacáridos
ESKAPE	Acrónimo de <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>Enterobacter spp.</i>
<i>et al.</i>	Y colaboradores
ETA	Exotoxina A
EU	Unión Europea
FAO	Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FEP	Cefepima (antibiótico)
FOX	Cefoxitina (antibiótico)
FQ	Fibrosis quística
g	aceleración (9,8 m/s ²)
GEN	Gentamicina (antibiótico)

GES	<i>Guiana Extended-Spectrum</i>
Gis	Islas genómicas (<i>Genomics islands</i>)
h	horas
HCULB	Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa
HUSP	Hospital Universitario San Pedro
I	Sensibilidad intermedia
IATS	Sistema Internacional de Tipificación Antigénica
ICEs	Elementos Conjugativos Integrativos (<i>Integrative Conjugative Elements</i>)
IDSA	Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas
IMP	Imipenem (antibiótico)
IQS	Integrated QS System
IREC	Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos
IS	Secuencia de inserción
kb	kilobase (1.000 bases)
kDa	KiloDaltons
L	Litro
LB	Luria-Bertani (medio de cultivo)
LEV	Levofloxacin (antibiótico)
LPS	Lipopolisacárido
M	Concentración molar (mol soluto/litro disolución)
mA	Miliamperios
Mb	Millones de pares de bases
MBLs	Metalo- β -lactamasas
MDR	Multirresistentes (<i>Multidrug-Resistant</i>)
MEM	Meropenem (antibiótico)
mg	Miligramo
MH	Müller-Hinton (medio de cultivo)
min	Minutos
mL	Mililitro
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
mM	Concentración milimolar
MOPS	3-(n-morfolino) ácido propanesulfónico (tampón)
Mpb	Millones de pares de bases
n°	Número
NaCl	Cloruro de sodio
NET	Netilmicina (antibiótico)
ng	Nanogramos
NGS	Secuenciación masiva (<i>next-generation sequencing</i>)
nm	Nanómetros
nM	nanomolar
NOR	Norfloxacin (antibiótico)
nt	Nucleótido
OF	Ofloxacin (antibiótico)
OHHLEP	<i>One Health High-Level Expert Panel</i> (Panel de expertos para una salud)
OMP	Proteínas de membrana externa (<i>outer membrane protein</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
OMSA	Organización Mundial de Sanidad Animal
ORFs	Marcos abiertos de lectura (<i>Open Reading Frames</i>)
OSA	Antígeno Específico O
PAGI	Islas genómicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> genomic islands)
Pasp	Proteasa pequeña de <i>P. aeruginosa</i>
PAβN	<i>Phenylalanine-Arginine β-Naphthylamide</i> (inhibidor de bombas de expulsión activa)
pb	pares de bases
PBP	Proteínas de unión a penicilinas
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
Pc	Promotor
PCN	Piocianina

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDC	Cefalosporinasa derivada de <i>Pseudomonas</i> (<i>Pseudomonas</i> -derived cephalosporinase).
PDR	Panrrresistentes (<i>Pandrug-Resistant</i>)
PFGE	Electroforesis en Campo Pulsante (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>)
pH	$\log 1 / (H^+) = -\log [H^+]$
PIP	Piperacilina (antibiótico)
PNUMA	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
PS	péptido señal
PTZ	piperacilina-tazobactam (antibiótico)
PVD	Pioverdina
QRDR	Región determinante de la resistencia a quinolonas
QS	<i>quorum sensing</i>
R	Resistente
RAM	Resistencia a Antibióticos
RNA	Ácido ribonucleico
RND	Resistencia-nodulación-división (<i>resistance-nodulation-division</i>)
ROS	Especies Reactivas De Oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
S	Sensible
s	segundos
SCV	Small colony variants (Variantes de colonia pequeña)
SEIMC	Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
spp.	Especies
ST	Secuencia tipo (<i>Sequence Type</i>) (MLST)
T2SS	Sistema de secreción de tipo II
T3SS	Sistemas de Secreción de tipo III
T4P	Pili tipo 4
T5SS	Sistema de secreción de tipo V
T6SS	Sistema de secreción de tipo VI
T^a	Temperatura
TBE	Tris-Bórico-EDTA (tampón para electroforesis)
TCS	Sistemas de dos componentes (<i>two-component systems</i>)
TE	Tris-EDTA (tampón para electroforesis)
THG	Transferencia horizontal de genes
Tn	Transposones compuestos
TOB	Tobramicina (antibiótico)
TOTEM	Microorganismos resistentes a TOP Ten (A global priority list of the TOP TEn resistant Microorganisms)
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano (solución)
TZP	Piperacilina-Tazobactam(antibiótico)
U	Unidades de enzima
UCIs	Unidades de Cuidados Intensivos
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
V	Voltios
V/cm	Voltios por centímetro
VIM	<i>Verona Integron-encoded Metallo-β-lactamase</i>
WGS	Secuenciación del genoma completo (<i>Whole Genome Sequencing</i>)
XDR	Extremadamente resistentes (<i>Extensively Drug-Resistant</i>)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imágenes de *Pseudomonas aeruginosa* A) Placa de cultivo de una cepa de en la que se observa la producción de pigmentos típica de esta especie bacteriana. B) Tinción de Gram C) Microscopio electrónico de transmisión

Figura 2: Representación circular del genoma de *P. aeruginosa* PAO1 generada con www.patricbr.org (consultado el 8 de mayo de 2021).

Figura 3. Árbol filogenético que representa los cinco clados de *P. aeruginosa*.

Figura 4: Mecanismos de acción de los principales antibióticos usados frente a *P. aeruginosa*.

Figura 5: Representación de las conexiones de la resistencias antimicrobiana de origen animal y humano.

Figura 6: Porcentaje de aislamientos invasivos de *Pseudomonas aeruginosa* con resistencia a carbapenémicos (imipenem/meropenem), por país, UE/EEE, 2021.

Figura 7: Análisis comparativo de la distribución de perfiles XDR en las diferentes regiones españolas entre los estudios de 2017 y 2022.

Figura 8: Principales mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa*.

Figura 9: Representación esquemática de los mecanismos intrínsecos de resistencia de *P. aeruginosa*.

Figura 10: Representación esquemática de los principales determinantes de resistencia adquirida en *P. aeruginosa*.

Figura 11: Mapa que muestra la distribución de carbapenemasas de *P. aeruginosa* a nivel mundial.

Figura 12: Características principales de la virulencia de *P. aeruginosa*.

Figura 13: Representación gráfica de los principales factores de virulencia utilizados por *P. aeruginosa* durante el proceso de infección.

Figura 14: Red jerárquica de *quorum sensing* (QS) en *P. aeruginosa*.

Figura 15: Proceso de desarrollo del biofilm de *P. aeruginosa*.

Figura 16: Estructura genética de los operones *pel*, *alg* y *psl*.

Figura 17. Colonias de *P. aeruginosa*, donde se distinguen los distintos pigmentos sintetizados.

Figura 18: Estructura de pioverdina.

Figura 19: Vía de absorción de hierro dependiente de pioverdina.

Figura 20: Biosíntesis y sistema de señalización de piocianina.

Figura 21: Representación esquemática de la estructura flagelar de *P. aeruginosa* y los productos genéticos implicados en el ensamblaje y/o regulación flagelar.

Figura 22. Estructura y función del pili tipo IV (T4P).

Figura 23: Diferentes alelos de pilina en *P. aeruginosa*.

Figura 24: Representación gráfica del lipopolisacárido de *P. aeruginosa* (PAO1) con antígeno O (bandas A y B), núcleo externo e interno.

Figura 25: Organización de los genes dentro de los clusters de biosíntesis OSA.

Figura 26: Estructura del sistema de secreción tipo III de *P. aeruginosa* y los genes que codifican sus principales componentes.

Figura 27: Esquema de la regulación del operón *exsCEBA*.

Figura 28. Representación esquemática de la secreción de ExIA.

Figura 29: Representación de la transcripción del operón *exlB-exlA*.

Figura 30: Representación gráfica de varios EGM: Secuencia de inserción (IS), transposón compuesto y plásmido.

Figura 31: Estructura general de los integrones.

Figura 32: Mapa genético del genoma PAO1 en el que se marcan los genes seleccionados para la realización del MLST en *P. aeruginosa*.

Figura 33: Representación de los complejos clonales a los que pertenecen los ST175 y ST253.

Figura 34: Instantánea de la población de *P. aeruginosa*.

Figura 35: Representación gráfica del pangenoma, genoma core y genoma accesorio.

Figura 36: Esquema de procedencia de las cepas del estudio y número de cepas incluidas.

Figura 37: Mapa de La Rioja en el que se representan las localizaciones en las que se recogieron las cepas medioambientales pertenecientes a este trabajo.

Figura 38: Distribución de los discos de antibiótico en las placas, para la realización de antibiogramas para *P. aeruginosa*.

Figura 39: Esquema del test sinérgico de doble disco para la detección de:

Figura 40. Replicador de Steers y esquema del mecanismo de siembra en placa.

Figura 41: Ejemplo de crecimiento de las placas a diferentes concentraciones de antibiótico.

Figura 42: Procedimientos llevados a cabo una vez extraído el DNA genómico y aplicaciones utilizadas para los diferentes análisis bioinformáticos realizados.

Figura 43. Esquema del análisis del serotipo.

Figura 44. Esquema del análisis de la producción de biofilm mediante las técnicas de CV (cuantificación de biomasa) o FDA (cuantificación de actividad metabólica del biofilm).

Figura 45: Representación esquemática del protocolo seguido para el análisis del biofilm.

Figura 46: Esquema del protocolo utilizado para el análisis de la cuantificación de la biomasa del biofilm mediante tinción con cristal violeta.

Figura 47: Esquema del protocolo utilizado para la cuantificación de la actividad metabólica del biofilm mediante FDA (diacetato de fluoresceína).

Figura 48. Esquema del protocolo utilizado para la cuantificación de la producción de pigmentos.

Figura 49: Fases acuosa y orgánica (cloroformo) obtenidas para la cuantificación de pigmentos.

Figura 50. Rectas de regresión empleadas para la cuantificación de piocianina.

Figura 51: Esquema del protocolo utilizado para la cuantificación de la actividad elastasa.

Figura 52: Esquema del protocolo seguido para el análisis de la motilidad bacteriana.

Figura 53: Esquema de trabajo del programa MotilityJ.

Figura 54: Esquema del procedimiento seguido para el análisis descriptivo y estadístico de los datos de este trabajo.

Figura 55: Resumen gráfico de los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis.

Figura 56. Número de cepas resistentes a los diferentes antipseudomónicos testados.

Figura 57. Fenotipo de resistencia de cada cepa a los diferentes antipseudomónicos testados.

Figura 58: Porcentaje de cepas resistentes a los distintos agentes antipseudomónicos desglosado por origen clínico (magenta) y no clínico (azul).

Figura 59. Perfiles de multiS, modR, MDR y XDR de las cepas analizadas en función de su origen clínico/no clínico.

Figura 60: Clasificación de los perfiles de multiS, modR, MDR y XDR en función del origen de cada cepa.

Figura 61. Serotipos detectados en las 275 cepas de *P. aeruginosa* según su origen no clínico (azul) o clínico (magenta).

Figura 62: Serotipos encontrados en las cepas de *P. aeruginosa* analizadas en función de su origen específico

Figura 63: Serotipos detectados en las cepas de *P. aeruginosa* incluidas en el estudio en función de su fenotipo de resistencia.

Figura 64. Representación de Phyloviz de todas las STs detectadas entre las cepas de este trabajo.

Figura 65. Representación gráfica de los ST compartidos entre las cepas no clínicas (azul) o clínicas (magenta).

Figura 66. Distribución de las secuencias tipo mayoritarias (aquellas detectadas en más de 3 aislados de *P. aeruginosa*), en los diferentes orígenes de las cepas de *P. aeruginosa* incluidas en el estudio.

Figura 67. Distribución de las cepas según sus fenotipos de resistencia a antibióticos y sus secuencias tipo mayoritarias (aquellas detectadas en más de 3 aislados de *P. aeruginosa*).

Figura 68: Distribución de las cepas pertenecientes a STs mayoritarios (>3 aislados) según su serotipo.

Figura 69. Representación de la nube de STs de *P. aeruginosa* en la que aparecen señaladas todas las STs encontradas en nuestro estudio.

Figura 70. Árbol filogenético construido a partir de los datos de los diferentes pulsotipos de PFGE analizados por GelJ.

Figura 71: Asociación entre los fenotipos de resistencia a antibióticos y los virulotipos encontrados en las 275 cepas estudiadas.

Figura 72: Diferentes estructuras del gen *lasR* encontradas en las cepas de *P. aeruginosa* analizadas en este estudio, en comparación con el gen *lasR* completo de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 (número de acceso de GenBank GCF_000006765.1).

Figura 73: Análisis de la producción de biofilm en cepas clínicas y no clínicas. A) Biomasa de biofilm (método CV): $p = 0,0167$; B) Actividad metabólica dentro del biofilm (método FDA).

Figura 74: Escala de categorización de la producción de biofilm analizando la biomasa del biofilm (método CV) y la actividad metabólica dentro del biofilm (método FDA).

Figura 75: Análisis de la producción de biofilm comparando los diferentes orígenes. A) Biomasa del biofilm (método CV); B) Actividad metabólica dentro del biofilm (método FDA).

Figura 76. Distribución de las 275 cepas en función de la producción de biofilm (CV y FDA) y los fenotipos de resistencia a antibióticos.

Figura 77. Producción de biofilm (CV y FDA) en las cepas QS-positivas y QS-negativas.

Figura 78: Análisis de la producción de pigmentos en cepas clínicas (magenta) y no clínicas (azul). A) Piocianina. B) Piorrubina.

Figura 79: Escala de categorización de la producción de pigmentos.

Figura 80: Análisis de la producción de pigmentos comparando los diferentes orígenes. A) Píocianina. B) Píorrubina * $p=0,019$.

Figura 81: Distribución de la producción de pigmentos (píocianina y píorrubina) y los fenotipos de resistencia a antibióticos.

Figura 82. Producción de pigmentos (píocianina y píorrubina) entre las cepas QS-positivas y QS-negativas.

Figura 83: Análisis de la producción elastasa comparando cepas clínicas (magenta) y no clínicas (azul).

Figura 84: Escala de categorización de la producción de elastasa.

Figura 85: Análisis de la producción elastasa comparando los diferentes orígenes.

Figura 86. Producción de actividad elastasa encontrada en las cepas de *P. aeruginosa* analizadas en función de su fenotipo de resistencia.

Figura 87: Producción de elastasa entre las cepas QS-positivas y QS-negativas.

Figura 88: Análisis de la motilidad comparando cepas clínicas y no clínicas. A) Swimming. B) Swarming,

Figura 89: Representación esquemática de la categorización de la motilidad.

Figura 90: Análisis de la motilidad comparando los orígenes específicos. A) Swimming, B) Swarming.

Figura 91. Análisis de la motilidad mediante swimming y swarming en las cepas de *P. aeruginosa* analizadas en función de su fenotipo de resistencia.

Figura 92: Motilidad entre las cepas QS-positivas y QS-negativas.

Figura 93: Patrones de motilidad identificados en *P. aeruginosa*.

Figura 94: Número de cepas clasificadas en los patrones de motilidad identificados en *P. aeruginosa*.

Figura 95: Esquema de resultados de la resistencia a fluoroquinolonas.

Figura 96: Heatmap que representa el fenotipo de resistencia a las diferentes fluoroquinolonas.

Figura 97: Heatmap representando los fenotipos de resistencia a fluoroquinolonas y los cambios aminoacídicos relevantes en dicha resistencia detectados en 12 proteínas cromosómicas (QRDR de las proteínas diana de fluoroquinolonas y proteínas relacionadas con bombas de expulsión y sus reguladores) de las 56 cepas de nuestra colección y las tres cepas de referencia.

Figura 98. Representación del alineamiento de PAO1 con la cepa G157 realizado mediante easyfig v2.5.5 en el que se puede apreciar que la cepa G157 carece de los genes *mexX*, *mexY* y *mexZ* (representados en rojo).

Figura 99: Árbol filogenético de máxima verosimilitud generado por el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las variantes de CrpP encontradas en este estudio.

Figura 100: Árbol filogenético de los *crpP*-ICEs detectados en las 43 *P. aeruginosa crpP*-positivas usando el plásmido pUM505 como referencia (referencia 1-2443).

Figura 101: Comparación de los diferentes entornos genéticos del gen *crpP* detectados en *P. aeruginosa crpP*-positivas.

Figura 102: Árbol filogenético comparativo de las 23 proteínas XerD que codifican para las integrasas de las ICEs que albergan *crpP* en *P. aeruginosa* y el plásmido de referencia pUM505 (HM560971.1).

Figura 103: Análisis de “puntos calientes” en las 59 cepas de *P. aeruginosa* de este trabajo

Figura 104: Resumen gráfico del análisis llevado a cabo en cepas pertenecientes al ST274.

Figura 105: Esquema de la procedencia de las cepas del estudio de análisis de *P. aeruginosa* ST274.

Figura 106: Dendrograma de patrones PFGE en *P. aeruginosa* ST274 de diferentes orígenes.

Figura 107: Producción de biofilm de *P. aeruginosa* ST274 respecto a PAO1.

Figura 108: Actividad elastasa y producción de pigmentos de las 11 cepas *P. aeruginosa* ST274 analizadas.

Figura 109: Valores de motilidad encontrados en las cepas de *P. aeruginosa* ST274.

Figura 110: Reconstrucción filogenética del genoma core de *P. aeruginosa*.

Figura 111: Resultados obtenidos del análisis del pangenoma de las 25 *P. aeruginosa* ST274 y las cepas control PAO1 y PA14.

Figura 112: Heatmap representando el resistoma mutacional (mutaciones no sinónimas) en 170 genes implicados en la resistencia a diferentes antimicrobianos de las 11 cepas *P. aeruginosa* ST274 de este trabajo y 14 cepas *P. aeruginosa*-ST274 de referencia obtenidas de la base de datos

Figura 113: Visualización de las predicciones de estructuras proteicas de OprD (A) y DacB/PBP4 (B) de las cepas PAO1 y G179.

Figura 114: Visualización de las predicciones de las estructuras proteicas de OprM de G245 respecto a PAO1.

Figura 115: Anillo de homología de los 250 genes de virulencia estudiados en las 11 cepas de *P. aeruginosa* ST274 de nuestra colección..

Figura 116: Esquema del locus cromosómico conservado entre los genes adyacentes *pilB* y *tRNA-Thr*.

Figura 117: Representación esquemática de las diferencias encontradas en la región codificante de pioverdina entre las cepas *P. aeruginosa* PAO1 (clase I), ATCC27853 (clase II), ATCC BAA-2108 (clase III) y las cepas de *P. aeruginosa* ST274.

Figura 118: Estructura A de CRISPR (a) y estructura B (b) detectadas entre las 11 cepas *P. aeruginosa* ST274 de este trabajo.

Figura 119: Representación porcentual del número de cepas incluidas en el estudio comparativo de clones de alto riesgo.

Figura 120: Origen específico de las cepas de *P. aeruginosa* incluidas.

Figura 121: Distribución de serotipos obtenidos mediante aglutinación para cada uno de los ST estudiados.

Figura 122: Dendrograma de patrones PFGE obtenido en las cepas *P. aeruginosa* pertenecientes al estudio de los clones de alto riesgo.

Figura 123: Patrones de resistencia encontrados en las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas pertenecientes a los clones ST175, ST235 y ST973.

Figura 124: Heatmap resumen del fenotipo de resistencia detectado en las cepas de *P. aeruginosa* del ST175, ST235 y ST973. A la derecha se muestra el fenotipo de resistencia asociado a cada cepa.

Figura 125: Resultados obtenidos en la producción de biofilm entre las cepas de los diferentes clones de alto riesgo analizados.

Figura 126: Resultados obtenidos en la producción de pigmentos entre las cepas de los diferentes clones de alto riesgo analizados.

Figura 127: Resultados obtenidos en la producción de elastasa entre las cepas de los diferentes clones de alto riesgo analizados.

Figura 128: Resultados obtenidos en la motilidad bacteriana, swimming y swarming, entre las cepas de los diferentes clones de alto riesgo analizados.

Figura 129: Árbol filogenético que muestra la relación entre las cepas *P. aeruginosa* de los tres clones de alto riesgo en relación con la cepa de referencia *P. aeruginosa*.

Figura 130: Apilamiento de la secuencia definida como O:15 por Huszczyński *et al.*, 2020 y la secuencia de una de las cepas *P. aeruginosa* ST973 (G205).

Figura 131: Genes de virulencia detectados entre las cepas de *P. aeruginosa* pertenecientes a los CAR ST175, ST235 y ST973.

Figura 132: Análisis del cluster de la pioverdina entre las cepas de *P. aeruginosa* ST175, ST235 y ST973 estudiadas.

Figura 133: Análisis del cluster relacionado con la síntesis del flagelo entre las cepas de *P. aeruginosa* ST973, ST175 y ST235 estudiadas.

Figura 134: Esquema del locus cromosómico conservado entre los genes adyacentes *pilB* y *tRNA-Thr*.

Figura 135: Representación de la secuencia y la localización del primer que hace que la PCR sea negativa. Primer F en verde y primer R en rosa. En gris la secuencia del gen *lasR*.

Figura 136: Representación gráfica del entorno de *rhl* de *P. aeruginosa* ST175.

Figura 137: Representación gráfica de la región *rhl* comparando PAO1, las tres cepas de ST175 que tienen la región presente y la cepa de referencia PA21 que al igual que el resto de las ST175 no presentan esta región.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Categorías antimicrobianas y antibióticos empleados para definir los microorganismos MDR, XDR y PDR en *P. aeruginosa*.

Tabla 2: Datos publicados por ECDC (2023) y el estudio multicéntrico.

Tabla 3: Bombas de expulsión de antimicrobianos de *P. aeruginosa*.

Tabla 4. Resumen de las principales características de los 10 mejores clones de alto riesgo de *P. aeruginosa*.

Tabla 5: Principales datos de las cepas clínicas incluidas en este trabajo.

Tabla 6: Antibióticos utilizados, familia a la que pertenecen, carga de cada disco y puntos de corte utilizados para definir su perfil de resistencia.

Tabla 7: Antibióticos utilizados en los análisis de concentración mínima inhibitoria.

Tabla 8. Componentes empleados en la PCR

Tabla 9. Secuencias nucleotídicas de los cebadores, programa y referencias para la amplificación de genes de virulencia.

Tabla 10. Secuencia nucleotídica, tamaño de amplicón y temperatura de hibridación de los 7 genes housekeeping usados para la técnica de PCR.

Tabla 11. Secuencia nucleotídica y tamaño de amplicón de los 7 genes *housekeeping* usados para la secuenciación de los mismos.

Tabla 12: Condiciones y polimerasas empleadas para la PCR de los genes *housekeeping* para la determinación del MLST

Tabla 13. Clasificación de las cepas de *P. aeruginosa* según su origen y perfil fenotípico.

Tabla 14. Serotipos no tipables encontrados en las 275 cepas de *P. aeruginosa* en función de los distintos orígenes.

Tabla 15: Nuevas combinaciones alélicas y las secuencias tipo (STs) asignadas por PubMLST de *P. aeruginosa*.

Tabla 16. Virulotipos detectados en las 275 cepas *P. aeruginosa* analizadas en este trabajo.

Tabla 17. Distribución de los diferentes virulotipos detectados en función del origen de las cepas.

Tabla 18. Producción de biofilm detectado según el origen de la cepa.

Tabla 19. Producción de pigmentos según el origen de la cepa.

Tabla 20. Actividad elastasa en las cepas de este trabajo, según el origen de la cepa.

Tabla 21: Resumen de las diferencias significativas en la motilidad entre los orígenes específicos.

Tabla 22. Motilidad detectada según el origen de la cepa.

Tabla 23: Resumen de las características principales encontradas en las cepas de nuestro estudio pertenecientes a clones de alto riesgo.

Tabla 24: Resumen de las características principales encontradas en los clones más frecuentes en nuestro estudio (no pertenecientes a los CAR ya analizados).

Tabla 25 Características de las cepas de *P. aeruginosa* seleccionadas para el estudio del análisis de la resistencia a fluoroquinolonas: papel del *crpP* y los elementos integrativos y conjugativos móviles (ICEs)

Tabla 26: Función e información de los 23 genes implicados en la resistencia a fluoroquinolonas seleccionados para analizar el resistoma mutacional en *P. aeruginosa*.

Tabla 27. Cambios aminoacídicos detectados en la región determinante de la resistencia a quinolonas (QRDR) de las proteínas GyrA, ParC, GyrB y ParE y el rango de CMI encontrado en las cepas analizadas.

Tabla 28: Valores de la CMI de ciprofloxacina (CIP) en ausencia y presencia de PA β N (40 mg/L).

Tabla 29. Sustituciones de aminoácidos de cada variante de CrpP detectadas en este estudio en comparación con la primera CrpP descrita en el plásmido pUM505 (CrpP-1).

Tabla 30: Elementos móviles insertados en los puntos de inserción PA0976/PA0988 y PA4541/PA4542 de las 59 *P. aeruginosa* analizadas.

Tabla 31. Características de las once cepas *P. aeruginosa* ST274 de diferentes orígenes seleccionados para este estudio.

Tabla 32: Características biológicas detectadas en las 11 cepas de *P. aeruginosa* ST274.

Tabla 33: Características generales de los genomas de las 11 *P. aeruginosa* ST274 estudiadas.

Tabla 34: Características de los 14 genomas de *P. aeruginosa* pertenecientes al ST274 y de las cepas de control PAO1 y PA14 descargadas de la base de datos NCBI.

Tabla 35: Recopilación del número de genes obtenidos al analizar el pangenoma de las 27 cepas incluidas en el análisis, usando Roary.

Tabla 36: Genes core detectados únicamente en las cepas de *P. aeruginosa* ST274.

Tabla 37: Genes de resistencia adquiridos detectados en las cepas *P. aeruginosa* pertenecientes al clon ST274 analizadas en este trabajo.

Tabla 38: Detección de alteraciones en los genes implicados en el fenotipo hipermutador de las 11 *P. aeruginosa* ST274 y las 14 cepas ST274 de la base de datos, con respecto al genoma PAO1.

Tabla 39: Características de las 42 cepas incluidas en el análisis comparativo de los clones de alto riesgo.

Tabla 40. Serotipo no tipables encontrados en las distintas cepas de *P. aeruginosa* en función de los distintos STs.

Tabla 41: Virulotipo detectado en cada uno de los ST analizados.

Tabla 42: Resumen de las características principales encontradas en las 42 cepas resistentes a imipenem de los clones ST175, ST235 y ST973.

Tabla 43. Parámetros de secuenciación y ensamblaje de las cepas de *P. aeruginosa* analizadas en este estudio

Tabla 44: Variantes aminoacídicas encontradas en las OprD de las 20 cepas CAR.

Tabla 45: Resistoma mutacional de los clones analizados en el estudio.

Tabla 46: Análisis del fenotipo hipermutador en las cepas de los CAR secuenciadas.

Tabla 47: Integrones encontrados en cada cepa de los clones de alto riesgo.

Tabla 48: Entorno genético de *rhl* en *P. aeruginosa*.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Datos de procedencia de cada una de las cepas incluidas en la tesis.

Anexo 2. Conjunto de datos y función de los 170 genes de resistencia a los antimicrobianos (www.pseudomonas.com) analizados para determinar el resistoma mutacional de *P. aeruginosa* y los 250 genes de virulencia (Virulence Factor DataBase) analizados para determinar el viruloma mutacional de *P. aeruginosa* ST274.

Anexo 3: Resultados del estudio de caracterización de las 275 cepas *P. aeruginosa*.

Anexo 4. Concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a fluoroquinolonas, variantes de CrpP y resistoma mutacional de fluoroquinolonas detectado en las 59 *P. aeruginosa* analizadas.

Anexo 5: Resistoma mutacional de las 25 cepas de *P. aeruginosa* ST274 analizadas con respecto al genoma PAO1.

Anexo 6: Cambios aminoacídicos detectados en el viruloma de las 25 cepas de *P. aeruginosa* ST274 estudiadas.

Anexo 7: Caracterización de las cepas pertenecientes a los CAR ST175, ST235 y ST973.

Anexo 8: Genes de resistencia adquiridos y mutaciones detectadas en los principales genes de resistencia antimicrobiana en las cepas pertenecientes a los CAR ST175, ST235 y ST973.

Anexo 9: Figura con la comparativa entre las diferentes clases de pioverdina.

Anexo 10. Datos de las secuencias incluidas en el estudio del rhl en *P. aeruginosa* ST175

En el siguiente link y código QR se puede acceder a los Anexos.

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/1cogP15BS2XFCLlpaaPftgIRgIBY6wFax/edit?usp=sharing&oid=116576147495656543813&rtpof=true&sd=true>



LISTA DE PUBLICACIONES

- Chichón, G., López, M., de Toro, M., Ruiz-Roldán, L., Rojo-Bezarez, B., & Sáenz, Y. (2023). Spread of *Pseudomonas aeruginosa* ST274 Clone in Different Niches: Resistome, Virulome, and Phylogenetic Relationship. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(11), 1561. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12111561>
- López, M., Rojo-Bezarez, B., Chichón, G., & Sáenz, Y. (2022). Resistance to Fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa* from Human, Animal, Food and Environmental Origin: The Role of *CrpP* and Mobilizable ICEs. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(9), 1271. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091271>
- Casado-García, Á., Chichón, G., Domínguez, C., García-Domínguez, M., Heras, J., Inés, A., López, M., Mata, E., Pascual, V., & Sáenz, Y. (2021). MotilityJ: An open-source tool for the classification and segmentation of bacteria on motility images. *Computers in biology and medicine*, 136, 104673. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104673>
- Rojo-Bezarez, B., Casado, C., Ceniceros, T., López, M., Chichón, G., Lozano, C., Ruiz-Roldán, L., & Sáenz, Y. (2024). *Pseudomonas aeruginosa* from river water: antimicrobial resistance, virulence and molecular typing. *FEMS microbiology ecology*, fae028. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/femsec/fae028>

Al final de este documento se adjuntan los originales de las publicaciones.

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria ubicua, patógeno oportunista y con una alta versatilidad metabólica. Este patógeno presenta resistencia intrínseca y elevada capacidad de adquirir mecanismos de resistencia, producción de biofilm y un amplio arsenal de mecanismos de virulencia que dificultan su erradicación. Sin embargo, pese al impulso del concepto *One Health*, la mayoría de los estudios en esta especie se han realizado sobre aislados clínicos. La finalidad principal de esta tesis fue analizar los marcadores genéticos y biológicos implicados en virulencia, patogenicidad, resistencia a antibióticos y clonalidad que favorecen la diversidad y éxito de *P. aeruginosa*.

Por ello, el primer objetivo fue caracterizar los factores de virulencia, los parámetros biológicos de patogenicidad, la resistencia a antibióticos y la diseminación clonal de 275 cepas de *P. aeruginosa*, tanto clínicas (respiratorias, sangre, orina y otros orígenes como exudados de heridas) como no clínicas (individuos sanos, animales, alimentos y medioambientales). De ellas, un 64% resultaron sensibles a todos los antipseudomónicos testados, un 15% se clasificaron como modR, un 18% MDR y un 3% XDR, mostrando diferentes fenotipos de resistencia en función del origen. El serotipo no tipable (30%) fue el más frecuente, siendo más prevalente en las cepas de origen clínico, seguido de O:6 (19%), O:1 (12%), O:3 y O:11 (8% cada uno). Se demostró la elevada variabilidad de esta población al clasificarse las 275 cepas en 245 pulsotipos diferentes mediante PFGE (221 pulsotipos únicos) y en 127 STs diferentes mediante MLST (95 STs en las cepas no clínicas y 49 STs en las clínicas), siendo ST235, ST253, ST274, ST175, ST244 y ST973 los más prevalentes y 27 STs nuevos. Por otro lado, un 67% de las cepas presentaron el genotipo *exoS*⁺/*exoU*⁻ y el 28% el genotipo *exoS*⁻/*exoU*⁺. Además, se detectaron otros genotipos menos comunes: *exoS*⁺/*exoU*⁺ (1%) y *exoS*⁻/*exoU*⁻ (4%) en cepas de origen no clínico. Nueve cepas que carecían del sistema de secreción tipo III (T3SS) poseían la exolisina ExlA. Se observaron asociaciones STs-serotipo-efector T3SS, como ST235-O:11-*exoU*; ST175-O:4-*exoS*; ST274-O:3-*exoS*; ST245-O:5-*exoS*, ST17-O:1-*exoS* ó ST155-O:6-*exoS*. La caracterización de los parámetros biológicos mostró que las cepas no clínicas presentaban mayor producción de biofilm y pigmentos (piocianina principalmente), actividad elastasa y motilidad que las cepas clínicas, pero además esas

características eran inversamente proporcionales a la resistencia a antibióticos o a quorum sensing afuncionales, lo que favorece su adaptación a diferentes entornos.

El segundo objetivo fue analizar la resistencia a fluoroquinolonas y presencia de mecanismos asociados a la misma, en una selección de 56 cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico y no clínico. Veintidós cepas (37%) mostraron resistencia a, al menos, una fluoroquinolona. Se observó una correlación entre el número de cambios en las proteínas GyrA y ParC y el nivel de resistencia a fluoroquinolonas. Se detectó también sobreexpresión de bombas de expulsión asociada con alteraciones o ausencia de genes como *mexZ*, *mvaT* y *nalD*. El gen *crpP* se observó en 43 cepas (72.9%) (49% sensibles a fluoroquinolonas y 40% no clínicas), codificando siete variantes diferentes de CrpP, incluida una nueva (CrpP-7). Este gen se localizó en 23 elementos móviles integrativos y conjugativos (ICEs) cromosómicos diferentes, que contenían otros elementos de interés como piocinas o determinantes de resistencia a metales.

El clon de alto riesgo epidémico internacional ST274 está asociado con entornos hospitalarios y pacientes con fibrosis quística en todo el mundo. Por lo que el tercer objetivo fue caracterizar 11 cepas ST274 de origen clínico y no clínico. Las cepas XDR/DTR, modR y con *lasR* truncado mostraron un fenotipo de infección crónica caracterizado por la pérdida de antigenicidad específica de serotipo y baja motilidad. Además, las cepas XDR/DTR y modR presentaron una baja producción de pigmentos y formación de biofilm, mientras que fue muy alta en la cepa *lasR*-truncada. El análisis de los genomas de las cepas, junto con otras catorce *P. aeruginosa*-ST274 disponibles en la base de datos, mostraron ciertas asociaciones como la presencia de los genes *bla_{OXA-486}* y *bla_{PDC-24}*, serotipo O:3, genotipo *exoS⁺/exoU⁻*, el grupo V de pili tipo IV, el locus de pioverdina clase II y patrones mutacionales en proteínas como PmrAB, ToxA, FusA2 o AmpD.

Finalmente, existen clones de alto riesgo (CAR) particularmente comunes entre los aislados clínicos MDR/XDR y ampliamente diseminadas a nivel internacional, que también se detectaron en esta tesis. Por lo que el cuarto objetivo fue analizar las características biológicas y los marcadores moleculares de todas las cepas resistentes a imipenem y pertenecientes a los CAR ST175, ST235, y ST973. En general presentaron

fenotipos MDR/XDR, baja producción de pigmentos, de biofilm y de actividad elastasa, así como una motilidad defectiva. El análisis del genoma completo de estas cepas permitió la detección de ciertos marcadores específicos para ST175: serotipo O:4, PDC-1, OXA-50, CrpP-2, *exoS*, *pilA_I*, pioverdina clase I, pérdida del sistema *rhl*; ST235: serotipo O:11, PDC-35, OXA-488, CrpP-1, *exoU*, *pilA_{II}*, pioverdina clase II; y ST973: serotipo O:15, PDC-5, OXA-50, CrpP-4, *exoS*, *pilA_{II}*, pioverdina clase III, pérdida de *lasR*.

Todos los datos de *P. aeruginosa* aportados en esta tesis ponen de manifiesto la importancia de las cepas de orígenes diferentes al entorno clínico como posibles reservorios de determinantes de resistencia y virulencia, que deben considerarse y monitorizarse desde un enfoque "One Health". Los resultados proporcionados podrían servir de base para estudios más específicos centrados en una mejor gestión de antibióticos y nuevos desarrollos terapéuticos.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. *Pseudomonas aeruginosa*

El género *Pseudomonas* es un conjunto complejo y versátil de bacterias, pertenecientes a la clase γ -proteobacteria, orden *Pseudomonadales*; y de la familia *Pseudomonadaceae*. El nombre, *Pseudomonas* fue propuesto por primera vez por Walther Migula en 1894 en referencia a los conceptos griegos “*pseudo*” y “*monas*” que significan “falso” y “unidad simple”, es decir, “falsa unidad”.

Pseudomonas aeruginosa es la principal especie patógena de la familia *Pseudomonadaceae* y la más importante de este género bacteriano. Su denominación específica deriva de la palabra “*aerugo*” que significa “óxido de cobre” y “*osus*” adjetivo que indica abundancia, en referencia a la pigmentación de color azul-verdoso que presentan algunas de sus colonias (Etymologia, 2012). Schroeter, en 1972, adjuntó el nombre al género *Bacterium*, considerando entonces *Bacterium aeruginosum* y, más tarde, en 1900, Migula transfirió la especie al recién descrito género *Pseudomonas* (Palleroni, 2010; de Sousa *et al.*, 2021)

P. aeruginosa es una bacteria ubicua, Gram-negativa, con forma de bacilo curvado, un tamaño de 0,5-3 μm y un flagelo polar que le permite el movimiento (Figura 1). Es un microorganismo no fermentador y no formador de esporas (Palleroni, 1984). Generalmente posee un metabolismo aerobio, aunque en condiciones de anaerobiosis es capaz de utilizar el nitrato como aceptor final de electrones. *P. aeruginosa* puede sobrevivir en una amplia variedad de condiciones ambientales y es capaz de crecer a temperaturas de entre 4°C y 42°C, siendo su temperatura óptima de crecimiento 37°C (de Sousa *et al.*, 2021). Las colonias suelen ser planas, extendidas y con un borde dentado, pero pueden existir otras morfologías, incluidas las variantes mucoides o de colonia pequeña (*small colony variants*, SCV).

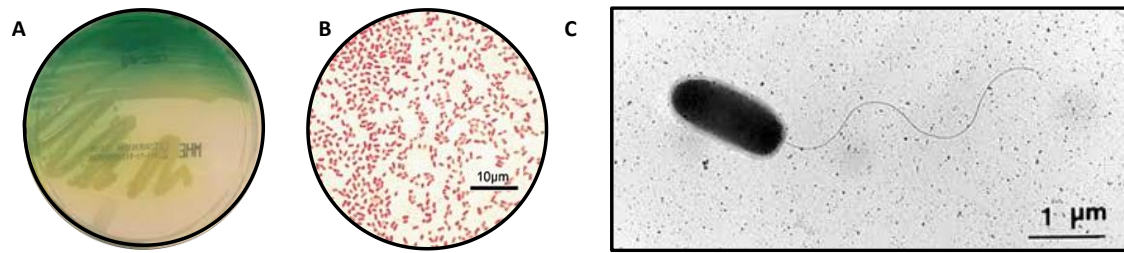


Figura 1: Imágenes de *Pseudomonas aeruginosa* A) Placa de cultivo de una cepa de *P. aeruginosa* en la que se observa la producción de pigmentos típica de esta especie bacteriana (Imagen propia). B) Tinción de Gram (Centro estadounidense para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). C) Microscopio electrónico de transmisión (Fernando García. Agencia iberoamericana para la difusión de la ciencia y la tecnología).

P. aeruginosa, puede aislarse de una amplia variedad de entornos, incluidos el suelo y el agua. De este modo, se puede encontrar fácilmente en entornos afectados por la actividad humana o animal y, de hecho, ha sido descrito en humanos, animales, alimentos (como la leche o la carne), el suelo, el agua (tanto marina como dulce), ambientes contaminados con petróleo, ambientes hospitalarios, fregaderos y desagües, entre otros (Crone *et al.*, 2020; Diggle *et al.*, 2020; Bel Hadj Ahmed *et al.*, 2019).

P. aeruginosa posee un genoma adaptativo de entre 5,5 y 7 millones de pares de bases (Mpb) y un contenido en guanina-citosina (G+C) entre 65 y 67%. El abanico de genes conservados es de los mayores observados entre los genomas bacterianos conocidos (Moradali *et al.*, 2017). En el año 2000, Stover y su equipo secuenciaron el genoma completo de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 (Stover *et al.*, 2000) (Figura 2). Su cromosoma es circular con un tamaño de 6,3 Mpb (más grande que el de otros genomas bacterianos secuenciados). Además, alberga 5.570 marcos abiertos de lectura (*Open Reading Frames*, ORFs), de los cuales se conoce la función de menos de la mitad. Dentro de la gran cantidad de genes que codifica, destacan aquellos implicados en la regulación metabólica (>9,4%) que le confieren su gran versatilidad y le permiten adaptarse a entornos complejos, pudiendo utilizar más de ochenta compuestos orgánicos (Kiska & Gilligan, 2003). Actualmente existen multitud de genomas secuenciados de cepas de *P. aeruginosa*, como se puede observar en bases de datos como la del genoma de *Pseudomonas* (www.pseudomonas.com).

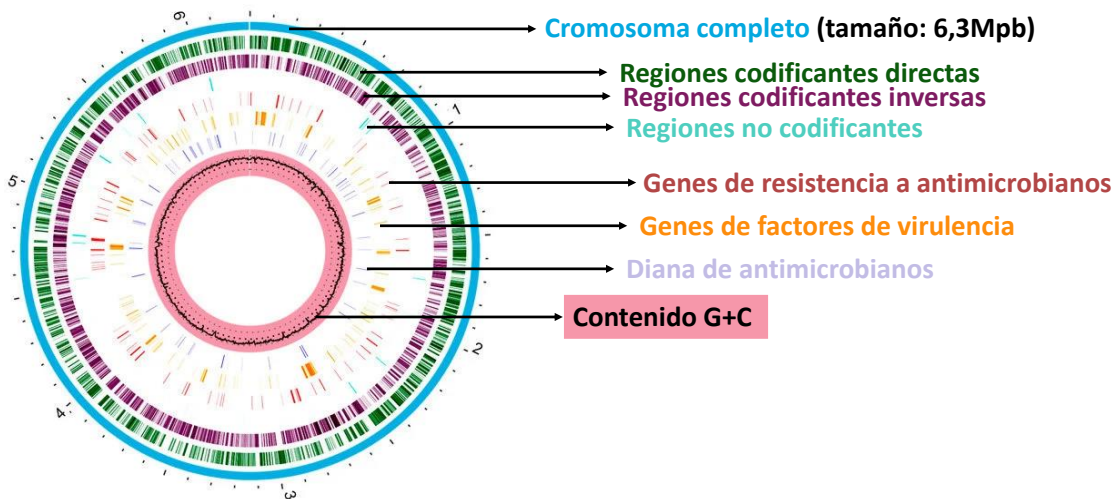


Figura 2: Representación circular del genoma de *P. aeruginosa* PAO1 generada con www.patricbrc.org (consultado el 8 de mayo de 2021). Editada de de Sousa *et al.*, 2021.

El pangenoma es el conjunto de todos los genes de la especie, diferenciándose en genoma “core”, el conjunto de genes presentes en todas las cepas, y genoma accesorio, aquellos que son compartidos sólo por algunas cepas, incluyendo a los genes únicos, presentes en una única cepa. Observando los diferentes pangenomas de *P. aeruginosa*, se ha propuesto una estructura poblacional de esta especie formada por cinco filogrupos: dos grupos principales (clados 1 y 2) que incluyen la mayoría de los aislados, un tercer grupo muy distante respecto a los clados 1 y 2, y los dos grupos restantes (clados 4 y 5) con una posición intermedia entre los grupos 1 –2 y grupo 3 (Freschi *et al.*, 2019) (Figura 3).

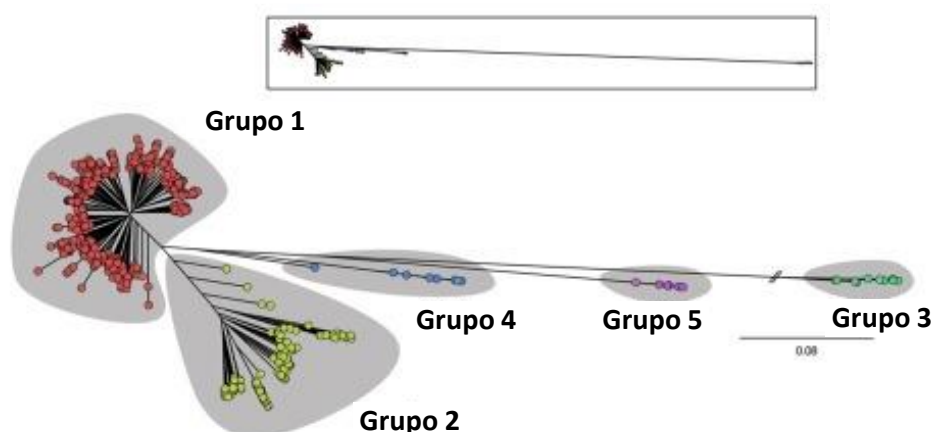


Figura 3: Árbol filogenético que representa los cinco clados de *P. aeruginosa*. Los diferentes grupos de aislamientos están resaltados por áreas grises con colores específicos. El árbol en la parte superior del panel muestra la distancia genética real entre los aislados del clado 3 y el resto de clados. Editado de Freschi *et al.*, 2019.

La capacidad de *P. aeruginosa* para causar infecciones en una gran variedad de huéspedes también puede utilizarse para ejemplificar su alta adaptabilidad, patogenicidad y distribución ubicua. De hecho, se han reportado infecciones por este microorganismo en plantas, animales (insectos, nematodos, peces o mamíferos) y, amebas, como *Dictyostelium discoideo*, destacando las infecciones que produce en la especie humana (Sanz-García *et al.*, 2021).

P. aeruginosa es uno de los patógenos oportunistas más importantes y principales causantes de infecciones nosocomiales a nivel mundial. *P. aeruginosa* aprovecha el estado de inmunosupresión o un tratamiento invasivo, como cirugías, catéteres o sondas, para invadir e infectar con éxito al huésped. Entre el amplio abanico de infecciones, agudas y crónicas, destacan: otitis externa, foliculitis, conjuntivitis frecuentemente asociada al uso de lentes de contacto, queratitis y otras formas de infección ocular (Crone *et al.*, 2020; Hilliam *et al.*, 2020). Sin embargo, las infecciones graves y con peor curso tienen un origen nosocomial e incluyen neumonías, bacteriemias e infecciones de heridas quirúrgicas, quemaduras y vías urinarias, siendo la principal causa de neumonías asociadas a ventilación automática e infecciones del tracto urinario en pacientes ingresados en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs). *P. aeruginosa* produce además infecciones crónicas en pacientes con fibrosis quística (FQ) y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Laborda *et al.*, 2021; Jurado-Martín *et al.*, 2021).

P. aeruginosa presenta algunas características muy importantes que hacen que esta bacteria sea un patógeno oportunista de difícil erradicación: resistencia intrínseca a antibióticos, capacidad para adquirir mecanismos de resistencia, producción de biofilm y amplio arsenal de mecanismos de virulencia (Nicolau & Oliver, 2010; Subedi *et al.*, 2018).

P. aeruginosa se incluye en las agrupaciones: ESKAPE (acrónimo de *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter spp.*) y TOTEM (*TOp TEn resistant Microorganisms* adscritos a las UCIs) que incluyen los patógenos humanos multirresistentes más relevantes a nivel mundial (Rice, 2008; Rello *et al.*, 2019). Así mismo, en 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó la lista de patógenos prioritarios globales. Esta lista incluye 12

familias de bacterias clasificadas según su resistencia a los antibióticos y su amenaza para la salud humana. *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos se incluye en el primer grupo, Prioridad 1-Crítica en la búsqueda de nuevos antibióticos y tratamientos para combatirla (Tacconelli *et al.*, 2018).

2. Resistencia a los antibióticos

Los **antibióticos** son sustancias químicas producidas por microorganismos, que se utilizan para prevenir y tratar infecciones bacterianas y pueden tener un origen natural o semisintético. Los **antimicrobianos** incluyen los compuestos obtenidos de forma natural, semisintéticos y los diseñados totalmente en el laboratorio (Paredes & Roca, 2004). Además, el término antibiótico tiene un significado más limitado en comparación con antimicrobiano, de hecho, este último incluye sustancias que actúan contra todos los microorganismos (bacterias, virus, parásitos y hongos) (Ferri *et al.*, 2017). Actualmente se utilizan indistintamente en la literatura científica. En este trabajo se empleará mayoritariamente antibióticos para referirse a ambos conceptos.

Los antibióticos, atendiendo a su efecto, se clasifican generalmente en agentes bactericidas, cuando resultan letales para las bacterias, y agentes bacteriostáticos cuando ralentizan o detienen el crecimiento bacteriano. Los principales modos de acción de los antibióticos incluyen: inhibir la síntesis de la pared celular, alterar las membranas citoplasmáticas, suprimir la síntesis proteica, alterar el metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos y bloquear los mecanismos de resistencia (Figura 4).

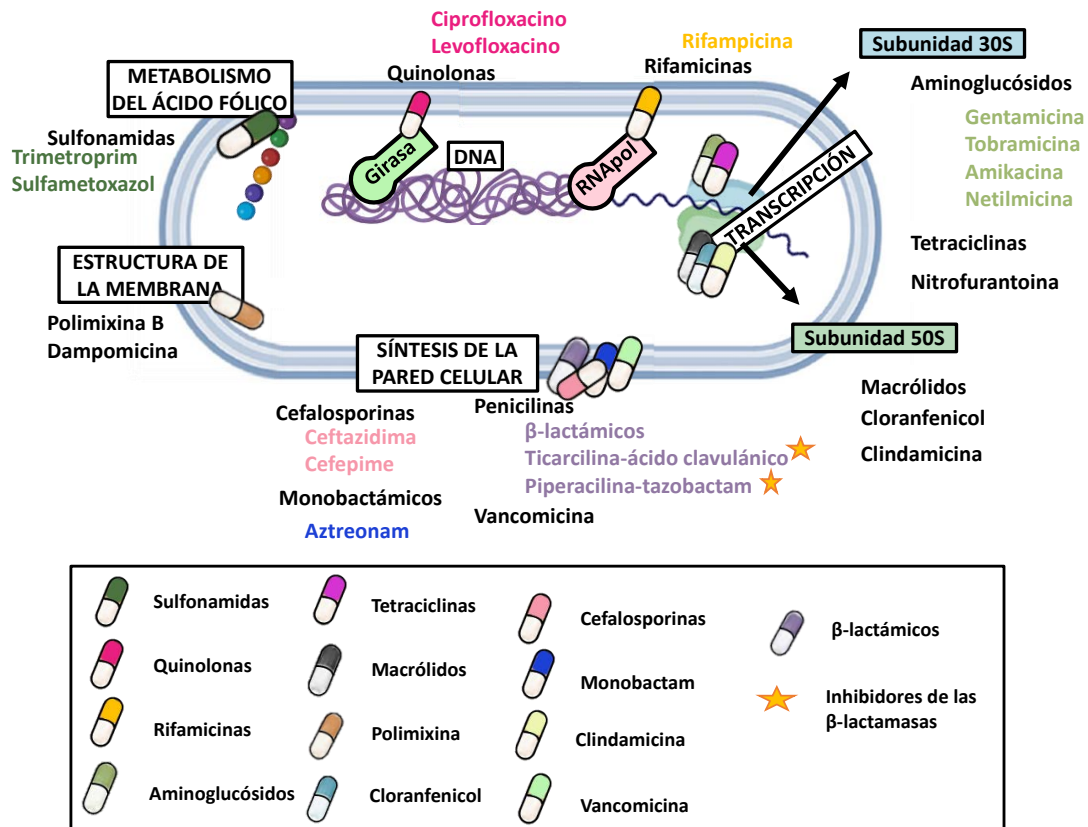


Figura 4: Mecanismos de acción de los principales antibióticos usados frente a *P. aeruginosa*.

La **Resistencia a Antibióticos** es la capacidad que presentan los microorganismos de resistir a la acción de uno o más agentes antimicrobianos. Esta capacidad forma parte de la evolución microbiana, y es un proceso natural e inevitable (Martínez, 2008). Sin embargo, el uso inadecuado y excesivo de antibióticos ha contribuido al incremento de los niveles de resistencia, mediante la selección de bacterias no sensibles a su acción.

Las personas que contraen infecciones causadas por bacterias resistentes tienen peor pronóstico y mayor probabilidad de mortalidad que aquellas con infecciones causadas por bacterias sensibles. El CDC estima que más de 2 millones de personas sufren cada año una infección causada por bacterias resistentes a los antibióticos, y se estima que, de estas, 23.000 fallecerán. En el caso de Europa, se calcula que el número de muertes por infecciones provocadas por bacterias resistentes es de 33.000 al año. Por su parte, la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), estimó que la mortalidad de pacientes con infecciones por bacterias multirresistentes en España es 30 veces superior a la de los accidentes de tráfico.

De este modo, la OMS y otras organizaciones estiman que las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos en 2050 causarán la muerte de unos 10 millones de personas (O'Neill, 2014).

La resistencia a los antibióticos es una emergencia mundial importante que trasciende del entorno clínico. La aparición y propagación de bacterias resistentes a los antibióticos son fenómenos complejos influenciados por interacciones en diversos ecosistemas (Figura 5). El ser humano, los animales y el medioambiente están interconectados, lo que aumenta la propagación de las bacterias resistentes y globaliza el problema. Por ello, se han propuesto los conceptos **One Health** y **Global Health** como los nuevos prismas desde los que analizar y combatir la resistencia a antibióticos.

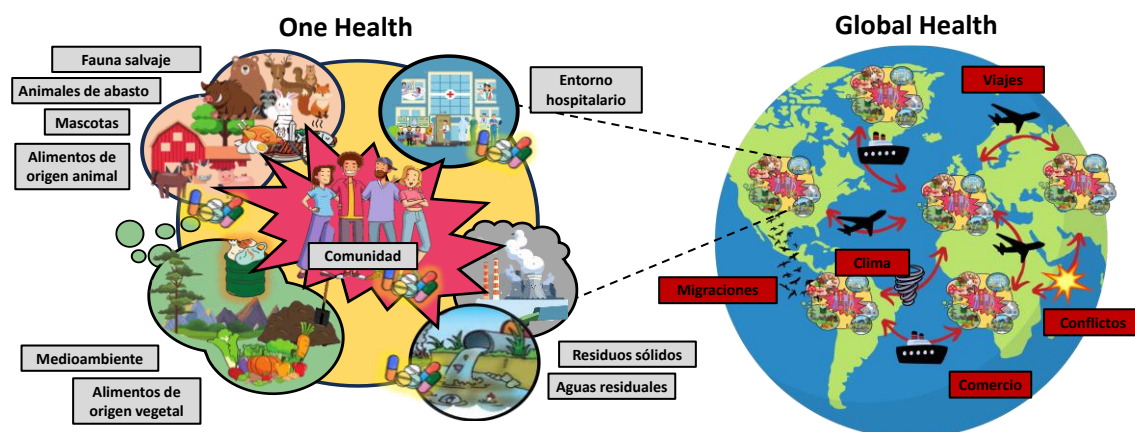


Figura 5: Representación de las conexiones de la resistencias antimicrobiana de origen animal, humano y medioambiental. Editado de Hernando-Amado *et al.*, 2019.

En 2021, el Panel de Expertos de Alto Nivel para Una Salud (OHHLEP) apoyado por la Alianza Cuatripartita de la OMS (Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA), la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA)) planteó que **One Health**, una salud, es: “Un enfoque integrado y unificador que tiene como objetivo equilibrar y optimizar de manera sostenible la salud de las personas, los animales y los ecosistemas. Reconoce que la salud de los seres humanos, los animales domésticos y salvajes, las plantas y el entorno más amplio están estrechamente vinculados y son interdependientes. Este concepto, actualmente, aúna múltiples sectores, disciplinas y comunidades en diferentes niveles de la sociedad con el objetivo de fomentar el

bienestar y abordar las amenazas a la salud y a los ecosistemas, al tiempo que aborda la necesidad colectiva de agua, energía y aire limpios, alimentos seguros y nutritivos” (One Health High-Level Expert Panel, 2022). Así mismo, la problemática de la dispersión mundial de las enfermedades y en particular de las resistencias a los antibióticos ha motivado el término “**Global Health**” que recomienda políticas ideadas para ser integradas a nivel internacional. Bajo estos conceptos se estudian los organismos, los ambientes, la cultura y las características socioeconómicas que faciliten o puedan facilitar su propagación mundial (Hernando-Amado *et al.*, 2019).

El Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) y el CDC crearon las categorías de multirresistente (MDR), extremadamente resistente (XDR) y panresistente (PDR) para clasificar las bacterias en función de su resistencia a los distintos antibióticos (Magiorakos *et al.*, 2012). En el caso concreto de *P. aeruginosa*, las definiciones son las siguientes:

- **MDR:** microorganismo que no presenta sensibilidad a uno o más antibióticos dentro de tres o más categorías antimicrobianas.
- **XDR:** microorganismo que no presenta sensibilidad a uno o más antibióticos en todas, excepto en dos o menos categorías antimicrobianas.
- **PDR:** microorganismo que no presenta sensibilidad a ninguno de los antibióticos empleados.

Las categorías antibióticas utilizadas para esta descripción vienen recogidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Categorías antimicrobianas y antibióticos empleados para definir los microorganismos MDR, XDR y PDR en *P. aeruginosa* (Magiorakos *et al.*, 2012).

CATEGORÍA ANTIMICROBIANA	AGENTE ANTIMICROBIANO
Aminoglucósidos	Gentamicina Tobramicina Amikacina Netilmicina
Carbapenémicos antipseudomónicos	Imipenem Meropenem Doripenem
Cefalosporinas antipseudomónicas	Ceftazidima Cefepima
Fluoroquinolonas antipseudomónicas	Ciprofloxacina Levofloxacina
Penicilinas antipseudomónicas + inhibidores de β -lactamasas	Ticarcilina-ácido clavulánico Piperacilina-tazobactam
Monobactámicos	Aztreonam
Ácidos fosfónicos	Fosfomicina
Polimixinas	Colistina Polimixina B

La Sociedad americana de enfermedades Infecciosas (IDSA) definió la categoría de resistencia difícil de tratar (Difficult-to-treat, DTR) para clasificar a las bacterias no sensibles a los agentes considerados de primera línea en el tratamiento de una infección (Kadri *et al.*, 2018; Tamma *et al.*, 2022). Para *P. aeruginosa* se clasifican como DTR los aislados no sensibles a piperacilina-tazobactam, ceftazidima, cefepima, aztreonam, meropenem, imipenem-cilastatina, ciprofloxacina y levofloxacina.

Según el último informe de la vigilancia de la resistencia a antibióticos del ECDC en 2023 (datos de 2021), la media de aislados de *P. aeruginosa* con resistencia a carbapenémicos es de 18.1% (Figura 6) y con resistencia combinada (resistencia a tres o más grupos de antibióticos, incluidos piperacilina-tazobactam, ceftazidima, carbapenémicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos) en Europa fue del 12,6% (ECDC, 2023). Este valor se mantiene desde 2012 en EU/EEE exceptuando el año 2020, en el que se produjeron cambios en la atención sanitaria y en la comunidad resultantes de la pandemia mundial de COVID-19 (Figura 6) (ECDC, 2023).

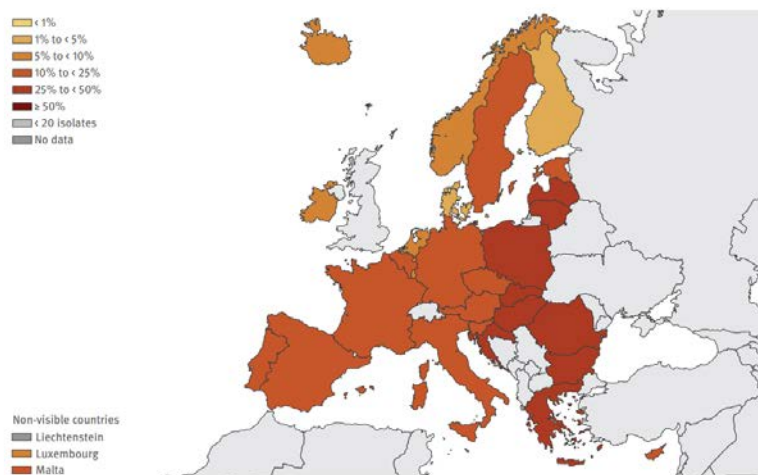


Figura 6: Porcentaje de aislamientos invasivos de *Pseudomonas aeruginosa* con resistencia a carbapenémicos (imipenem/meropenem), por país, UE/EEE, 2021. (Mapa construido por la ECDC el 23 de febrero de 2023).

Analizando la epidemiología de *P. aeruginosa* en España, tenemos dos grandes fuentes: los datos reportados por el ECDC (2023) (datos hasta 2021) y el estudio multicéntrico de Sastre-Femenia *et al.*, 2023 que compara los datos de 2017 con los de 2022. Ambos estudios reportan una disminución en las resistencias a los antimicrobianos en los últimos cinco años. El antibiótico que mostró tasas de resistencia más bajas fue la colistina, seguida de amikacina, imipenem/relebactam, ceftolozano/tazobactam y ceftazidima/avibactam. Por el contrario, las tasas de resistencia más altas se documentaron para ciprofloxacina, seguido de imipenem y piperacilina/tazobactam (Tabla 2).

Tabla 2: Datos publicados por ECDC (2023) y el estudio multicéntrico (Sastre-Femenia *et al.*, 2023).

	ECDC			Sastre-Femenia <i>et al.</i> , 2023	
	2017	2019	2021	2017	2022
TZP	7,4	14,2	14,2	26,5	15
CAZ	9,6	11,1	12,1	20,3	12,7
Carbapenémicos (IMP/MEM)	18,4	21,8	17,2	27,2/14,2	14,5/5,9
Fluoroquinolonas (CIP/LEV)	19,9	18,7	20,3	38,4/-	24,8/-
Aminoglucósidos (GEN/NET/TOB)	12,4	15,0	11,2	-/-/18,1	-/-/6,8

TZP: piperacilina-tazobactam, CAZ: ceftazidima, IMP, imipenem; MEM, meropenem; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina, GEN, gentamicina; NET, netilmicina; TOB, tobramicina.

El estudio multicéntrico más reciente y completo en España (Sastre-Femenia *et al.*, 2023) reveló una disminución en 2022 en la distribución de los perfiles de resistencia de *P. aeruginosa* respecto de los datos de 2017: MDR (27,2% frente a 14,8%), XDR (15,2% frente a 5,9%) y DTR (4,2% frente a 2,1%), sin detectar perfiles PDR en ninguno de los períodos. Asimismo, en 2022 se observó un descenso generalizado en la prevalencia de los perfiles XDR en todas las regiones españolas, salvo en Navarra, Castilla La Mancha y La Rioja que se mantuvo <1% (Figura 7).

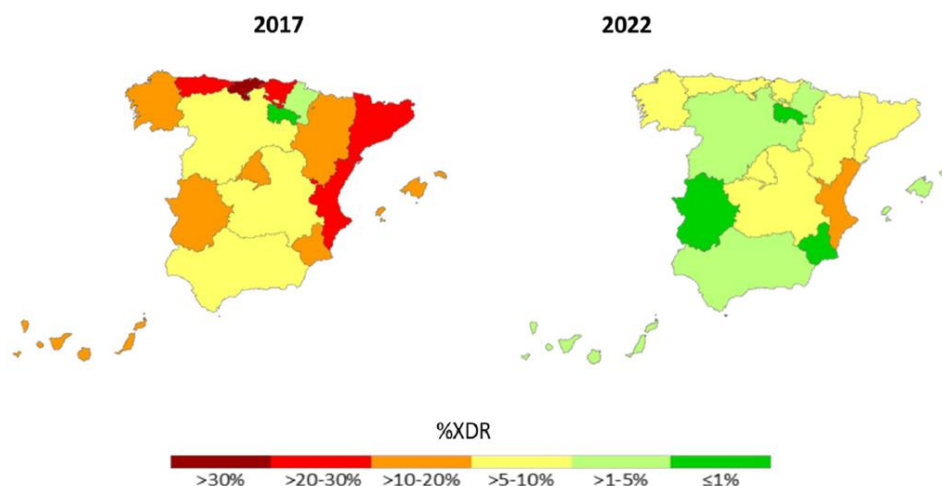


Figura 7: Análisis comparativo de la distribución de perfiles XDR en las diferentes regiones españolas entre los estudios de 2017 y 2022. Sastre-Femenia *et al.*, 2023

2.1 Mecanismos de resistencia antimicrobiana en *P. aeruginosa*

La resistencia a los antibióticos puede estar mediada por diferentes mecanismos, estando involucrados principalmente: la inactivación enzimática del antibiótico, cambios o hiperproducción de la diana de acción del antibiótico, síntesis de una diana alternativa, limitación de la entrada del antibiótico y expulsión activa del antibiótico mediante bombas (Rice & Bonomo, 2011). Además, una sola bacteria puede presentar varios de estos mecanismos, dando lugar a bacterias con un fenotipo de multirresistencia.

Las resistencias a los antimicrobianos se pueden dividir en resistencia intrínseca, resistencia adquirida y resistencia adaptativa. La resistencia intrínseca es la capacidad innata de un microorganismo para resistir a los antimicrobianos a través de características funcionales y/o estructurales propias. El desarrollo de resistencia adquirida es el resultado de la mutación de genes o de la transferencia horizontal de

genes responsables de la resistencia. La resistencia adaptativa suele inducirse en presencia de antibióticos o factores de estrés, es reversible y es derivada de una modificación temporal de la fisiología bacteriana (Laborda *et al.*, 2022; Moradali *et al.*, 2017; Azam & Khan, 2019).

P. aeruginosa se caracteriza por su resistencia intrínseca a un amplio número de antibióticos y su capacidad para adquirir mecanismos de resistencia. La Figura 8 muestra los principales mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa*.

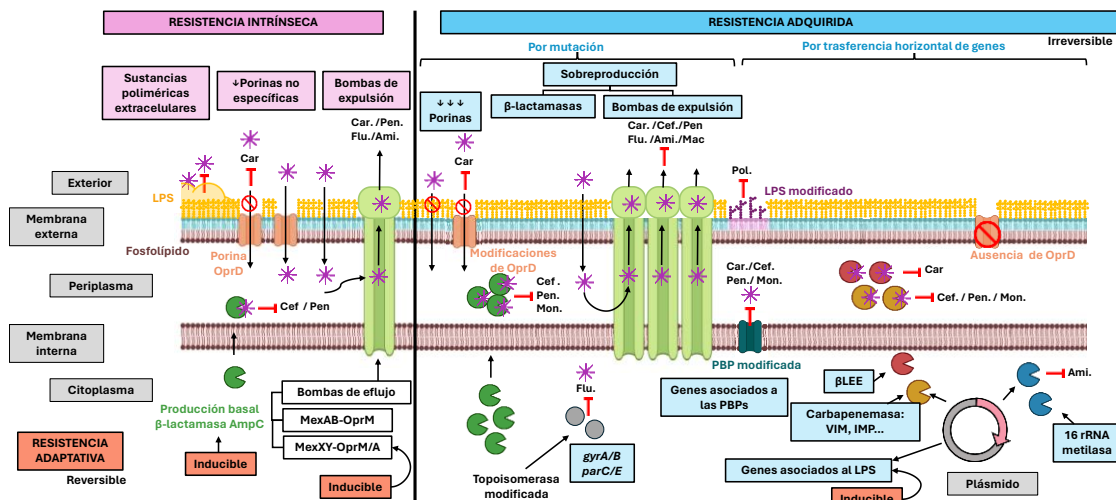


Figura 8: Principales mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa*. Editada de Moradali *et al.*, 2017.

2.1.1 Resistencias intrínsecas

P. aeruginosa es intrínsecamente resistente a múltiples antibióticos, debido principalmente a la baja permeabilidad de su membrana externa, la producción de enzimas inactivantes de antibióticos y la gran cantidad de bombas de expulsión de antimicrobianos que alberga (Figura 9).

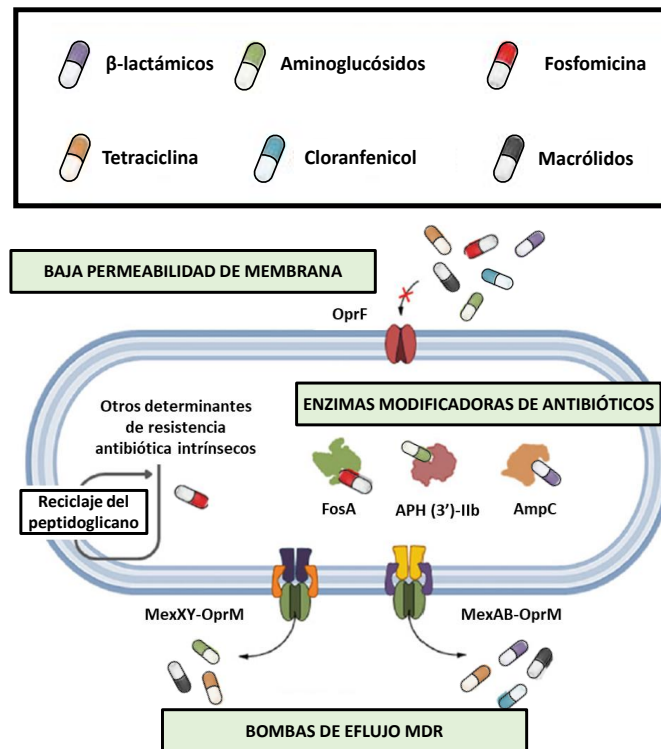


Figura 9: Representación esquemática de los mecanismos intrínsecos de resistencia de *P. aeruginosa*. Modificada de Laborda *et al.*, 2022.

Permeabilidad de la membrana externa

La mayoría de los antibióticos necesitan atravesar la membrana celular para alcanzar el compartimento intracelular y ejercer su función. En la membrana externa de las bacterias se encuentran unos canales proteicos denominados porinas, a través de los cuales las bacterias expulsan y captan sustancias del medio. En concreto, la porina predominante en *P. aeruginosa* es **OprF** responsable de la absorción lenta e inespecífica de iones y sacáridos (Pang *et al.*, 2019). *P. aeruginosa* modifica el número y localización de estas porinas para limitar la penetración y aumentar la resistencia a los antibióticos. De esta forma, carbapenémicos y cefalosporinas verían limitada su entrada (Qin *et al.*, 2022).

Además, las alteraciones del lipopolisacárido (LPS) generan una menor carga negativa de la membrana, lo que conlleva a una disminución de las interacciones electrostáticas con antibióticos cargados positivamente, previniéndolos de unirse al LPS.

Sistemas de expulsión

Los sistemas de expulsión son un conjunto de proteínas transportadoras que permiten la expulsión de sustancias tóxicas para la bacteria, tales como antibióticos, compuestos tóxicos, etc. Las bombas de expulsión de la familia resistencia-nodulación-división (*resistance-nodulation-division*, RND) son las que contribuyen más significativamente a la resistencia antimicrobiana de *P. aeruginosa* y están formados por tres componentes: un transportador situado en membrana interna, una proteína de fusión de membrana y una proteína de membrana externa o porina (Lorusso *et al.*, 2022). Entre los 12 miembros de bombas RND que se han adscrito a *P. aeruginosa*, MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprN son los más importantes. Se ha descrito que las dos primeras contribuyen a la resistencia intrínseca; aunque cada sistema es capaz de expulsar un amplio rango de agentes antimicrobianos y todos ellos pueden sobreexpresarse debido a mutaciones adquiridas en los genes represores (Lorusso *et al.*, 2022; Laborda *et al.*, 2022) (Tabla 3).

Tabla 3: Bombas de expulsión de antimicrobianos de *P. aeruginosa* (Lorusso *et al.*, 2022).

Bomba	Reguladores	Sustratos	Resistencia
MexAB-OprM	MexR, NalD, NalC, Mdr1, Mdr2, CpxR y QS*	β -lactámicos (excepto imipenem) e inhibidores de β -lactamasas, fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclinas y cloranfenicol	Intrínseca, adquirida y adaptativa
MexCD-OprJ	NfxB y EsrC	Penicilina, cefepima, cefpirome, meropenem, quinolonas, macrólidos, tetraciclinas y cloranfenicol	Adquirida y adaptativa
MexEF-OprN	MexT y MexS	Carbapenemasas, quinolonas y cloranfenicol	Adquirida y adaptativa
MexXY-OprM	MexZ, ParRS y ArmZ	β -lactámicos, cefepima, carbapenémicos, meropenem, fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclinas y cloranfenicol	Intrínseca, adquirida y adaptativa

*QS: *quorum sensing*

MexAB-OprM

Esta bomba se expresa constitutivamente en *P. aeruginosa* y confiere resistencia basal a una amplia gama de antibióticos como fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclinas, cloranfenicol, novobiocina, β -lactámicos (excepto imipenem) e inhibidores de β -lactamasas. Los genes *mexR*, *nalC* y *nalD* controlan principalmente su expresión, que también se encuentra regulada por *quorum sensing*, pues a medida que aumenta la

densidad poblacional aumenta la expresión de dicha bomba, hasta llegar a su máximo en la fase exponencial (Maseda *et al.*, 2004). La sobreexpresión de esta bomba de expulsión se asocia con la resistencia a la mayoría de los antibióticos antipseudomónicos, excepto colistina.

MexXY-OprM

Su expresión es inducible por antimicrobianos y está controlada principalmente por los represores MexZ, el sistema regulador de dos componentes ParRS y el antirrepresor inducible por aminoglucósidos ArmZ. Utiliza como sustratos las fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos, quinolonas, aminoglucósidos, cloranfenicol y β -lactámicos como penicilinas (excepto carbenicilina y sulbenicilina), cefalosporinas (excepto ceftazidima y cefsulodina) y carbapenémicos (Hocquet *et al.*, 2003; Masuda *et al.*, 2000).

MexCD-OprJ

Esta bomba de expulsión se expresa en un nivel bajo en *P. aeruginosa*, sin embargo, se asocia con resistencia a varias clases de antibióticos cuando se sobreexpresa. Su expresión está regulada principalmente por el represor *nfxB* cuyas mutaciones se han asociado con incrementada expresión de la bomba MexCD-OprJ, lo que provoca cepas resistentes a fluoroquinolonas, cloranfenicol, tetraciclina y cefalosporinas de segunda generación. Además, mutaciones en *mexD* pueden cambiar la especificidad del sustrato de esta bomba de expulsión, lo cual se ha asociado con la resistencia a la carbenicilina, ceftolozano-tazobactam y ceftazidima-avibactam (Lorusso *et al.*, 2022). Tiene la capacidad de expulsar al medio extracelular, tetraciclinas, fluoroquinolonas, macrólidos, cloranfenicol, novobiocina, trimetoprim y ciertos β -lactámicos, como penicilinas (a excepción de carbenicilina y sulbenicilina), cefalosporinas de cuarta generación y meropenem.

MexEF-OprN

Este sistema generalmente está inactivo o con una expresión basal muy reducida en condiciones normales, pero su hiperexpresión se asocia con resistencia a fluoroquinolonas, trimetoprim y cloranfenicol. La bomba está regulada por *mexS* y *mexT* que se encuentra comúnmente con mutaciones inactivadoras en cepas de *P. aeruginosa* de tipo salvaje, y la sobreexpresión de MexEF-OprN surge de la reversión de estas

mutaciones (Lorusso *et al.*, 2022). Por otro lado, mutaciones en el regulador *nfxC* causan la sobreexpresión de la bomba MexEF-OprN y también menor sensibilidad a los carbapenémicos, relacionada a la reducción de la expresión del gen *oprD* (Köhler *et al.*, 1997).

Enzimas modificadoras de antibióticos

P. aeruginosa presenta de forma intrínseca la β -lactamasa AmpC o PDC (*Pseudomonas*-derived cephalosporinase). AmpC es una cefalosporinasa codificada en el genoma de *P. aeruginosa*, producida constitutivamente a bajos niveles basales y que le confiere resistencia a aminopenicilinas (Lister *et al.*, 2009). Sin embargo, también puede ser inducible debido a la exposición a una serie de antibióticos β -lactámicos (por ejemplo, bencilpenicilina y cefalosporinas) y, por tanto, contribuir a la resistencia intrínseca a estos antibióticos (Poole, 2011). Se caracterizan por ser activas frente penicilinas y cefalosporinas, pudiendo hidrolizar cefamicinas (cefexitina y cefotetan), oximinocefaloporias (ceftazidima, cefotaxima y ceftriaxona) y monobactámicos (aztreonam) pero no frente a cefalosporinas de cuarta generación (cefepima, cefpiroma) y carbapenémicos. Estas enzimas se caracterizan por ser resistentes a la combinación de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas, con la posible excepción de piperacilina/tazobactam y las nuevas combinaciones ceftolozano/tazobactam y ceftazidima/avibactam (Basseti *et al.*, 2018; Laborda *et al.*, 2022).

Otra enzima modificadora que se expresa de manera intrínseca en *P. aeruginosa* es la aminoglucósido fosfotransferasa codificada por el gen cromosómico *aph(3')-IIb*, que confiere a *P. aeruginosa* resistencia a varios antibióticos aminoglucósidos importantes como kanamicina y neomicina B y C (Zeng & Jin, 2003).

También es de destacar la metaloglutatión transferasa FosA ya que cataliza la conjugación del glutatión con el carbono 1 de la fosfomicina, volviéndola ineficaz como antimicrobiano (Beharry & Palzkill, 2005).

2.1.2 Resistencias adquiridas

P. aeruginosa puede adquirir resistencia a los antibióticos a través de la selección de mutaciones en genes cromosómicos o la adquisición de genes de resistencia mediante transferencia horizontal (Figura 10).

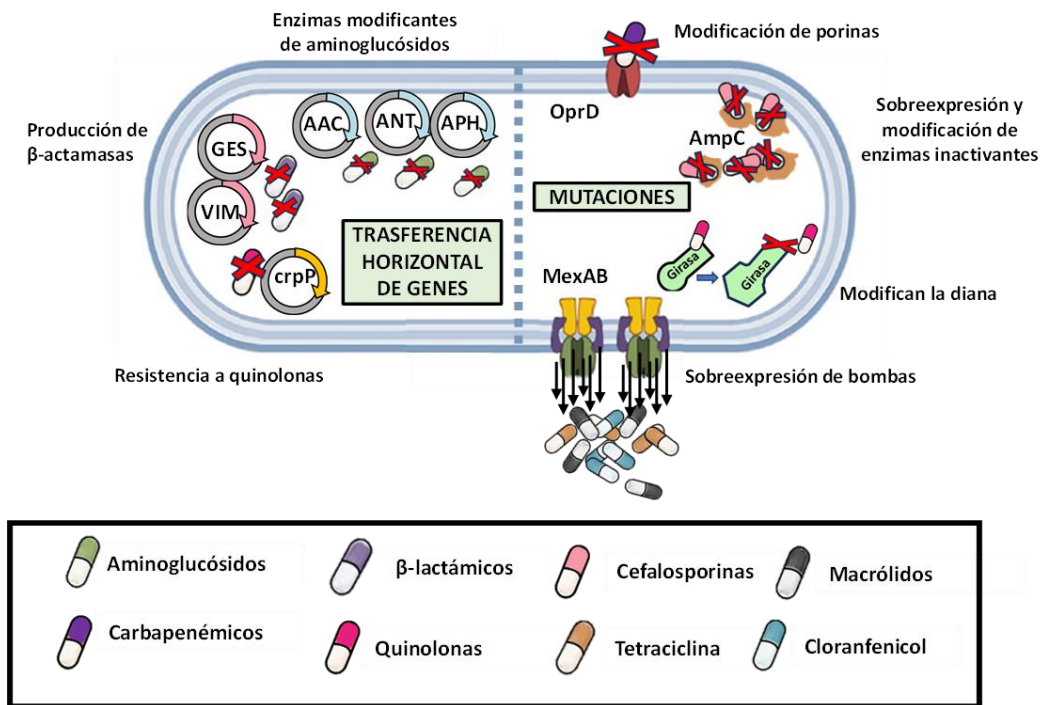


Figura 10: Principales determinantes de resistencia adquirida en *P. aeruginosa*. Ejemplos más representativos de las enzimas modificadoras de aminoglucósidos: Acetiltransferasas (AAC), nucleotidiltransferasas (ANT) y fosfotransferasas (APH). β-lactamasas más representativas: Carbapenemasas (GES) y metalo-β-lactamasas (VIM).

Mutaciones en genes cromosómicos

Las bacterias pueden adquirir resistencia a los antibióticos a través de mutaciones que conducen a una reducción en la absorción del antibiótico, alteración de la diana de acción del antibiótico o sobreexpresión o modificación del rango de sustrato de enzimas inactivantes de antibióticos o bombas de expulsión activas (Qin *et al.*, 2022).

Mutaciones en la porina OprD

OprD es una porina específica de sustrato que facilita la difusión de aminoácidos básicos, algunos péptidos pequeños y antibióticos carbapenémicos dentro de la bacteria. La pérdida o alteración de esta porina produce resistencia a imipenem y

sensibilidad reducida a meropenem, ya que la afinidad y la capacidad de difusión de imipenem a través de esta porina es casi 70 veces más alta que la de meropenem (Cabot *et al.*, 2011).

Las causas más frecuentes de inactivación mutacional del gen *oprD* son la presencia de inserciones/deleciones que cambian la pauta de lectura, las mutaciones puntuales que conllevan la formación de un codón de finalización prematuro o la presencia de secuencias de inserción truncando el gen *oprD* (Rojo-Bezares *et al.*, 2014; Gutiérrez *et al.*, 2007; Estepa *et al.*, 2017; Halat & Moubareck, 2022).

Mutaciones en los genes codificantes de topoisomerasas

Mutaciones en los genes *gyrA/gyrB* codificantes de la DNA girasa (topoisomerasa II) y *parC/parE* de la topoisomerasa IV, disminuyen la afinidad de estas enzimas por el antibiótico, conduciendo a una menor susceptibilidad de *P. aeruginosa* a las quinolonas (Pang *et al.*, 2019). Principalmente las mutaciones en las Regiones Determinantes de la Resistencia a las Quinolonas (QRDR) de los genes *gyrA* y *parC* se detectan en aislados altamente resistentes, mientras que mutaciones en *gyrB* y *parE* son menos frecuentes (Rehman *et al.*, 2021).

Mutaciones en el sistema de regulación AmpC

Las mutaciones implicadas en el sistema de regulación de AmpC; es decir, los genes *ampR*, *ampD* y *dacB*, constituyen el mecanismo más importante de resistencia a β -lactámicos en *P. aeruginosa*. Estos cambios pueden desencadenar la hiperexpresión de esta enzima de forma irreversible y sin necesidad de la presencia de un inductor, reduciendo la sensibilidad a cefalosporinas de amplio espectro como ceftazidima y penicilinas como la ticarcilina (Moya *et al.*, 2009; Lister *et al.*, 2009).

Además, existen variantes de AmpC capaces de ampliar su espectro de sustrato, volviéndose incluso capaces de hidrolizar carbapenémicos o recientes combinaciones de β -lactámico/inhibidor de β -lactamasa (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009; Fraile-Ribot *et al.*, 2020).

Mutaciones que conducen a la hiperexpresión de bombas de expulsión activa

Como se ha señalado anteriormente, alteraciones en los reguladores de las bombas de expulsión activa pueden desencadenar una sobreexpresión de estos elementos y otorgar así un fenotipo MDR en *P. aeruginosa*.

De manera resumida, mutaciones en los genes de reguladores transcripcionales *mexR*, *nalB*, *nalC* o *nalD* inducen la hiperexpresión de **MexAB-OprM**, elevando la resistencia de *P. aeruginosa* a una variedad de agentes antimicrobianos, incluyendo β -lactámicos, fluoroquinolonas, tetraciclina, macrólidos, cloranfenicol, novobiocina, trimetoprim y sulfonamidas.

Por otro lado, mutaciones en el gen *mexZ* resultan en la sobreexpresión de **MexXY-OprM**, generando la consecuente resistencia aumentada a aminoglucósidos, β -lactámicos y fluoroquinolonas. La inactivación de *nfxB* provoca un aumento en la expresión de **MexCD-OprJ**, generando sensibilidad reducida a macrólidos, meropenem, fluoroquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol, novobiocina, trimetoprim, triclosán, y cefalosporinas de cuarta generación, mientras que mutantes en *mexL* muestran hiperexpresión de **MexJK-OprM**, que confiere resistencia a tetraciclina y eritromicina.

Mutaciones en *mexT*, *mexS* y *nfxC* que causan la sobreexpresión de **MexEF-OprN** aumentan la resistencia a fluoroquinolonas, cloranfenicol, trimetoprim, triclosán e imipenem, pero también resultan en hipersensibilidad a β -lactámicos y aminoglucósidos. Además, se ha observado que los mutantes que hiperexpresan esta bomba muestran también una disminución de la porina OprD, lo que explicaría la pérdida de sensibilidad de estas cepas al imipenem (Lorusso *et al.*, 2022).

Trasferencia horizontal de genes

Por otro lado, la resistencia adquirida en *P. aeruginosa* también se produce a través de la transferencia horizontal de genes de resistencia, como los que codifican β -lactamasas y enzimas inactivadoras de aminoglucósidos, a través de elementos genéticos móviles/movilizables (Pang *et al.*, 2019).

β -lactamasas adquiridas

Las β -lactamasas son enzimas capaces de degradar el enlace amida del anillo β -lactámico de los antibióticos, haciendo que éste pierda su efectividad frente a los

microorganismos. Existen dos esquemas para clasificar las β -lactamasas: la clasificación molecular que usa la homología de la secuencia de aminoácidos (Ambler, 1980) y la clasificación funcional que está basada en los perfiles de hidrólisis del sustrato y de inhibición (Bush & Jacoby, 2010).

Entre las β -lactamasas descritas en *P. aeruginosa*, las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y las carbapenemasas destacan por su alta prevalencia e impacto clínico. Las BLEE descritas en *P. aeruginosa* se pueden clasificar en las clases A (PER, CTX-M, TEM, SHV, GES, VEB y BEL) (Weldhagen *et al.*, 2003) y D (OXA) (Poole, 2011). Las más prevalentes en *P. aeruginosa* son las *Guiana Extended-Spectrum* (GES), de las que se han descrito más de 50 variantes, algunas de ellas con actividad carbapenemasa (GES-2, -4, -5, -6, -14, -18 y -24) (Naas *et al.*, 2017).

Las carbapenemasas alteran significativamente la eficacia de los agentes antimicrobianos comúnmente utilizados, incluidos ceftazidima, cefepima, piperacilina-tazobactam, así como las combinaciones recientemente introducidas de β -lactámico/inhibidor de β -lactamasa, como ceftolozano-tazobactam, imipenem-relebactam y ceftazidima-avibactam (Tenover *et al.*, 2022). Las metalo- β -lactamasas, o carbapenemasas de clase B son las carbapenemasas más prevalentes en *P. aeruginosa*, destacando las *Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase* (VIM) y las imipenemasas (IMP) como las más extendidas y habitualmente detectadas, relacionándose con brotes causados por *P. aeruginosa*.

Existe una amplia variedad de carbapenemasas en los aislados de *P. aeruginosa* a nivel mundial, como se puede ver en la Figura 11. GES y VIM son las más prevalentes en España y, generalmente, asociadas a clones de alto riesgo concretos.



Figura 11: Distribución de carbapenemasas de *P. aeruginosa* a nivel mundial. Las áreas coloreadas corresponden con las regiones en las que predomina cada grupo de carbapenemasa. (a): KPC, (b): GES, (c): IMP, (d): VIM y (e): NDM. (Halat & Moubareck, 2022).

Enzimas modificadoras de aminoglucósidos

Según la modificación que causan en los aminoglucósidos estas enzimas pueden ser fosforiltransferasas (APH), acetiltransferasas (AAC) o nucleotidiltransferasas (ANT).

Las enzimas modificadoras de aminoglucósidos más frecuentes en *P. aeruginosa* son AAC(6')-II y ANT(2'')-I; y con menor frecuencia presenta AAC(3)-II y APH(3')-I. Su distribución es ampliamente variable en función del área geográfica y de los patrones de administración de aminoglucósidos (Cabrera, 2022). En general, los genes que codifican para estas enzimas se encuentran en integrones junto con otros genes de resistencia (Poole, 2005).

3. Factores de virulencia

La patogenicidad es la capacidad que posee una bacteria para causar infección en un huésped y los factores de virulencia contribuyen a esta capacidad, permitiendo a las bacterias replicarse y diseminarse dentro del huésped, en parte alterando o eludiendo el sistema inmune del mismo.

P. aeruginosa posee un amplio repertorio de factores de virulencia que contribuyen a su patogénesis. Estos factores pueden estar asociados a la célula bacteriana, como flagelos, pili y LPS o ser secretados por la bacteria, como enzimas, toxinas o pigmentos (Figura 12) (Jurado-Martín *et al.*, 2021).

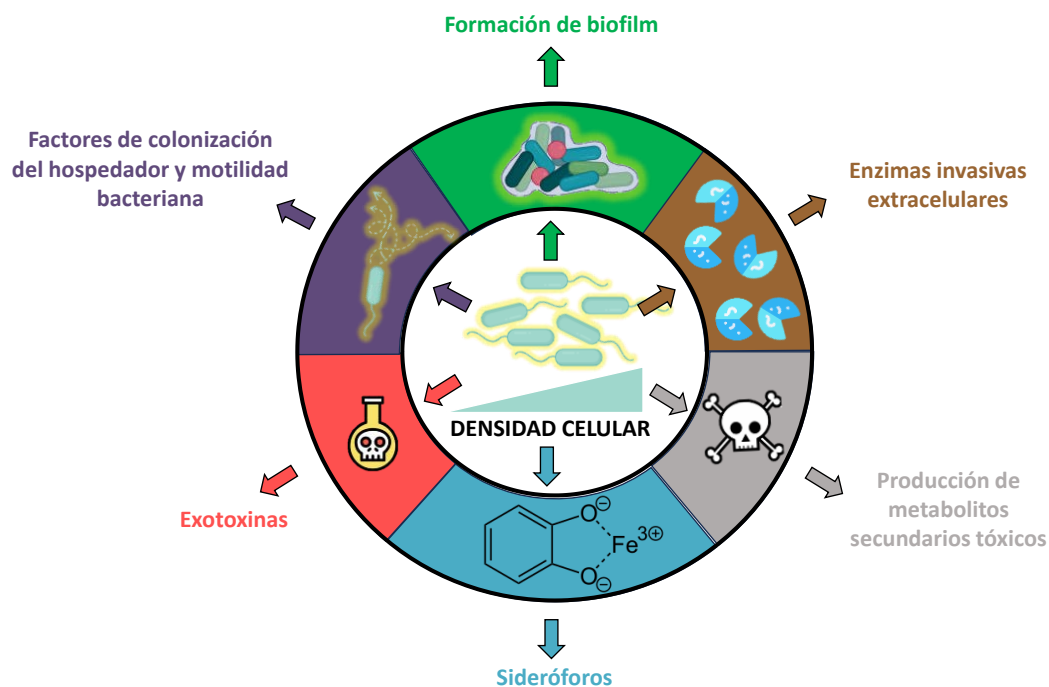


Figura 12: Características principales de la virulencia de *P. aeruginosa*. Editado Chadha *et al.*, 2022.

La regulación de la producción de unos u otros está controlada por diversos sistemas de señalización complejos e interconectados entre sí que le dan a este patógeno una gran plasticidad. Entre ellos, el sistema de señalización por *quorum sensing* (QS) juega un papel neurálgico (Jurado-Martín *et al.*, 2021; Sanz-García *et al.*, 2021). En la Figura 13 se muestran los principales factores de virulencia utilizados por *P. aeruginosa* durante el proceso de infección.

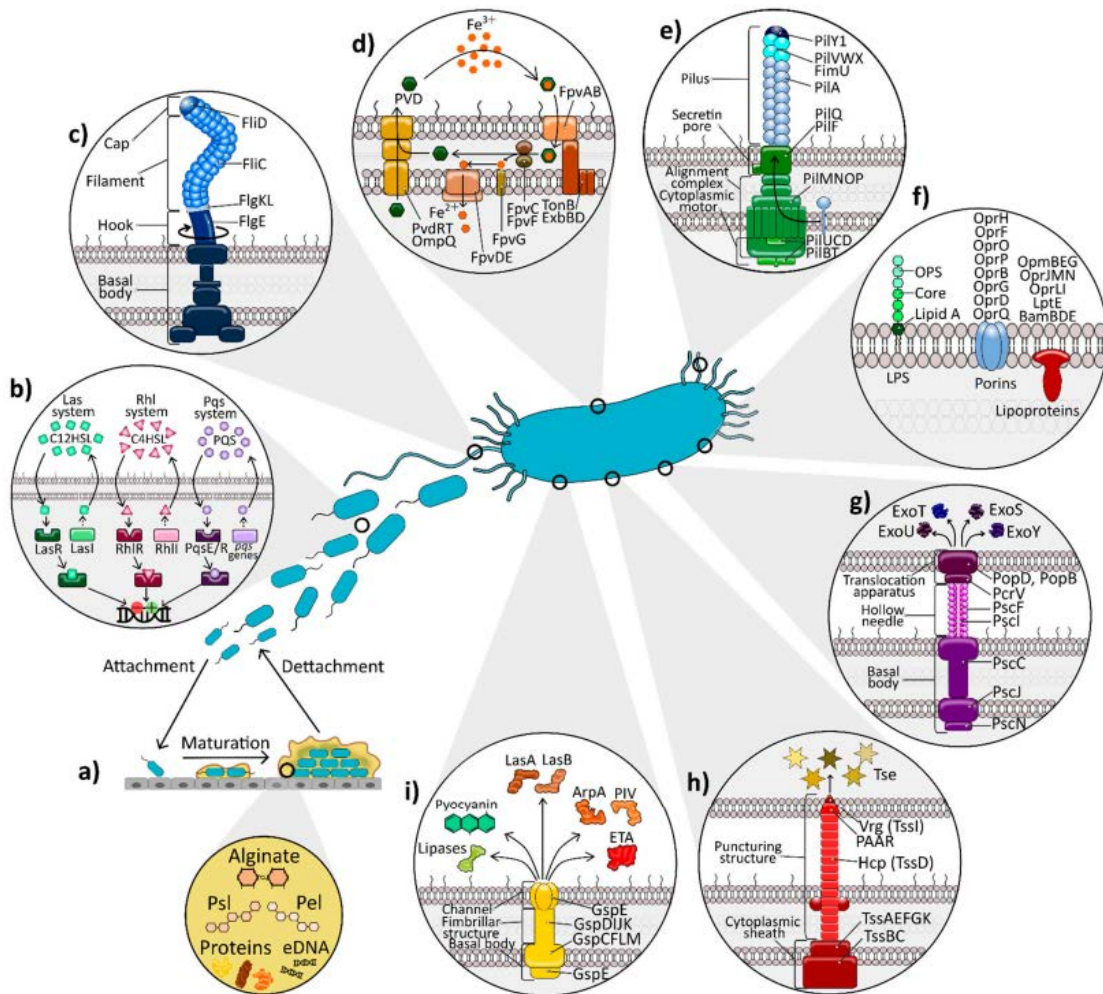


Figura 13: Representación gráfica de los principales factores de virulencia utilizados por *P. aeruginosa* durante el proceso de infección: (a) capacidad de formación de biofilm y composición de la matriz extracelular de éste; (b) los tres sistemas principales de quórum sensing (QS) (c) flagelinas FliC y FliD incorporadas dentro de la estructura flagelar; (d) sideróforo de pioverdina (PVD) como sistema de captación de hierro; (e) pili tipo 4 (T4P); (f) lipopolisacárido (LPS) y proteínas de membrana externa (OMP); (g) el sistema de secreción de tipo III (T3SS) y sus cuatro efectores principales; (h) el sistema de secreción tipo VI (T6SS); (i) el sistema de secreción tipo II (T2SS) y los compuestos que libera al medio extracelular: enzimas líticas (lipasas, proteasas (AprA y PIV) y elastasas (LasA y LasB)), exotoxina A (ETA) y piocianina. (Jurado-Martín *et al.*, 2021).

3.1 Quorum sensing: sistema de comunicación celular

El *quorum sensing* (QS) es un mecanismo basado en la comunicación intercelular bacteriana dependiente de la densidad celular y 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 (Thi *et al.*, 2020). Entre otros, regula la producción de proteasas extracelulares, quelantes de hierro, formación de biofilms, motilidad y además interviene en la expresión de las bombas de expulsión y en la respuesta a las señales del sistema inmune del huésped. Además, la evolución de una infección aguda a crónica también está influenciada por la expresión génica dependiente de QS.

El proceso de QS está basado en la producción de unas moléculas de señalización, denominadas autoinductores. La bacteria secreta estos autoinductores que, cuando sobrepasan un umbral de concentración, penetran en la célula para generar una respuesta coordinada (Moradali *et al.*, 2017, Stevens *et al.*, 2012).

En *P. aeruginosa* existen cuatro tipos de mecanismos de QS que, constituyen una red jerárquica de señales interrelacionadas: Las, Rhl, Pqs e IQS. Las y Rhl son sistemas de señalización de N-acil homoserina lactona que conjuntamente afectan al 10% del transcriptoma de *P. aeruginosa* (Schuster & Greenberg, 2007).

El sistema Las está en la cima de la jerarquía de señalización, controlando positivamente la expresión de los otros tres sistemas. De manera similar, el sistema Las tiene un efecto estimulante sobre Pqs y éste sobre Rhl, mientras que Rhl regula negativamente al sistema Pqs (Figura 14). Los sistemas Las y Rhl se desencadenan por un aumento en la densidad celular en la fase preliminar del crecimiento exponencial, mientras que los sistemas Pqs e IQS se activan en la última fase de crecimiento exponencial, especialmente en condiciones de limitación de hierro y de privación de fosfato (Cornelis, 2020).

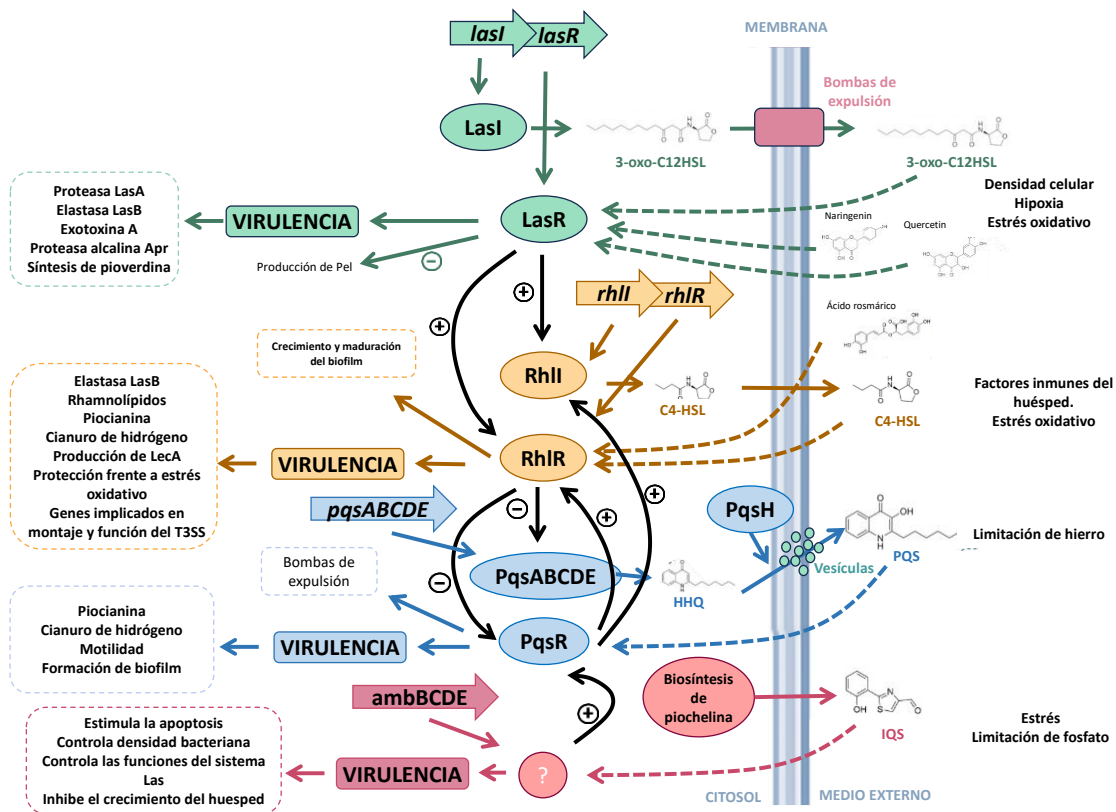


Figura 14: Red jerárquica de quorum sensing (QS) en *P. aeruginosa*. Las cuatro vías de QS se activan en respuesta a la densidad celular y los estímulos ambientales, con cuatro sintasas de autoinductores que incluyen LasI, RhII, PqsABCDE y AmbBCDE que producen N-3-oxododecanoil-L-homoserina lactona (3O-C12-HSL), N- butiril-L-homoserina lactona (C4-HSL), 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) y 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído (IQS), respectivamente. La autoinducción se representa con flechas punteadas; las flechas negras indican regulación de la expresión de dichas proteínas o sistemas (+) positiva o (-) negativa. Aún se desconoce el receptor del IQS. Elaboración propia a partir de Thi *et al.*, 2020 y Li *et al.*, 2022.

3.1.1 Sistema Las

La proteína LasR es un importante activador transcripcional del sistema QS de *P. aeruginosa*, capaz de activar la transcripción del resto de sistemas y juega un papel fundamental en la activación de muchos genes de virulencia (Kiratisin *et al.*, 2002).

Cuando la concentración de la señal alcanza un umbral, la molécula de señalización N-(3-oxododecanoil)-homoserina lactona (3-oxo-C12-HSL), sintetizada por LasI, entra al interior de la bacteria y se une a la proteína receptora LasR para formar un complejo que inicia la expresión de genes diana. Este sistema de señalización se encuentra implicado en la transcripción de genes de virulencia involucrados en infecciones agudas y daño a las células del huésped como la síntesis de ploverdina, la exotoxina A, la proteasa LasA, la elastasa LasB o la proteasa alcalina; así como la de la propia sintasa del autoinductor, LasI (Whiteley *et al.*, 1999). También actúa sobre el

sistema Rhl y participa activamente en la maduración del biofilm (Li *et al.*, 2022) (Figura 14). Este sistema Las también suprime la producción del exopolisacárido Pel (Jurado-Martín *et al.*, 2021).

3.1.2 Sistema Rhl

La molécula de señalización N-butilil homoserin lactona (C4-HSL), producida por RhII, se une a su receptor y activa el regulador transcripcional RhIR. Este circuito Rhl está relacionado con la producción de algunos factores de virulencia como la elastasa LasB, los ramnolípidos, la piocianina y los factores tóxicos como el cianuro de hidrógeno. Este sistema desempeña un papel vital en la protección de las células del estrés oxidativo, regula la producción de lectina LecA, y participa en el crecimiento y maduración del biofilm. Además, reprime genes implicados en el montaje y función del sistema de secreción tipo III (Jurado-Martín *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022) (Figura 14).

3.1.3 Sistema Pqs

El sistema Pqs está estrechamente relacionado con los dos sistemas anteriormente descritos (Las y Rhl). En este caso la molécula de señal es 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona conocida como “señal quinolona de *Pseudomonas*” (*Pseudomonas quinolone signal, pqs*) y su precursor es 2-heptil-4-hidroxiquinolina (HHQ) que pasa a ser Pqs por la acción de PqsH, cuya transcripción a su vez está regulada por LasR. La biosíntesis de estas dos moléculas señal requiere un regulador transcripcional, PqsR (MvfR) y un operón *pqsABCDE*, cuya expresión está controlada por el primero. PqsR desempeña un papel clave en Pqs y regula la expresión de *rhlI*, así como algunas funciones de virulencia como la secreción de cianuro de hidrógeno, de piocianina, la motilidad bacteriana y la formación de un biofilm estable y maduro, ya que está involucrado en la liberación de DNA extracelular (ADNe) (Li *et al.*, 2022) (Figura 14). Este sistema, también regula positivamente la expresión de genes relacionados con la falta de hierro y bombas involucradas en la resistencia a los antibióticos (Jurado-Martín *et al.*, 2021).

3.1.4 Sistema IQS

El sistema Integrated QS System (IQS) utiliza la molécula 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído como señal de un receptor que no se conoce aún. La regulación de IQS depende de la densidad bacteriana y otros factores como el estrés por limitación de fosfato. Este sistema puede controlar las funciones del sistema Las y, al interrumpirse, disminuyen la producción de pirocianina, ramnolípidos y elastasas. Finalmente, IQS inhibe crecimiento de la célula huésped y estimula la apoptosis de una manera dependiente de dosis, alterando la reparación de daños en el DNA del huésped (Jurado-Martín *et al.*, 2021, Cornelis, 2020) (Figura 14).

3.2 Biofilm

El biofilm son comunidades de microorganismos adheridos a una superficie biótica o abiótica rodeada por una matriz de exopolisacárido, DNA y proteínas, y cuya función se basa en garantizar la protección de los microorganismos frente a las agresiones del ambiente. El desarrollo de estos biofilms es un proceso dinámico y está controlado por el sistema QS, de manera que su formación depende de la densidad celular, de la síntesis y secreción de compuestos extracelulares y de la disponibilidad de nutrientes en el medio (Thi *et al.*, 2020). Comparadas con las bacterias planctónicas, las bacterias en forma biofilm son comunidades biológicas altamente organizadas, estructuradas, coordinadas y funcionales lo que les permite exhibir fenotipos distintos con respecto a la tasa de crecimiento y la transcripción de genes, tales como una resistencia aumentada a antimicrobianos (hasta 1000 veces más que en condiciones planctónicas), a la luz ultravioleta o a biocidas. También se produce un aumento en el intercambio génico, mayor producción de metabolitos secundarios, así como resistencia a cambios en el pH, choque osmótico o desecación. Esto hace que supongan un grave problema, debido a su difícil erradicación, tanto en entornos industriales, como ambientales o clínicos.

P. aeruginosa es una bacteria ampliamente conocida por su capacidad para formar biofilm. De hecho, la producción de biofilm en *P. aeruginosa* es un arma fundamental para que esta bacteria sea capaz de competir, sobrevivir y dominar en el

entorno pulmonar de pacientes con fibrosis quística. Pero *P. aeruginosa*, también coloniza eficazmente una variedad de superficies, incluidos materiales médicos (catéteres urinarios, implantes, lentes de contacto, etc.), y equipos de la industria alimentaria (tanques de mezcla, cubas y tubos).

Como se muestra en la Figura 15, la formación de biofilm clásicamente involucra las siguientes etapas: unión a la superficie, formación de microcolonias, maduración del biofilm y dispersión o desprendimiento (Yin *et al.*, 2022).

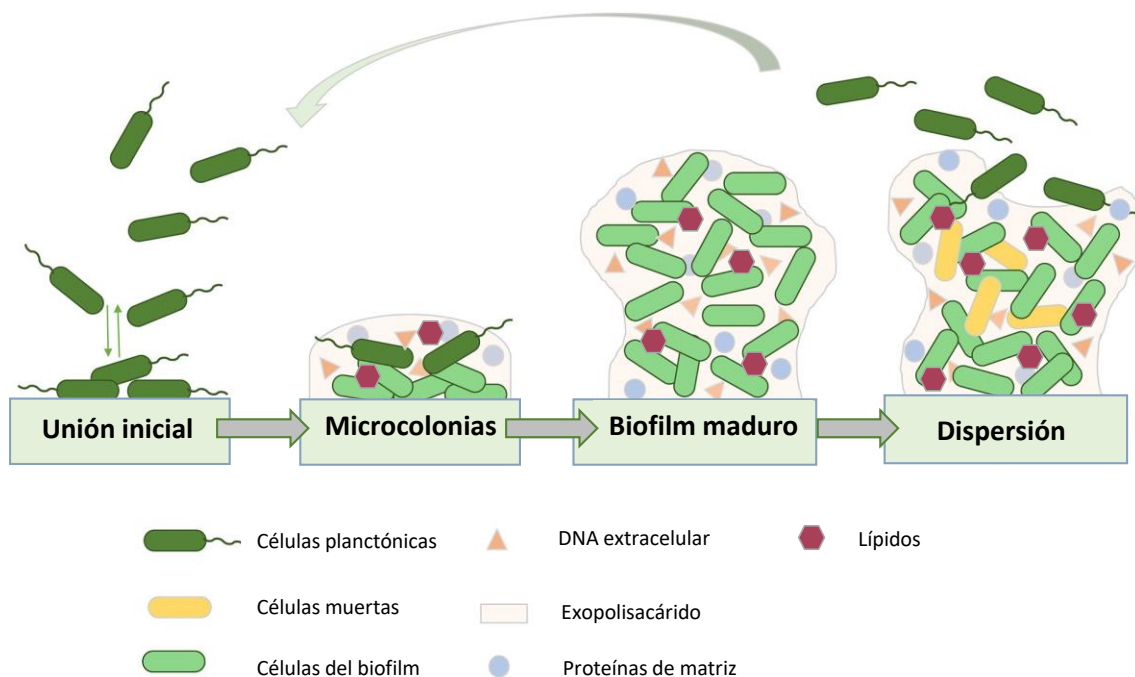


Figura 15: Proceso de formación del biofilm de *P. aeruginosa*. Editado de Yin *et al.*, 2022.

3.2.1 Composición del biofilm

La matriz dependerá del entorno en el que se haya desarrollado el biofilm, pudiendo encontrar cristales minerales, partículas de corrosión, partículas de arcilla o componentes sanguíneos (Donlan, 2002). Aunque en *P. aeruginosa* se ha demostrado que esta matriz contiene principalmente exopolisacáridos (EPS), DNAe, proteínas y lípidos (Thi *et al.*, 2020). Más del 90% de la biomasa del biofilm está compuesta por la matriz, la cual actúa como soporte y proporciona microambientes químicos complejos y mecánicamente estables que son fundamentales para el estilo de vida del biofilm.

Además de ofrecer estabilidad estructural y un entorno funcional, proporciona un repertorio de bienes públicos que incluyen nutrientes esenciales, enzimas y proteínas citosólicas para la comunidad (Karygianni *et al.*, 2020).

Los tres exopolisacáridos que están involucrados mayoritariamente en la arquitectura del biofilm son el alginato y los polisacáridos Pel y Psl.

El **polisacárido Psl** es un exopolisacárido neutro y un elemento clave en las primeras etapas de formación, pues es necesario para la adhesión de las bacterias a la superficie. Además, actúa como molécula de señal, promoviendo la producción de c-di-GMP, que en alta concentración produce biofilms más gruesos y robustos. Psl también sirve de protección a las bacterias del biofilm frente a los antimicrobianos y la fagocitosis, lo que lo convierte en un sistema de defensa para lograr una infección persistente (Zhao *et al.*, 2013; Thi *et al.*, 2020).

El **polisacárido** catiónico **Pel** es importante durante la primera etapa y en el mantenimiento de la interacción entre bacterias. Además, es un componente estructural importante, siendo el responsable del biofilm que se forma en la interfaz aire-líquido y compensa la ausencia de Psl en la periferia del biofilm durante la etapa de madurez (Jennings *et al.*, 2015; Thi *et al.*, 2020).

El **alginato** se produce predominantemente en cepas mucoides que se encuentran principalmente en aislados de infecciones crónicas. Este componente es muy importante durante la etapa de maduración, ya que proporciona estructura y protección celular frente a radicales libres y/o antibióticos. El alginato influye en la arquitectura, la densidad celular, la interacción entre células y la formación de agregados (Tielen *et al.*, 2005; Moradali *et al.*, 2015; Thi *et al.*, 2020).

Cada exopolisacárido de *P. aeruginosa* está codificado en distintas regiones del genoma de *P. aeruginosa* (Figura 16). El alginato está codificado en un operón de 12 genes (PA3540–PA3551 en el genoma PAO1), Psl en un operón también de 12 genes (PA2231–PA2242) y Pel está en un operón de siete genes (PA3058–PA3064) (Yin *et al.*, 2022).

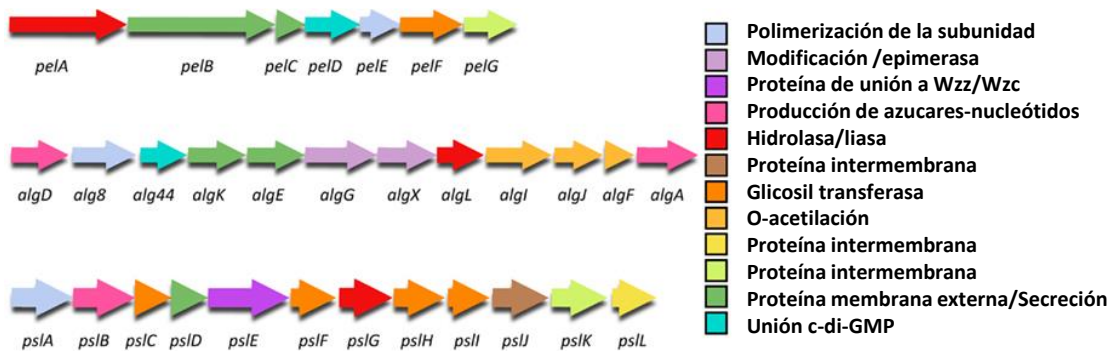


Figura 16: Estructura genética de los operones *pel*, *alg* y *psl*. Los genes están codificados por colores según su función. (Yin *et al.*, 2022)

El DNAe, liberado debido al proceso de lisis celular, también es un componente estructural esencial, involucrado en múltiples procesos como fuente de nutrientes, quelante de cationes, proceso inflamatorio y resistencia a antibióticos (Gloag *et al.*, 2013; Thi *et al.*, 2020).

3.2.2 Proceso de formación del biofilm

El proceso de desarrollo del biofilm de *P. aeruginosa* se divide en cuatro etapas (Figura 15). Inicialmente **las bacterias se adhieren** a la superficie, con la ayuda del pili o el flagelo, y comienzan a producir EPS.

A continuación, tiene lugar la multiplicación celular y la transición de adhesión reversible a irreversible. En este punto se forma también la matriz extracelular que da lugar a la **formación de microcolonias** y el desarrollo de estas microcolonias en estructuras con forma de “champiñón”. La interacción célula a célula y la producción de factores de virulencia juegan un papel esencial en la **maduración del biofilm**. Cuando el biofilm ya se encuentra maduro, las bacterias empiezan a experimentar unos cambios fisiológicos y metabólicos, provocándoles más resistencia al estrés ambiental e incluso a los antibióticos. En la fase de **liberación** y **dispersión**, se forma la cavidad de la matriz en el centro de la microcolonia a través de la autólisis celular para desbaratar la matriz. Finalmente, las células liberadas se someten a una transición de aproximadamente 2h a fenotipos planctónicos que posteriormente ocupan los espacios no colonizados, haciendo que el ciclo comience de nuevo (Thi *et al.*, 2020). Esta última etapa se produce cuando el biofilm ya ha alcanzado un tamaño crítico (Kim & Lee, 2016) o por señales

ambientales, como la disponibilidad de nutrientes u oxígeno, pH y otros productos químicos (Lee & Yoon, 2017).

La estructura del biofilm depende de la motilidad de la bacteria, de manera que bacterias con elevada motilidad dan lugar a biofilms planos, mientras que el biofilm con forma de “champiñón” es generado por bacterias con baja motilidad. Además, cabe resaltar que al mismo tiempo la tasa de motilidad es dependiente de la disponibilidad de nutrientes (Thi *et al.*, 2020).

La formación de biofilm es un proceso complejo y altamente regulado que depende del microorganismo y de la participación de redes de señalización celular, en las que intervienen diversas proteínas que responden a diferentes señales ambientales, como el oxígeno, la luz, el óxido nítrico, el pH o los autoinductores, entre otros.

La formación de biofilm se desencadena en respuesta a las condiciones del entorno. Se han identificado sistemas de fosfotransferencia de dos componentes (*Two-component system*, TCS), que actúan como intermediarios en la transmisión de señales ambientales al interior de la bacteria y que permiten ajustar la expresión génica en concordancia con las variaciones externas. Entre ellos, destaca el papel de los sistemas de QS. En *P. aeruginosa*, el autoinductor sintetizado por *LasI*, es necesario para la formación de biofilm, como se ha demostrado, ya que los mutantes de *lasI* forman biofilms laxos e indiferenciados (Ramírez-Mata *et al.*, 2014). Por otro lado, el sistema Rhl está involucrado en el proceso de maduración del biofilm, mientras que el sistema Pqs participa en la formación de la matriz promoviendo la secreción de DNAe (Ramírez-Mata *et al.*, 2014; Bolívar-Vargas *et al.*, 2021).

3.3 Pigmentos

P. aeruginosa, al igual que otros microorganismos, produce pigmentos que tienen diferentes funciones como son la defensa frente a radiación ultravioleta, participar en la señalización que controla la expresión genética, absorción de hierro, factores de virulencia, antioxidantes, etc. (Kothari *et al.*, 2022; Abdelaziz *et al.*, 2023).

La mayor parte de los aislados de *Pseudomonas* secretan una serie de pigmentos característicos, que incluyen pioverdina (amarillo-verde y fluorescente), piocianina (azul-verde), piorrubina (rojo-marrón) y piomelanina (marrón-negro) (Figura 17) (Kothari *et al.*, 2022).



Figura 17. Colonias de *P. aeruginosa* donde se distinguen los distintos pigmentos sintetizados. (Imagen propia).

3.3.1 Pioverdina: adquisición del hierro

P. aeruginosa, como todos los organismos vivos, necesita hierro para sobrevivir. El hierro es un nutriente esencial para la mayoría de los microorganismos, pero a pH fisiológico tiene una baja solubilidad y no está disponible libre para las bacterias. Esta baja biodisponibilidad lleva a interacciones competitivas entre huésped y patógeno. Por este motivo, los patógenos han desarrollado sistemas tanto para detectar bajos niveles de hierro intracelular, como para incrementar la producción de sideróforos. En este entorno, *P. aeruginosa* produce casi el 20% de los sideróforos microbianos caracterizados. La alta capacidad de esta bacteria para adquirir hierro facilita su versatilidad y se considera una de las señas de identidad de la adaptabilidad de *P. aeruginosa* (Jurado-Martín *et al.*, 2021; Llamas *et al.*, 2022; Ghssein & Ezzeddine, 2022).

La pioverdina se considera el principal sideróforo de *P. aeruginosa*, caracterizado por sintetizarse en condiciones de baja disponibilidad de hierro, para secuestrar el hierro del hospedador o del entorno y causar infecciones. La pioverdina se compone de un cromóforo de tipo dihidroquinolina (responsable de su fluorescencia e idéntico para

todas las pioverdinas), un péptido específico de la cepa (que comprende 6–12 aminoácidos), y una cadena lateral unida al átomo de nitrógeno en la posición C-3 del cromóforo. La cadena peptídica es la parte más importante, ya que es la que confiere variabilidad a la cepa, mientras que la cadena lateral proporciona variabilidad dentro de una misma cepa (Figura 18). Hasta el momento se han descrito más de 100 estructuras distintas de este pigmento secretadas por *Pseudomonas* (Jurado-Martín *et al.*, 2021; Ghsein & Ezzeddine, 2022). En función de la cadena peptídica, las cepas de *P. aeruginosa* producen cuatro tipos estructuralmente distintos de pioverdina (clase I, II, III y IV) (Figura 18) siendo la del grupo I (PVDI) producida por la cepa PAO1, la más estudiada.

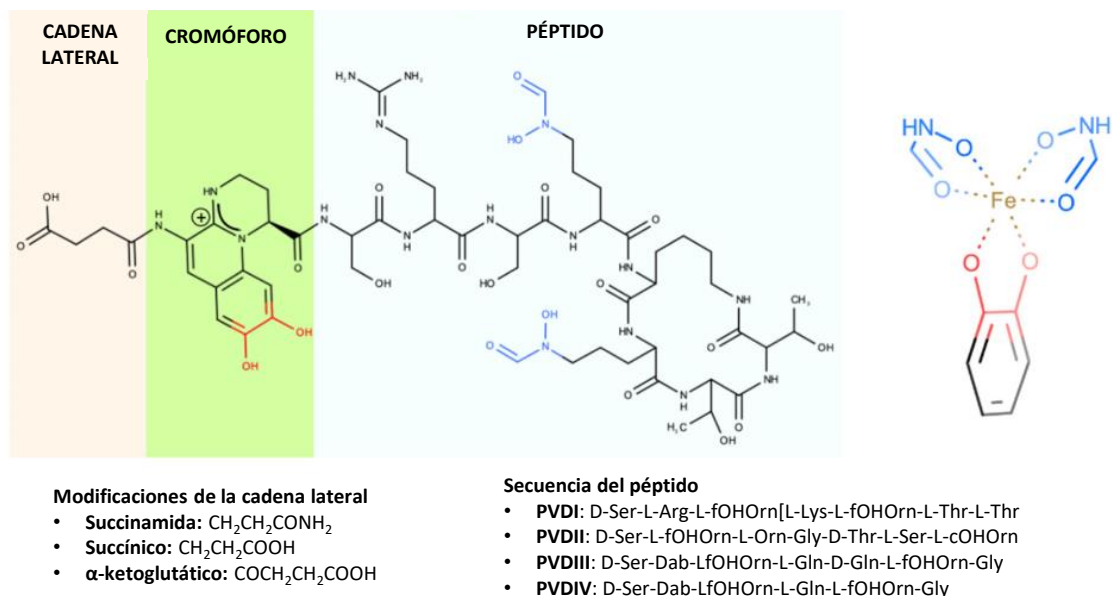


Figura 18: Estructura de pioverdina. En azul y rojo los grupos quelantes del hierro. Editada de Schalk, & Perraud, 2023.

Las pioverdinas regulan su propia producción ya que son moléculas sensibles al QS y su biosíntesis se inicia en el citoplasma y termina en el periplasma para ser secretada al medio extracelular. En el proceso de síntesis se incluyen varias enzimas, destacando las sintetasas peptídicas no ribosomales, las cuales se encargan de producir el cromóforo y las distintas cadenas peptídicas.

En la síntesis de pioverdina en la cepa PAO1, los genes responsables están situados en el locus *pvd*. El operón *pvdABCD* es el encargado de sintetizar el cromóforo. Posteriormente, las enzimas PvdA y PvdQ son responsables de los primeros cambios en

el precursor, mientras que las sintetasas, codificadas por los 4 genes más grandes *pvdL*, *pvdI*, *pvdJ* y *pvdD* son las que van incorporando aminoácidos a la cadena peptídica. Después, la pioverdina se libera al medio extracelular mediante la bomba de expulsión PvdRT-OpmQ. Una vez que se han formado los complejos ferri-sideróforos, la bacteria los absorbe mediante receptores específicos en su superficie celular para internalizar el hierro. Los receptores FpvA y FpvB son los encargados de captar la ferripioverdina (pioverdina+Fe³⁺) para que entre al periplasma. Dependiendo del tipo de pioverdina producida, la bacteria tiene uno u otro receptor (Ghssein & Ezzeddine, 2022) (Figura 19).

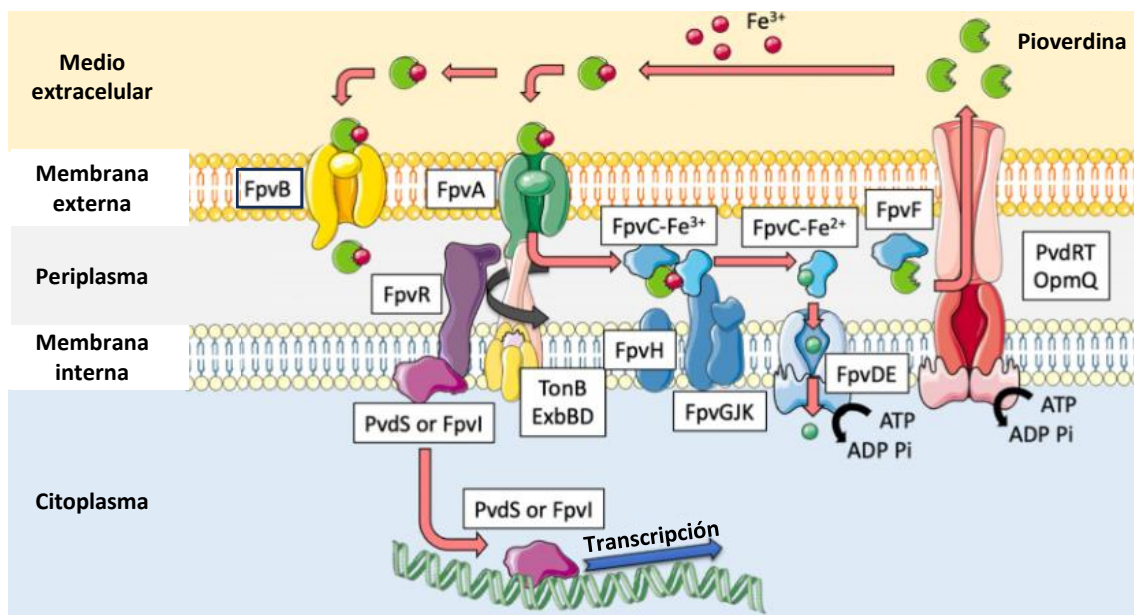


Figura 19: Vía de absorción de hierro dependiente de pioverdina. Sólo están representadas las proteínas implicadas en la absorción de hierro por la pioverdina. Editada de Schalk, & Perraud, 2023.

Además, existe una relación intrínseca entre el sistema Pqs y los niveles de hierro, ya que el principal regulador de pioverdina (PvdS) controla la expresión de *pqsR* y, por lo tanto, la síntesis de Pqs (Jurado-Martín *et al.*, 2021; Ghssein & Ezzeddine, 2022).

3.3.2 Piocianina

La piocianina es un compuesto heterocíclico del grupo de las fenazinas, formado por dos subunidades de N-metil-1-hidroxifenazina, que se secreta a través del sistema de secreción tipo II y que debido a su bajo peso molecular y a sus propiedades zwitteriónicas puede atravesar fácilmente las membranas celulares. La producción de

piocianina es un intrincado proceso, regulado por QS, que involucra dos operones idénticos denominados *phz1* y *phz2* (genes *phzABCDEFGG*) y tres enzimas modificadoras, PhzH, PhzM y PhzS, que modifican el compuesto tricíclico corismato precursor a partir del cual se genera este pigmento (Lau *et al.*, 2004, Chadha *et al.*, 2022) (Figura 20).

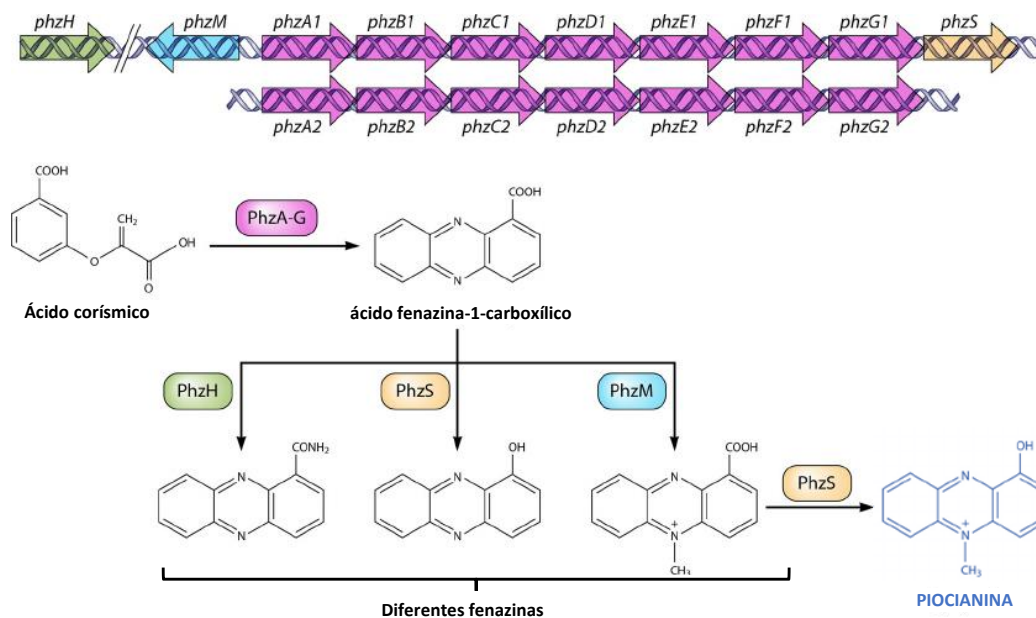


Figura 20: Biosíntesis y sistema de señalización de piocianina. Editado de Nadal-Jimenez *et al.*, 2012.

La piocianina es un pigmento azul producido por el 90-95% de las cepas de *P. aeruginosa*, que favorece la expresión de factores de virulencia y está involucrada en la síntesis de biofilm, debido a que el complejo piocianina-DNAe interfiere con la hidrofobicidad de la célula y fomenta el desarrollo de un biofilm robusto. La piocianina está además relacionada en *P. aeruginosa* con la captación de hierro, en condiciones de baja concentración de oxígeno y controla genes relacionados con las bombas de expulsión activas que aumentan la resistencia a metales, especialmente a la plata. Se ha descrito que las cepas productoras de piocianina son más resistentes a muchos fármacos que las que no lo producen (Abdelaziz *et al.*, 2023).

La piocianina interfiere en múltiples funciones celulares causando múltiples daños en el hospedador, como inhibición del crecimiento de las células epidérmicas y de la respiración celular; alteración de la función ciliar e interrupción de la homeostasis del calcio modulando el ciclo redox y generando especies reactivas de oxígeno (*Reactive*

Oxygen Species, ROS). Además, inhibe la liberación de prostaciclina (anticoagulante y vasodilatador) y de óxido nítrico; y finalmente, altera el sistema inmune mediante la modulación de los niveles de citoquinas e IL-8 (Jayaseelan *et al.*, 2014; Lau *et al.*, 2004; Denning, 1998).

Todos estos mecanismos ponen de manifiesto que este pigmento juega un papel importante en el mantenimiento de las infecciones crónicas y en la patogénesis mediada por *P. aeruginosa* (Hall *et al.*, 2016; Lau *et al.*, 2004).

3.3.3 Piorrubina

La piorrubina es un pigmento producido por *P. aeruginosa* que pertenece al grupo de las fenazinas y que proporciona a la bacteria una tonalidad rojiza- marrón. Un análisis del espectro de absorción de la piorrubina propuso que este pigmento pudiese ser una mezcla de los pigmentos aeruginosina A y B (Holliman, 1969).

El sistema QS parece estar involucrado en su producción, ya que la adición de los autoinductores de LasR y RhIR en cepas mutantes para *lasI* y *rhII* da lugar a una sobreproducción de piocianina y piorrubina. Se cree que la piorrubina tiene un papel importante en la protección de *Pseudomonas* frente al estrés oxidativo (Ogunnariwo & Hamilton Miller, 1975; Allydice-Francis & Brown, 2012).

3.4 Proteasas

P. aeruginosa secreta múltiples proteasas que desempeñan un papel clave en las primeras etapas de colonización e invasión en infecciones agudas. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos de las proteínas. Dicha hidrólisis depende de la secuencia aminoacídica en torno al enlace, de su accesibilidad estérica y de las condiciones físico-químicas del medio. Las proteasas pueden clasificarse según la especificidad de sustrato, la localización intracelular, la función en el organismo o el mecanismo catalítico, entre otros.

Entre las proteasas secretadas por *P. aeruginosa* destacan: exotoxina A (ExoA o ToxA), elastasa A (LasA, estafilolisina), elastasa B (LasB, pseudolisina), proteasa alcalina (AprA, aeruginolisina), proteasa tipo IV (PIV), proteasa pequeña de *P. aeruginosa* (PASP),

exoproteasa A grande (LepA), *P. aeruginosa* aminopeptidasa (PAAP) y MucD (Mateu-Borrás *et al.*, 2022). Tanto la exotoxina A, como las proteasas LasA y LasB son secretadas a través del sistema de secreción tipo II (SST2).

3.4.1 Exotoxina A (ExoA)

La exotoxina A es una toxina letal que inhibe la síntesis de proteínas en células de mamíferos mediante el mismo mecanismo que la toxina diftérica. En concreto, ExoA contiene tres dominios funcionales responsables del reconocimiento celular, la translocación de la toxina a través de las membranas celulares y la actividad catalítica ADP-ribosiltransferasa de esta toxina. Una vez internalizada en las células huésped, ExoA ribosila el ADP del factor de elongación-2 (EF-2), lo cual resulta en la inhibición de la síntesis de proteínas y causa la muerte celular apoptótica.

3.4.2 Elastasas LasA y LasB

Las toxinas LasA y LasB son enzimas con actividad elastolítica que producen un importante daño tisular en las infecciones respiratorias.

LasB (pseudolisina) es una metaloproteasa de la familia M4 secretada extracelularmente que utiliza como cofactores Zn^{2+}/Ca^{2+} y tiene una estructura similar a la termolisina. Genéticamente está codificada por el gen *lasB* y se sintetiza en forma de pre-pro-enzima, con un péptido-señal en el extremo N-terminal, que se degrada por autoproteólisis una vez sale al periplasma. Se considera la proteasa más abundante y el factor de virulencia predominante secretado por *P. aeruginosa* (Matsumoto, 2004).

LasB juega un papel importante en la degradación de elastina y colágeno (críticos para la elasticidad del tejido pulmonar), así como en la inactivación del sistema inmunitario del huésped. Su actividad se ve potenciada gracias a la actividad de la metaloproteasa LasA (estafilolisina) que se une a la elastina a fin de incrementar la función de degradación (Sánchez-Jiménez *et al.*, 2023; Maeda & Yamamoto, 1996; Camberlein *et al.*, 2022). Además, participa en la activación de proteínas de origen bacteriano como la flagelina, exotoxinas y otras proteasas esenciales para la patogenicidad.

La **proteasa LasA**, también denominada estafilolisina, es una metaloproteasa , que normalmente actúa junto a LasB para degradar la elastina. Está codificada por el gen *lasA* y al igual que LasB, se sintetiza en forma de pre-pro-enzima. LasA tiene una elevada especificidad por la elastina y se une a ésta, modificándola para que presente mayor sensibilidad a la actividad proteolítica de LasB. LasA tiene además la capacidad de escindir los enlaces peptídicos de los puentes de pentaglicina que estabilizan la pared de peptidoglicano de algunos *Staphylococcus*, lisando y matando a bacterias de este género, lo cual supone un papel importante en la fase de colonización durante una infección, por su capacidad de imponerse a otras especies bacterianas (Kessler *et al.*, 1993).

Se ha demostrado que mutaciones en los genes de la elastasa A y B desarmen a *P. aeruginosa*, haciendo imposible que la bacteria invada los tejidos del huésped (Chadha *et al.*, 2022).

3.4.3 AprA

La proteasa AprA, o aeruginolisina, codificada por el gen *aprA*, es una zinc-metaloproteasa alcalina. Posee un dominio C-terminal necesario para secretarse a través del periplasma al exterior. A diferencia de las anteriores, esta proteasa es secretada por el sistema de secreción tipo I (TSS1).

Posee la capacidad de degradar flagelina e inhibir la función de algunas células del sistema inmune, bloqueando los fagocitos y los neutrófilos e interfiriendo con la activación del sistema del complemento. Además, su acción en distintos sustratos puede inactivar moléculas, alterar vías de señalización, causar hemorragias y septicemias y promover la ruptura de la pared celular (Walasek & Honek, 2005; Laarman *et al.*, 2012).

3.5 Motilidad: adhesinas

La motilidad desempeña un papel crucial en la patogenicidad de *P. aeruginosa* ya que le permite colonizar e invadir diferentes fluidos y superficies, favoreciendo el establecimiento inicial de la infección. En este proceso juegan un papel esencial las adhesinas, componentes de la superficie celular involucrados en la colonización del

epitelio respiratorio y capaces además de iniciar una respuesta inflamatoria (Gellatly & Hancock, 2013). Se diferencian en dos grupos: las adhesinas de tipo pili (pili tipo IV) y las de tipo no pili (flagelo y LPS) (Wu *et al.*, 2015).

3.5.1 Flagelo

P. aeruginosa posee un flagelo polar único formado por un motor incrustado en la envoltura celular, un gancho y un filamento de flagelina que permite que las bacterias se muevan hacia condiciones más favorables, escapen de un entorno nocivo o se adhieran para formar biofilms. El flagelo proporciona motilidad tipo swimming, en ambientes acuosos, mediante un movimiento giratorio de “sacacorchos”. La rotación de su “motor” impulsado por iones ha evolucionado continuamente, permitiendo incluso que las bacterias sigan nadando a medida que cambia la viscosidad o la composición iónica del entorno exterior (Armitage & Berry, 2020; Bouteiller *et al.*, 2021; Matilla *et al.*, 2022).

Además, el flagelo juega un papel importante en la propia virulencia de la bacteria al favorecer la internalización del patógeno por las células epiteliales e inducir la respuesta de muerte celular hipersensible (Bouteiller *et al.*, 2021). Los mutantes no flagelados son defectuosos en modelos de infección aguda. Sin embargo, al ser una estructura muy inmunogénica, una gran proporción de aislados de infecciones crónicas muestran regulación negativa de los flagelos y/o la motilidad mediada por flagelos o son aflagelados (Gellatly & Hancock, 2013).

En el caso de *P. aeruginosa* el filamento está formado por flagelina polimerizada dispuesta helicoidalmente (FliC), una proteína específica de tipo capuchón (FliD), un gancho en la base del filamento (FlgE), dos ganchos de filamento o proteínas de unión (FlgKL) y una serie de componentes corporales basales a través de las membranas internas y externas. El complejo de la membrana está compuesto por un cuerpo basal, un sistema de secreción flagelar tipo 3 y una estructura de varillas (Jurado-Martín *et al.*, 2021; Bouteiller *et al.*, 2021) (Figura 21).

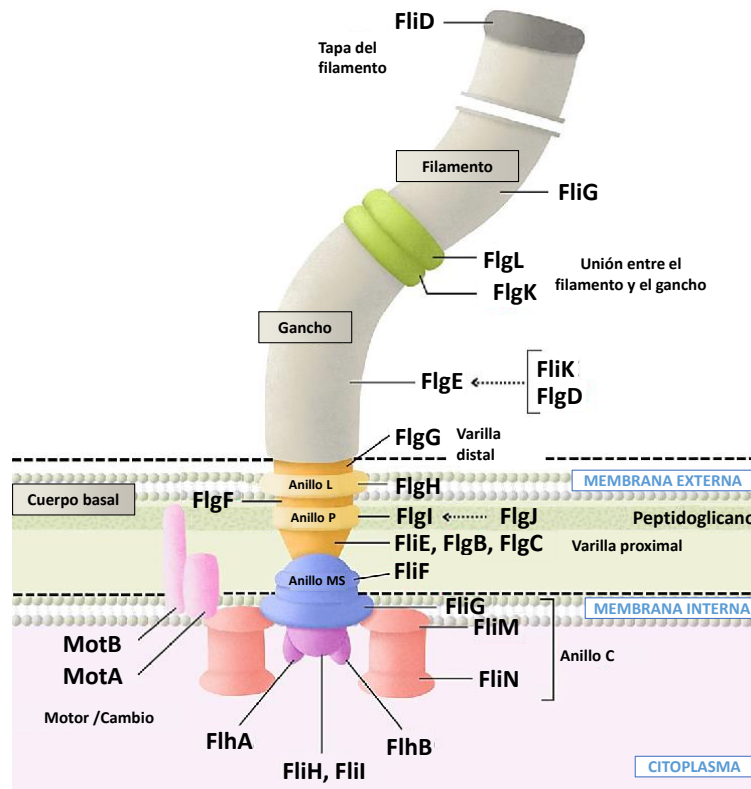


Figura 21: Representación esquemática de la estructura flagelar de *P. aeruginosa* y los productos genéticos implicados en el ensamblaje y/o regulación flagelar. Editado de Rattanachak *et al.*, 2022.

3.5.2 Pili tipo IV

Los pili tipo IV (T4P) son apéndices filamentosos retráctiles ubicados polarmente. Constituyen un dispositivo eficaz para un tipo particular de motilidad de la superficie bacteriana, denominada twitching, y están involucrados en otras funciones bacterianas, como la adherencia a diferentes superficies, la colonización, la formación de biofilm o la absorción de material genético (Burdman *et al.*, 2011; Jurado-Martín *et al.*, 2021). Alrededor del 90% de la capacidad de adhesión de *P. aeruginosa* depende de este mecanismo.

Están compuestos por homopolímeros retráctiles y flexibles de pilina, pilina mayor (PilA), junto con otras pilinas menores menos abundantes localizadas en la punta del pilus (FimUPilVWXY1), que son importantes para la formación del pili, la estabilización de la punta, la agregación, la adhesión y absorción de DNA (Figura 22).

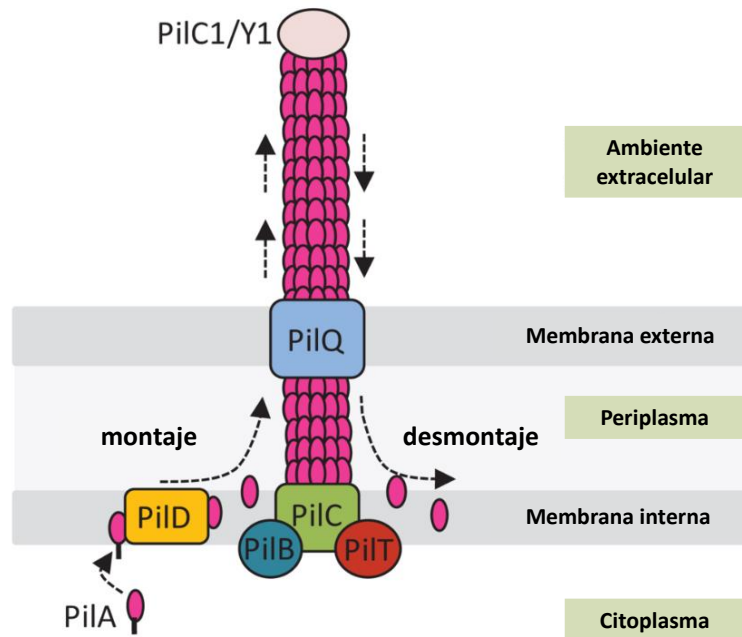


Figura 22. Estructura y función del pili tipo IV (T4P). PilA (Pilina mayor, componente principal del filamento T4P), PilB (ATPasa que media en el ensamblaje y extensión del pilus), PilC (Proteína de la membrana interna), PilD (Peptidasa líder de prepilina/metilasa N-terminal de pilina), PilQ (secretina de la membrana externa), PilT / PilU (ATPasa que media la retracción y el desmontaje del pilus). Editado de Burdman *et al.*, 2011.

Existen cinco grupos de T4P (I, II, III, IV y V) en función de los alelos del gen *pilA* y la presencia de genes accesorios (Kus *et al.*, 2004) (Figura 23). Sólo el grupo II presenta el gen *pilA* sin ningún gen accesorio. El grupo I de T4P puede dividirse en dos subgrupos definidos por diferencias en los genes accesorios: el subgrupo Ia presenta el gen *tfpO_a* y el Ib posee el gen *tfpO_b*. Los alelos *pilA* de los grupos I y II (*pilA_I* y *pilA_{II}*) están genéticamente más estrechamente relacionados entre sí que con los grupos III, IV y V de T4P. Por otro lado, se ha observado una asociación entre los aislados pertenecientes al grupo I y la FQ. Además, parece haber cierta asociación del tipo de T4P con patrones de formación de biofilm y de resistencia a antibióticos (Horna *et al.*, 2019).

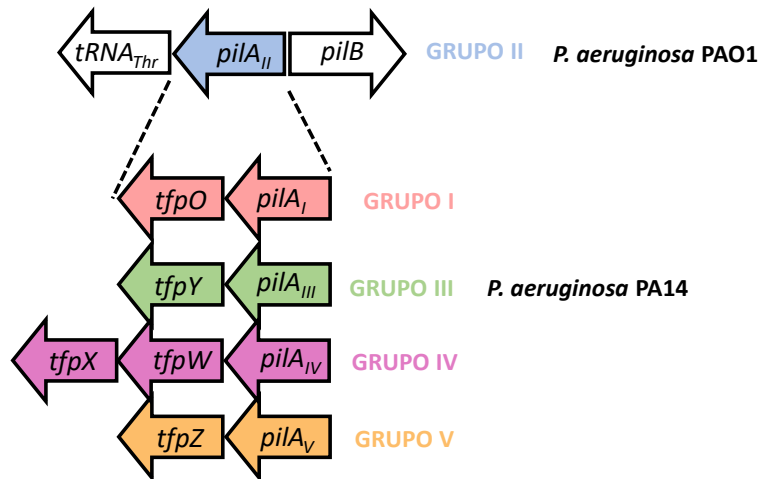


Figura 23: Diferentes alelos de pilina en *P. aeruginosa*. Editado de Kus *et al.*, 2004.

La regulación de la motilidad, que se activa en la fase aguda de la infección y se inhibe en la fase crónica, confiere a *P. aeruginosa* la capacidad de persistir en las infecciones. De hecho, se ha asociado la pérdida de motilidad, producida por mutaciones en los genes *pilB* (Abby *et al.*, 2016) y *pilQ* (Chang *et al.*, 2007) con la infección crónica en FQ (Smith *et al.*, 2006) y las mutaciones en *pilU* o *pilT* con menor virulencia en modelos murinos (Zolfaghar *et al.*, 2003).

3.6 Lipopolisacárido y proteínas de membrana externa

La membrana externa de *P. aeruginosa* tiene una bicapa asimétrica que limita la entrada de compuestos perjudiciales, con una cara interna de fosfolípidos y una cara externa del LPS (Jurado-Martín *et al.*, 2021).

El LPS es una estructura celular importante que consta de tres dominios unidos covalentemente (Figura 24): i) el antígeno O, polisacárido compuesto por subunidades repetitivas que se extiende por la superficie celular; ii) el lípido A, responsable de las respuestas agudas durante la infección y iii) un núcleo o core, formado por oligosacáridos fosforilados que contribuye a la permeabilidad selectiva de la membrana. Entre sus funciones se encuentra el aporte de la integridad estructural y la protección de la membrana frente a diferentes sustancias químicas (King *et al.*, 2009). El LPS induce una fuerte respuesta inflamatoria, permite la adherencia de *P. aeruginosa* a superficies inertes, puede actuar como ligando en la entrada en la célula y, además, se han

observado cambios en su estructura durante la formación del biofilm. También está asociado a la adhesión y posterior infección del epitelio pulmonar en FQ (Qin *et al.*, 2022; Jurado-Martín *et al.*, 2021)

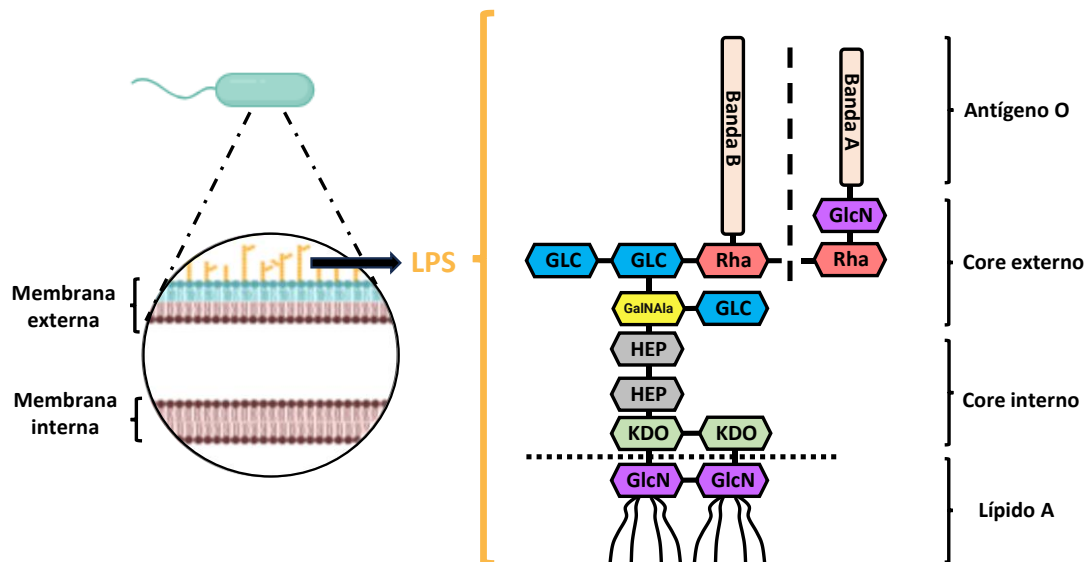


Figura 24: Representación gráfica del lipopolisacárido de *P. aeruginosa* (PAO1) con antígeno O (bandas A y B), núcleo externo e interno. Las abreviaturas de los azúcares son las siguientes: GlcN=ácido 3-(acetilamino)-3-desoxi-d-glucosa, KDO=ácido 3-desoxi-d-mano-oct-2-ulosónico, HEP=heptosa, GalNAc=2-(2-1-alanil)-2 desoxi-d-galactosamina, Rha=ramnosa GLC=glucosa. Editado de Ruhel *et al.*, 2015.

En la superficie bacteriana se exponen dos formas de LPS, denominadas "cubierta o suave" y "descubierta o rugosa", en función de que el antígeno O esté presente u ausente, respectivamente. Además, se producen simultáneamente dos antígenos O: (i) el antígeno polisacárido común (CPA o banda A) que es un homopolímero de estructura conservada formado por unidades repetitivas de trisacárido D-ramnosa y (ii) el antígeno específico O (OSA o banda B) que es un heteropolímero variable compuesto por monosacáridos repetidos que tienen una estructura muy variable inter e intraespecies. Esta variabilidad es la base del sistema de clasificación propuesto por el Sistema Internacional de Tipificación Antigénica (IATS), conocido como serotipado O, que clasifica las cepas en 20 serotipos según el antígeno O específico presentado en la superficie celular. La serotipificación de *P. aeruginosa* se desarrolló originalmente mediante ensayos inmunoquímicos, pero ahora se ha complementado con métodos genéticos (Huszczynski, 2019; Lam *et al.*, 2011; Jurado-Martín *et al.*, 2021).

La biosíntesis de OSA sigue el modelo de vía dependiente de Wzy, que implica las actividades secuenciales de una serie de proteínas integrales de la membrana interna (Wzx, Wzy, Wzz1, Wzz2, WaaL).

La Figura 25, adaptada de Lam *et al.*, 2011, explica la organización de los genes dentro de los clústeres de biosíntesis de OSA. Se representan el grupo de genes implicados en la biosíntesis de OSA del serotipo O:5 (de la cepa de referencia PAO1); así como los grupos de genes de biosíntesis de OSA del resto de serotipos organizados en 11 grupos según la conservación de la secuencia.

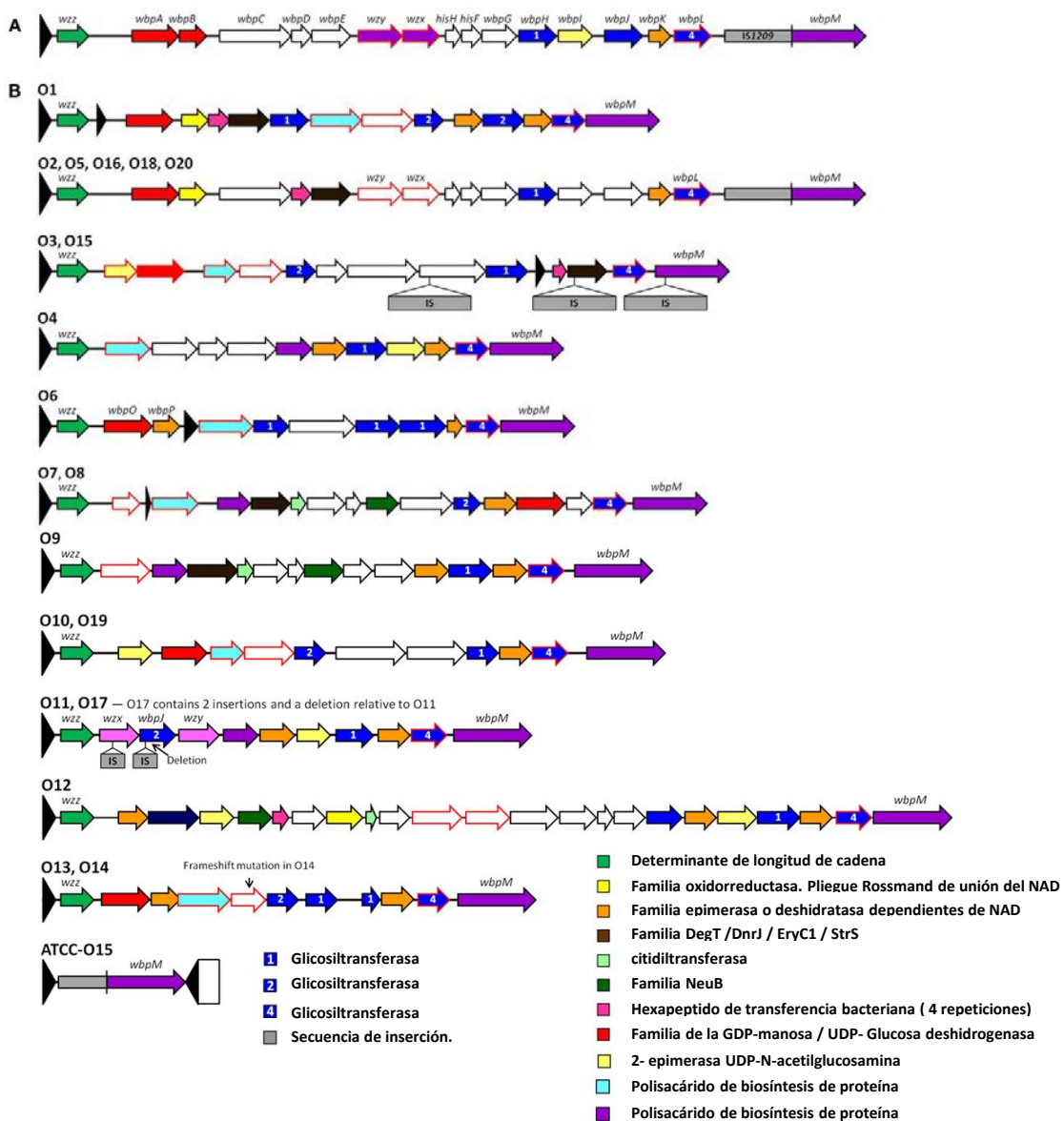


Figura 25: Organización de los genes dentro de los clústeres de biosíntesis OSA. A: grupo de genes implicados en la biosíntesis de OSA del serotipo O:5 (de la cepa de referencia PAO1). **B:** Representación de los grupos de genes de biosíntesis de OSA que se organizaron en 11 grupos según la conservación de la secuencia. Editada de Lam *et al.*, 2011

3.7 Sistema de secreción tipo III y sus efectores principales

De los nueve tipos de sistemas de secreción existentes, *P. aeruginosa* dispone de cinco de ellos: I, II, III, V y VI (Balasubramanian *et al.*, 2013). De todos ellos, el sistema de secreción de tipo III (T3SS) es el más relevante en la patogénesis de esta bacteria.

El **sistema de secreción tipo III (T3SS)** de *P. aeruginosa* es una maquinaria molecular compleja que transporta, en un sólo paso, efectores (toxinas) desde el citoplasma bacteriano hasta el interior de las células huésped mediante un apéndice en forma de aguja que forma un poro en la membrana de la célula eucariota.

El T3SS está constituido por cinco partes funcionales que trabajan de forma conjunta y altamente regulada (Figura 26): el sistema de secreción, los translocadores, las proteínas reguladoras, las proteínas efectoras y las chaperonas (Hauser, 2009; Yahr & Wolfgang, 2006). T3SS es un complejo de más de 25 proteínas, codificadas por 36 genes (Figura 26) agrupados en 5 operones consecutivos (*pscNOPQRSTU*, *popNpcr1234DR*, *pcrGVHpopBD*, *exsCEBA* y *exsDpscBCDEFGHIJKL*) que codifican las proteínas estructurales y reguladoras, mientras que los genes codificantes de los efectores (*exoS*, *exoT*, *exoU*, *exoY*, *pemA*, *pemB*) y las chaperonas (*spcS*, *spcU*) están dispersos a lo largo del genoma (Horna & Ruiz, 2021). Cabe destacar el caso de *exoU* que se ubica en diferentes islas genómicas (Kulasekara *et al.*, 2006; Sawa *et al.*, 2014).

El complejo aguja llamado **inyectisoma**, debido al hecho de que es capaz de inyectar proteínas, es la estructura responsable del transporte de las proteínas efectoras desde el citosol de la bacteria hasta el medio extracelular y su estructura se puede dividir en dos partes: una base y un filamento tipo aguja. La proteína PscF es el componente principal de la aguja que tiene aproximadamente de 60 a 80 nm de longitud y 6-7 nm de ancho. El proceso de unión de ésta requiere de otras dos proteínas, las co-chaperonas PscE y PscG. Por otro lado, la base está compuesta por las proteínas PscD, PscJ, PscC y PscI (Figura 26). El **aparato de translocación** forma un poro en la membrana de la célula eucariota que libera las proteínas efectoras secretadas por el complejo aguja directamente en el citoplasma de la célula huésped. Este aparato translocador en *P. aeruginosa* está formado por tres proteínas: PopB, PopD y PcrV. Estas proteínas son las primeras en ser transportadas a través del canal, pero no se inyectan en el citosol de la

célula eucariota, sino que permanecen en la membrana para formar el poro, de unos 2,8-6,0 nm de diámetro, denominado translocón. Seguidamente, los efectores son transportados hasta el citosol de la célula eucariota, pasando a través de este poro (Sawa *et al.*, 1999; Goure *et al.*, 2004) (Figura 26).

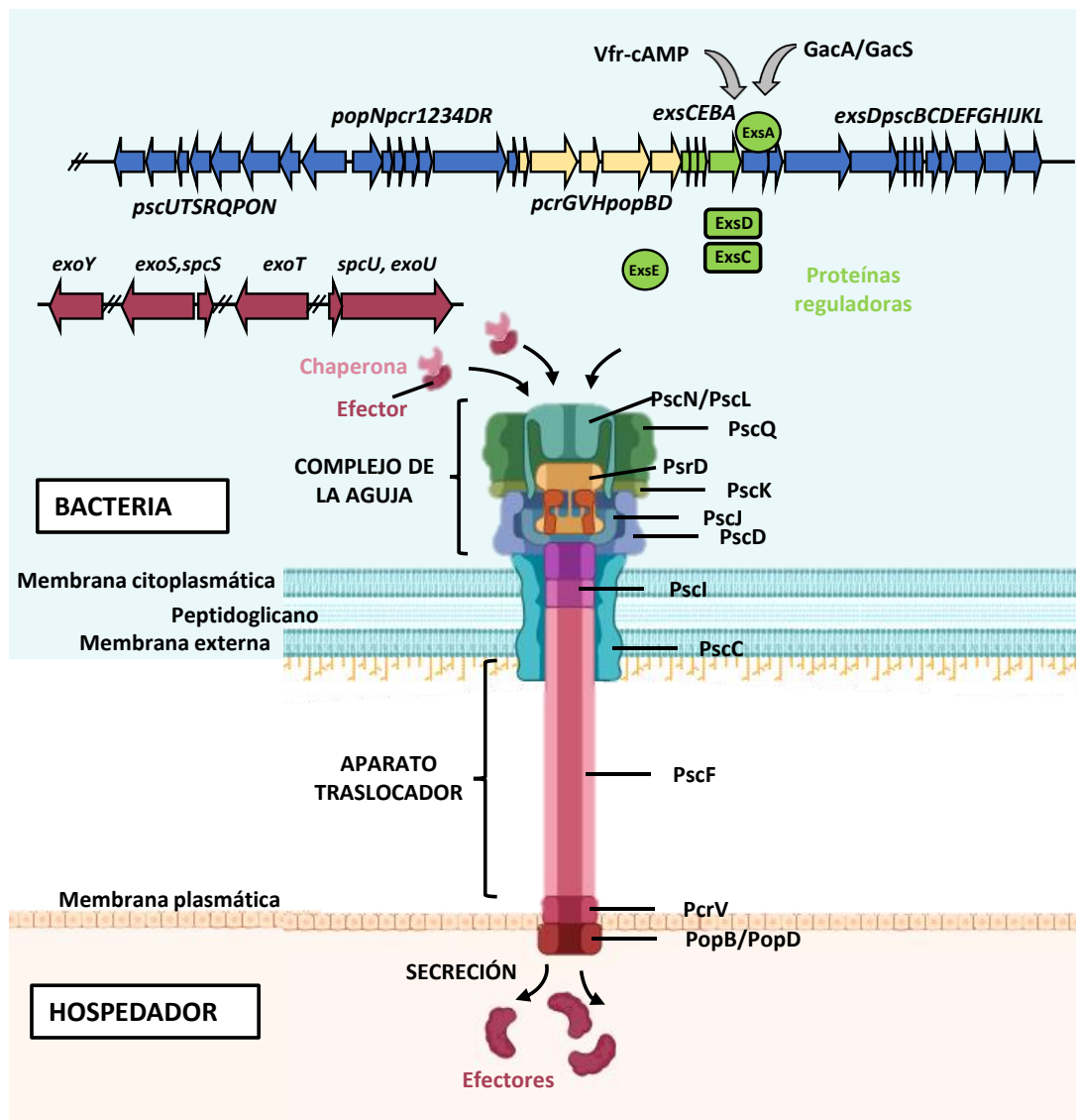


Figura 26: Estructura del sistema de secreción tipo III de *P. aeruginosa* y los genes que codifican sus principales componentes. Editada de Selim *et al.*, 2022 y Horna & Ruiz, 2021

Clásicamente se han descrito cuatro **efectores** de T3SS en *P. aeruginosa*: ExoS, ExoT, ExoU y ExoY. No obstante, combinando procedimientos *in silico* y experimentales, se han descrito dos efectores adicionales: PemA y PemB. Entre los efectores de T3SS, ExoS y ExoU son los más estudiados y caracterizados, probablemente debido a su mayor

relevancia clínica (Horna & Ruiz, 2021). Para llevar a cabo la secreción de estas proteínas se requiere de unas chaperonas: SpcS sirve para la secreción de ExoS y ExoT; SpcU es la responsable del paso de ExoU; para ExoY, en cambio, no se han observado chaperonas (Finck-Barbançon *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 2008).

ExoS es una proteína de 48,3 kDa con una longitud de 453 aminoácidos codificada por el gen *exoS* localizado junto al gen codificante de su chaperona SpcS en orientaciones opuestas (Figura 26). ExoS presenta una actividad tóxica bifuncional. La región N-terminal de ExoS presenta una proteína activadora de GTPasa, que conduce a alteraciones en el citoesqueleto de actina, redondeo celular e interrupción de la adhesión célula a célula. Por otro lado, la región C-terminal posee actividad adenosina difosfato ribosiltransferasa (ADPRT), que es una de las principales causas de la apoptosis de la célula huésped relacionada con *P. aeruginosa* (Horna & Ruiz, 2021). La prevalencia de ExoS varía en función de los estudios y los orígenes de las cepas estudiadas. Así, en estudios de *P. aeruginosa* proveniente de infecciones agudas, la prevalencia de ExoS oscila entre el 58 y el 72% (Horna & Ruiz, 2021). Aunque ExoU sea el que se asocia con peores desenlaces clínicos, ExoS se presenta con mayor frecuencia, tanto en infecciones crónicas como agudas. **ExoT** comparte un 75% de su secuencia aminoacídica con ExoS y posee los mismos dos dominios funcionales. ExoT tiene efectos similares a los de ExoS sobre el citoesqueleto de la célula eucariota y además, inhibe la fagocitosis de *Pseudomonas spp.* y la reparación del tejido pulmonar dañado (Geiser *et al.*, 2001). **ExoY** es una adenilato ciclasa que incrementa los niveles citosólicos de AMPc. Este aumento provoca la desorganización de los filamentos de actina y produce un aumento de la permeabilidad endotelial y la inhibición de la fagocitosis (Hauser *et al.*, 2009). **ExoU** es el efector de *P. aeruginosa* más largo (687 aminoácidos) y tiene un tamaño molecular de 74 kDa. El gen *exoU* se encuentra dentro de un operón tras el gen *spcU*, codificante de su chaperona. Este efector puede estar codificado dentro de un entorno de isla genómica en diferentes elementos integrativos y conjugativos (ICEs) relacionados con pKCL102 como PAPI-2 (11Kb) o las islas ExoU A, B y C (de 81, 30 y 3,5–4 Kb, respectivamente) (Horna & Ruiz, 2021; Kulasekara *et al.*, 2006; Sawa *et al.*, 2014). ExoU, codifica una proteína con actividad fosfolipasa A₂ (PLA₂), y se considera el principal impulsor del fenotipo citotóxico, caracterizado por un rápido efecto necrótico, que

provoca la muerte de la célula huésped dentro de las 3h posteriores a la inyección. ExoU se considera el efector de T3SS menos prevalente, cuya prevalencia varía del 25 al 50 % en la mayoría de los estudios. En cuanto a las infecciones humanas, se observa una mayor prevalencia de ExoU en muestras de unidades de quemados o UCI (Horna & Ruiz, 2021).

La presencia de los efectores *exoS* y *exoU*, es, casi siempre, mutuamente excluyente, existiendo pocas descripciones de *P. aeruginosa* que contengan ambos genes. Sin embargo, desde la primera descripción de una cepa co-portadora de ambos genes en París en 1999, se han detectado esporádicamente este tipo de cepas en al menos 12 países, lo que sugiere una amplia distribución de tales clones (Horna *et al.*, 2019, Song *et al.*, 2023b). A medida que el número de aislados secuenciados aumenta, gracias a los avances en la secuenciación del genoma, se hace posible una mayor detección de este tipo de clones, así como de los linajes y la distribución de éstos.

3.7.1 Regulación del T3SS

Tras el contacto con la célula huésped, se producen tres eventos: 1.- secreción de las proteínas translocadoras que forman el poro en la membrana plasmática de la célula diana, 2.- translocación de las proteínas efectoras preformadas a la célula diana; y 3.- aumento de la expresión de los genes relacionados con el inyectisoma (Yahr *et al.*, 1996). Este modo de actuación permite que los componentes del T3SS se sinteticen a niveles elevados cuando más se necesitan, es decir, después del contacto del patógeno con la célula huésped.

Esta regulación es un equilibrio complejo, con al menos 25 genes involucrados. Los genes *exs* (*exsA*, *exsB*, *exsC*, *exsD* y *exsE*) se encargan de regular el sistema (Frank, 1997) y su codificación depende de varios operones; *exsCEBA* están codificados dentro del mismo operón y *exsD* está codificado en otro (Horna & Ruiz, 2021) (Figura 27).

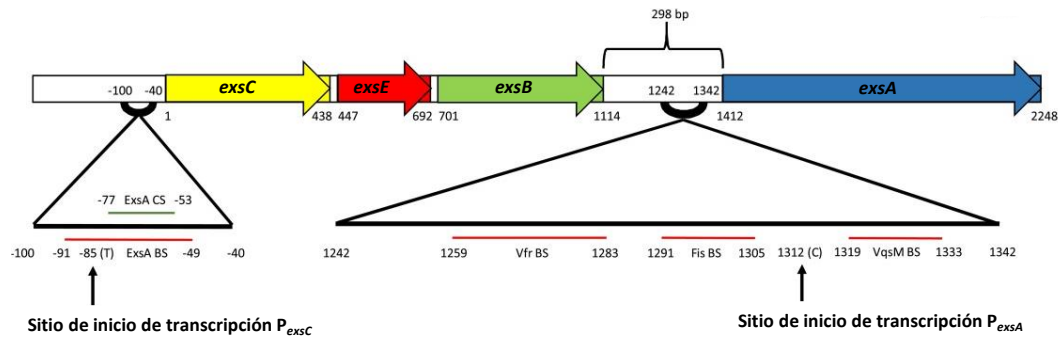


Figura 27: Esquema de la regulación del operón *exsCEBA*. Los números debajo de los genes representan la posición de los codones inicio y fin. Toda la numeración se refiere al codón ATG inicial del gen *exsC* y sigue la secuencia de referencia de *P. aeruginosa* PAO1 (GenBank NC_002516). Todos los tamaños son proporcionales. En la figura, los sitios de unión de los reguladores (BS) están marcados con líneas rojas, y la región de consenso (CS) de ExsA está marcada con una línea verde. En la figura se muestran ambos sitios de inicio de la transcripción de P_{exsC} y P_{exsA} . Modificada de Horna & Ruiz, 2021.

En condiciones de represión de la secreción, ExsD (anti-activador) se encuentra unido a ExsA, inhibiendo la transcripción. ExsC (anti-anti-activador) tiene la capacidad de interrumpir la interacción ExsD-ExsA al unirse directamente a ExsD, dejando libre a ExsA. En condiciones de represión, ExsC tiene mayor afinidad por ExsE, lo que evita su unión a ExsD (Rietsch *et al.*, 2005; Urbanowski *et al.*, 2005). No obstante, en condiciones de activación de la secreción, ExsE es exportado al medio extracelular o al citosol de las células huésped (Urbanowski *et al.*, 2007), dejando libre a ExsC que posteriormente se unirá a ExsD, liberando a ExsA y permitiendo la activación transcripcional de los genes de T3SS (Hauser, 2009).

3.8 Exolisina A (ExlA)

La Exolisina (ExlA) es un factor de virulencia descubierto más recientemente y secretado por un subconjunto de cepas de *P. aeruginosa* que carecen del T3SS y sus efectores. La primera cepa *exlA*-positiva fue *P. aeruginosa* PA7, descrita en 2010 (Roy *et al.*, 2010). También se aislaron cepas de *P. aeruginosa* carentes de los genes del T3SS en muestras de pacientes que padecían una forma agresiva de neumonía hemorrágica (Elsen *et al.*, 2014) y actualmente se han encontrado cepas de *P. aeruginosa exlA*-positivas en todo el mundo en pacientes con diversos tipos de infección e incluso están muy extendidas en el medioambiente. Dentro de los cinco filogrupos que constituyen la

especie *P. aeruginosa* (Freschi *et al.*, 2019), las cepas *exlA*-positivas se clasifican en el clado 3, al que pertenece PA7, o en el clado 5, al que pertenece PA39. El clado 3 es genéticamente diverso y definido como un clado atípico; mientras que los clados 1, 2, 4 y 5 poseen un alto grado de conservación genómica (Quiroz-Morales *et al.*, 2023). Resulta interesante que los sistemas T3SS y ExlAB parecen ser funcionalmente incompatibles, ya que nunca se ha identificado ninguna cepa que posea ambos sistemas de secreción.

La exolisina A (ExlA) es una toxina que muestra actividad perforante de la membrana celular y proporciona un fenotipo citolítico. ExlA pertenece a la familia de hemolisinas y hemaglutininas, moléculas exportadas por un subtipo del sistema de secreción tipo V (T5SS), en el cual ExlA es la proteína pasajera y ExlB es el transportador, presumiblemente ubicado en la membrana externa de la bacteria. La inserción de ExlA en la membrana celular del huésped provoca la formación de poros, desencadenando una entrada masiva de calcio en las células y la salida de potasio. Esto induce una serie de eventos citotóxicos, como la ruptura de las uniones celulares y la osmólisis celular, llevando a la muerte celular. Además, ExlA activa el inflammasoma NLRP3 en macrófagos, desencadenando un proceso de piroptosis.

ExlA es una proteína de 172 kDa compuesta por tres dominios funcionales, además de un péptido señal de secreción tipo I N-terminal: 1.- Un dominio de secreción de dos componentes, necesario para la interacción con ExlB. 2.- El dominio central que consta de repeticiones de secuencias homólogas a una hemaglutinina-adhesina filamentosa, que se predice que se plegará en una hélice β alargada. 3.- El dominio C-terminal, que normalmente confiere especificidad de acción, no está relacionado con otros dominios con funciones conocidas y se ha demostrado que forma un glóbulo en solución (Huber, 2022) (Figura 28).

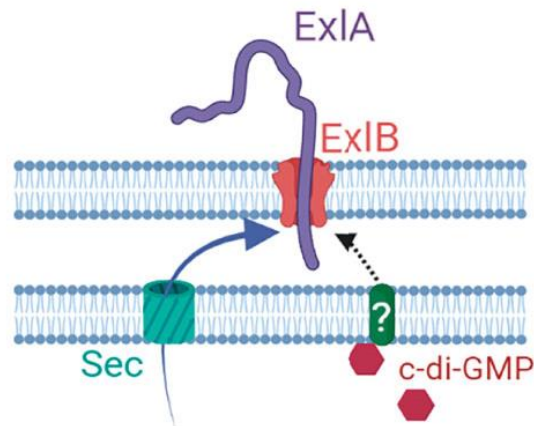


Figura 28. Representación esquemática de la secreción de ExIA. Tanto ExIA como ExIB se secretan en el periplasma a través de la vía Sec. ExIB se inserta en la membrana externa y ExIA se exporta al medio extracelular a través del poro que ha formado ExIB. Cuando las concentraciones intracelulares de c-di-GMP son altas, la translocación de ExIA se detiene a mitad de camino con parte de la toxina apuntando hacia afuera. Al parecer, la secreción se reanuda cuando ExIA interactúa con un receptor del huésped (Huber, 2022).

ExIAB está codificada por el operón *exIB-exIA*. La región promotora contiene un sitio de unión para Vfr, un factor de transcripción conocido por regular varios factores de virulencia de *P. aeruginosa*. Vfr regula positivamente la expresión de *exIB-exIA* y su unión al promotor *exIB-exIA* es dependiente de AMPc. La adenilato ciclasa CyaB unida a la membrana, y no la adenilato ciclasa citosólica CyaA, es responsable de la activación transcripcional de *exIB-exIA* dependiente de AMPc, lo que sugiere que la expresión de *exIB-exIA* está regulada positivamente por algunas señales ambientales, como bajas concentraciones de calcio. Además, la transcripción de *exIB-exIA* está reprimida por un factor transcripcional muy potente llamado ErfA (Huber, 2022) (Figura 29).

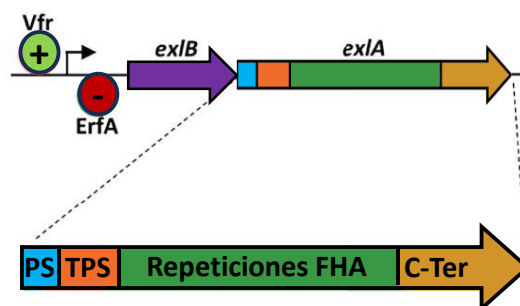


Figura 29: Representación de la transcripción del operón *exIB-exIA*. La transcripción del operón *exIB-exIA* se ve reforzada por Vfr y regulada negativamente por el factor de transcripción ErfA. La proteína ExIA está formada por un péptido señal de secreción (PS), un dominio de secreción de dos componentes (TPS) que interactúa con ExIB, repeticiones similares a hemaglutinina adhesina filamentosa (FHA) y un dominio C-terminal (C-ter). Editado de Huber, 2022.

4. Elementos genéticos móviles/movilizables

Los elementos genéticos móviles/movilizables (EGM) en *P. aeruginosa* desempeñan un papel crucial en la versatilidad genética y la adaptabilidad de esta bacteria oportunista. Estos EGM contribuyen significativamente a la plasticidad genómica de *P. aeruginosa*, permitiéndole adquirir y transferir genes que afectan su virulencia, resistencia a antibióticos y capacidad para colonizar diversos nichos.

Entre los EGM destacados en *P. aeruginosa* se encuentran los plásmidos, transposones, integrones, fagos, elementos integrativos y conjugativos (ICEs) e islas genómicas (GIs). Los **plásmidos** son pequeños fragmentos de DNA circulares que pueden replicarse de forma independiente del cromosoma bacteriano. Estos elementos a menudo llevan genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia, lo que permite a la bacteria adaptarse rápidamente a nuevas presiones ambientales (Kottara *et al.*, 2018).

Las **secuencias de inserción** (IS) son fragmentos cortos de DNA (entre 0,7 y 2,5 Kb), con una organización genética básica y capacidad de insertarse en múltiples lugares del genoma. Las IS codifican únicamente las enzimas necesarias para su transposición y están formadas por una secuencia central codificante de una transposasa y en los extremos secuencias repetidas en orden inverso (IRR e IRL) (Figura 30). La transposasa puede estar codificada por una o varias pautas abiertas de lectura. De esta manera cuando una IS se integra en un punto del genoma, generalmente aparece una repetición directa (DR) de la secuencia diana (Howe & Berg, 1989). La página web ISFinder (<https://www-is.biotoul.fr/index.php>) recoge todas las secuencias de inserción descritas y sus propiedades.

Los **transposones** se generan cuando dos copias de una IS, en orden directo o inverso, flanquean un segmento de DNA, haciendo que este segmento intermedio sea móvil. A estas estructuras se les llama transposones compuestos (Tn) (Mahillon & Chandler, 1998). En principio, siempre que dos copias de una IS se sitúen relativamente cerca se forma un Tn compuesto, ya que el conjunto de las IS y la secuencia central

puede funcionar como una unidad. Los transposones de *P. aeruginosa* pueden diseminar genes de resistencia a antibióticos.

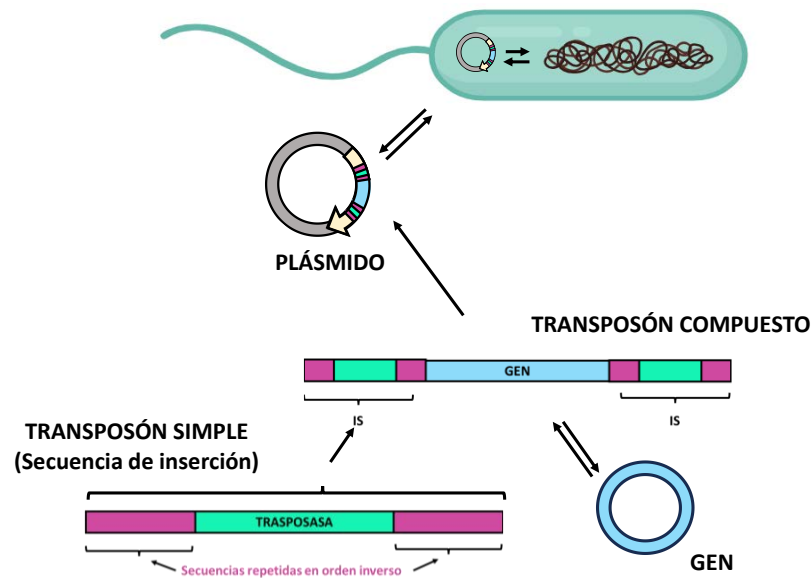


Figura 30: Representación gráfica de varios EGM: Secuencia de inserción (IS), transposón compuesto y plásmido.

Los **integrones** son plataformas genéticas que permiten la captura y expresión selectiva de genes mediante la recombinación de casetes génicos. Todos los integrones se componen de tres elementos (Figura 31): 1.- el gen codificante de una integrasa de la familia tirosin-recombinasa (*intI*), que se encarga de la integración de los casetes génicos; 2.- un sitio de recombinación primario sitio-específico (*attI*) en el que se integran los casetes génicos y 3.- un promotor (Pc), responsable de la expresión de los casetes génicos integrados (Partridge *et al.*, 2009). En *P. aeruginosa* se han encontrado integrones que facilitan la adquisición rápida de genes de resistencia, principalmente genes codificantes de β -lactamasas y genes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos.

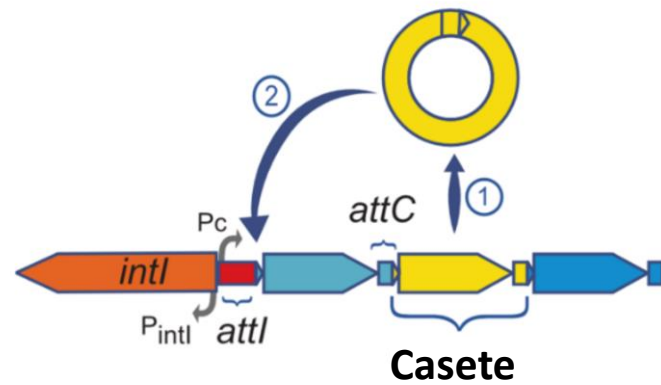


Figura 31: Estructura general de los integrones. La integrasa puede escindir un casete génico (1) y/o integrarlo en el sitio *attI* (2). Editado de Cury *et al.*, 2016

Además, los **fagos** o **bacteriófagos**, que son virus que infectan bacterias, también desempeñan un papel en la movilidad genética de *P. aeruginosa*. Los fagos pueden transferir genes entre bacterias durante la infección, lo que también contribuye a la diversidad genética de la población bacteriana (Lerminiaux & Cameron, 2019; Chen *et al.*, 2022).

En *P. aeruginosa* los EGM más relevantes son los elementos integrativos y conjugativos (ICEs) y las islas genómicas (GIs):

Los **ICEs** son elementos genéticos móviles con un tamaño que oscila entre ~20 kb y >500 kb, que pueden integrarse en el cromosoma bacteriano y que son capaces de transferirse horizontalmente entre células mediante conjugación. Hay dos características que definen a los ICEs: se encuentran integrados en el genoma del huésped; y codifican un sistema de conjugación funcional, un sistema de secreción de tipo IV que media su transferencia a otras células. Aunque contienen genes y sitios necesarios para procesar su DNA para su transferencia, éstos no se expresan cuando el ICE se integra en el cromosoma. Sin embargo, bajo ciertas condiciones, o quizás de forma espontánea, se induce la expresión de los genes necesarios para la escisión y la conjugación, y el ICE se escinde del cromosoma huésped (Johnson & Grossman, 2015). Además del aparato de conjugación, llevan módulos responsables del mantenimiento, escisión e integración dentro del nuevo genoma huésped (la integrasa media en la recombinación específica del sitio entre repeticiones directas ubicadas en el huésped y el ICE) (Botelho *et al.*, 2020).

En *P. aeruginosa*, se han identificado varios ICEs que llevan consigo genes que pueden conferir ventajas adaptativas a la bacteria. Estos elementos pueden albergar genes de resistencia a antibióticos, factores de virulencia y capacidades metabólicas adicionales.

Las **islas genómicas**, por su parte, son segmentos de DNA de hasta 500kb que se encuentran en el genoma bacteriano pero que poseen una composición génica diferente de las regiones circundantes (generalmente diferente porcentaje de G+C), normalmente flanqueadas por secuencias directas cortas (DRs de 9 a 20pb). Además, frecuentemente portan determinantes genéticos de movilidad como integrasas, escionasas o transposasas que proporcionan a la bacteria un dinamismo intrínseco al propio contenido de la isla genómica ya sea integrando nueva información o perdiendo parte de la preexistente. Estas islas genómicas pueden contener genes asociados con la virulencia, la resistencia a antibióticos y la adaptación a nichos específicos.

Algunas GIs son móviles y, por lo tanto, pueden moverse a nuevos huéspedes, como transposones conjugativos, ICEs y profagos, mientras que otras pierden su movilidad. Las islas genómicas se pueden movilizar por transducción y por conjugación, aunque para la mayoría no se conoce su mecanismo de transferencia.

Estas GIs generalmente se integran adyacentes a tRNAs en sitios específicos del genoma denominados "hot spots". En este sentido, existen diferentes tipos que se clasifican según el contenido de sus genes de carga o según sus medios de integración y movilidad, destacando las islas genómicas de patogenicidad (PAPIs- *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenicity Island o PAIs- *pathogenic islands*) que portan uno o más genes de virulencia, los cuales han sido adquiridos en bloque de una fuente externa (Fernández *et al.*, 2004).

Botelho *et al.*, 2019 reporta un total de 25 islas genómicas: dos islas patógenas de *P. aeruginosa*, PAPI-1 y PAPI-2; 17 islas genómicas de *P. aeruginosa*, PAGI-1 a PAGI-17; cinco islas genómicas de cepas epidémicas de Liverpool, LESGI-1 a LESGI-5; y una isla genómica de origen plasmídico, pKLC102.

5. Filogenia molecular

La tipificación molecular de *P. aeruginosa* ha sido fundamental para comprender su diversidad genética y su papel en infecciones humanas. A lo largo de la historia, los métodos tradicionales basados en características fenotípicas y serotipos fueron insuficientes para abordar la variabilidad genética de esta bacteria oportunista. La llegada de técnicas moleculares revolucionó la tipificación, permitiendo una discriminación más precisa, y entre las que destacan la electroforesis en Campo Pulsante (PFGE) que estudia el genoma completo por macrorrestricción y el "Multilocus sequence typing" (MLST) que examina secuencias de DNA en 7 genes conservados. Así mismo, el desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación y la progresiva disminución de costes ha hecho más accesible la utilización de la secuenciación masiva en los últimos años para determinar las filogenias bacterianas, entre otras características.

La técnica de PFGE destaca por su notable capacidad de discriminación. Resulta altamente efectiva para cotejar aislados vinculados temporal y espacialmente, pero se enfrenta a desafíos significativos cuando se utiliza en distintos laboratorios o en estudios epidemiológicos que abarcan extensos periodos de tiempo. Por el contrario, el MLST presenta una ventaja clave en términos de globalización, ya que los datos generados se almacenan en bases accesibles que facilitan el análisis y la comparación de secuencias y alelos. Además, su alta reproducibilidad, fundamentada en la secuenciación, contribuye a consolidar su fiabilidad. Por su parte, la secuenciación del genoma completo no sólo proporciona información de epidemiología molecular, si no de resistencia a antibióticos, virulencia y evolución.

5.1 PFGE

El PFGE ha sido considerada el "*gold standard*" para la tipificación de bacterias. El método implica la restricción enzimática del DNA de las bacterias, la separación de las bandas de DNA digeridas utilizando una cámara de electroforesis de campo pulsante, seguida de la asignación clonal de las bacterias basándose en patrones de bandas. Se han desarrollado varios protocolos PFGE para tipificar diferentes bacterias, siendo uno

de los métodos más utilizados para estudios filogenéticos, vigilancia de la seguridad alimentaria, control de infecciones e investigaciones de brotes (Neoh *et al.*, 2019).

5.2 MLST

Esta técnica se basa en la secuenciación de múltiples loci de genes específicos o genes “housekeeping”. La combinación de las secuencias únicas asignadas a cada alelo en estos loci proporciona un código distintivo o secuencia tipo (ST) para cada cepa.

Los genes seleccionados deben ser lo suficientemente conservados para proporcionar una base estable para el análisis filogenético, pero con la variabilidad necesaria para discriminar entre cepas. En *P. aeruginosa* los genes seleccionados son *aroE*, *acsA*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* y *trpE*, como muestra la Figura 32 (Curran *et al.*, 2004).

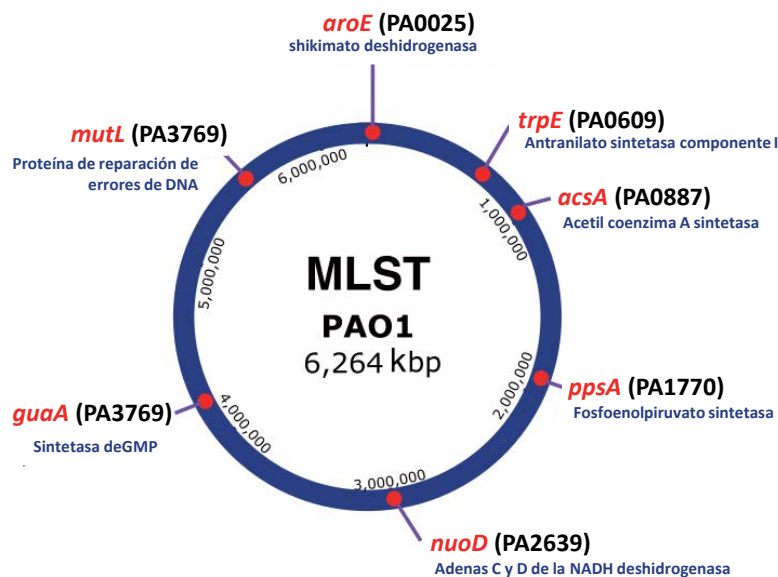


Figura 32: Mapa genético del genoma PAO1 en el que se marcan los genes seleccionados para la realización del MLST en *P. aeruginosa*. Editado de Sawa *et al.*, 2020.

El desarrollo del MLST en *P. aeruginosa* ha revelado la compleja estructura poblacional de esta bacteria. La población sigue una estructura epidémica, sin que existan cepas predominantemente clínicas, ambientales o animales; más bien, se encuentran poblaciones sumamente diversas, independientemente de su origen. La notable variabilidad se refleja en el registro total de más de 4000 STs depositados en la

base de datos específica de *P. aeruginosa* (<https://pubmlst.org/organisms/pseudomonas-aeruginosa>). Los STs se pueden agrupar en complejos clonales (CC). El perfil alélico fundador o central, a partir del cual habrían surgido los demás, se determina según el número de conexiones. A modo de ejemplo, el CC175 está compuesto por 20 STs y el CC253 por 26 STs (Figura 33).

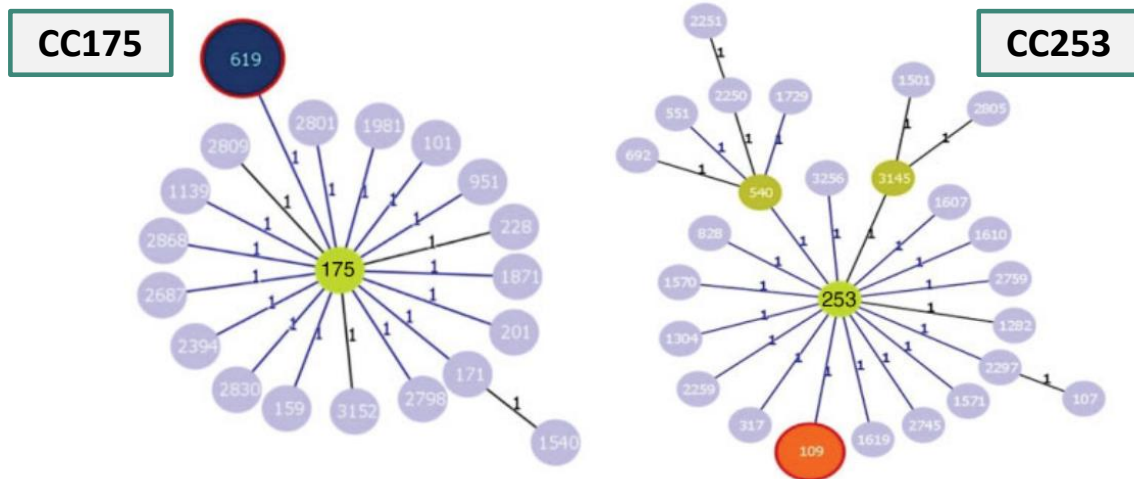


Figura 33: Representación de los complejos clonales a los que pertenecen los ST175 y ST253. Editado de Cabrera *et al.*, 2022.

P. aeruginosa posee una estructura poblacional epidémica no clonal, que comprende un número limitado de linajes generalizados, seleccionados de un conjunto de numerosos genotipos raros y no relacionados, recombinados con alta frecuencia (Pelegriin *et al.*, 2021). Existen linajes clonales internacionales XDR/DTR de alto riesgo, que se han diseminado en hospitales de todo el mundo (Oliver *et al.*, 2024; del Barrio-Tofiño *et al.*, 2020). Según su prevalencia, diseminación global y asociación con fenotipos de multirresistencia antimicrobiana, los principales **clones de alto riesgo** (CAR) a nivel mundial incluyen ST235, ST111, ST233, ST244, ST357, ST308, ST175, ST277, ST654 y ST298 (Figura 34). Estos clones, además, se asocian de forma importante a elementos de resistencia, en muchos de los casos, transferibles. La importancia de estos clones reside en el éxito que presentan en ese tipo de ambientes (en el contexto de infección oportunista) y la capacidad que poseen para causar brotes epidémicos a nivel mundial (Tabla 4).

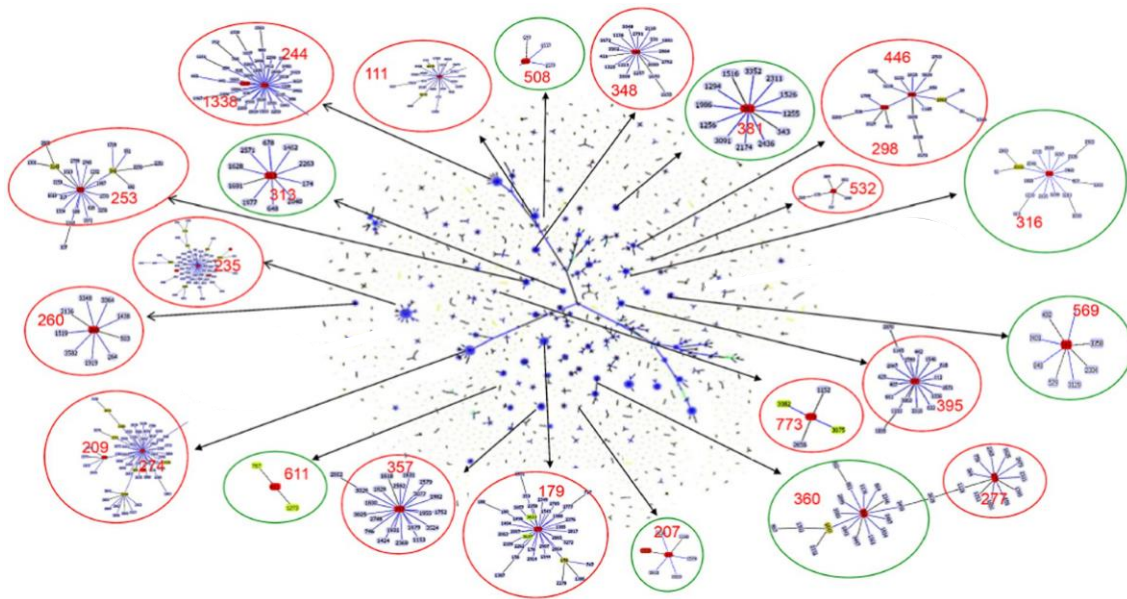


Figura 34: Instantánea de la población de *P. aeruginosa*. Los STs de la base de datos PubMLST de *P. aeruginosa* (a fecha de 11/07/2022) se muestran en un único diagrama eBURST. Cada punto representa un ST y las líneas conectan variantes de un solo locus. Un círculo rojo rodea los grupos reportados como clones internacionales de alto riesgo, los grupos con nuevos clones potenciales de alto riesgo aparecen rodeados por un círculo verde. Editado de Zhao *et al.*, 2023.

Tabla 4. Resumen de las principales características de los 10 clones de alto riesgo de *P. aeruginosa* más representativos (Oliver *et al.*, 2024).

ST	Complejo clonal	Serotipo	T3SS	Continente					Carbapenemasa								
				N. América	S. América	Europa	África	Asia	Oceanía	<i>bla</i> GES	<i>bla</i> KPC	<i>bla</i> FIM	<i>bla</i> GIM	<i>bla</i> IMP	<i>bla</i> NDM	<i>bla</i> SPM	<i>bla</i> VIM
ST235	CC235	O:11	ExoU ⁺														
ST111	CC111	O:12 (O:4)	ExoS ⁺														
ST233	CC233	O:6	ExoS ⁺														
ST244	CC244	O:2	ExoS ⁺														
ST357	CC357	O:11	ExoU ⁺														
ST308	CC308	O:11	ExoU ⁺														
ST175	CC175	O:4	ExoS ⁺														
ST277	CC277	O:2	ExoS ⁺														
ST654	CC654	O:11	ExoS ⁺														
ST298	CC446	O:11	ExoU ⁺														

Actualizado en julio de 2023 de del Barrio-Tofiño *et al.*, 2020. Las descripciones novedosas desde 2020 se muestran en rojo.

5.3 Secuenciación del genoma completo (WGS)

La secuenciación masiva (*next-generation sequencing*, NGS) permite analizar de manera eficiente el genoma completo, proporcionando información detallada sobre la presencia de determinantes de resistencia o virulencia, de EGMs o la filogenia bacteriana.

P. aeruginosa tienen un único cromosoma circular y un número variable de plásmidos. Este genoma bacteriano es más grande que el de la mayoría de las bacterias secuenciadas, ya que varía entre 5,5 y 7 Mbp. Posee un pangenoma abierto; es decir, el número de genes del pangenoma aumenta con el número de cepas secuenciadas adicionalmente, y además el genoma accesorio de *P. aeruginosa* es de mayor tamaño que el genoma core (Corredor *et al.*, 2023). El genoma core se refiere al conjunto de genes presentes en todas las cepas de *P. aeruginosa*. Estos genes son esenciales para las funciones básicas y la supervivencia de la bacteria. La identificación del genoma core mediante NGS ha permitido establecer una base genética común, proporcionando información clave sobre la biología fundamental y la evolución de la especie (Corredor *et al.*, 2023) (Figura 35). La divergencia en el tamaño del genoma se debe al genoma accesorio, formado por elementos extra-cromosómicos como plásmidos, ICEs, profagos, transposones, secuencias de inserción e integrones que contribuyen a su adaptabilidad en diferentes entornos. Los elementos del genoma accesorio pueden estar presentes en subgrupos de la población de *P. aeruginosa*, pero también pueden ocurrir solo en cepas individuales (Klockgether *et al.*, 2011; Jurado-Martín *et al.*, 2021; Corredor *et al.*, 2023).

Actualmente, las bases de datos almacenan más de 9000 genomas de *P. aeruginosa*, permitiendo profundizar en los estudios de resistencia a los antibióticos, virulencia, patogenicidad, aptitud y evolución, entre otros (Corredor *et al.*, 2023).

La aplicación de la NGS en *P. aeruginosa* ha transformado la investigación, proporcionando una visión más completa de su genoma y permitiendo avances significativos en la comprensión de su biología, evolución y virulencia.

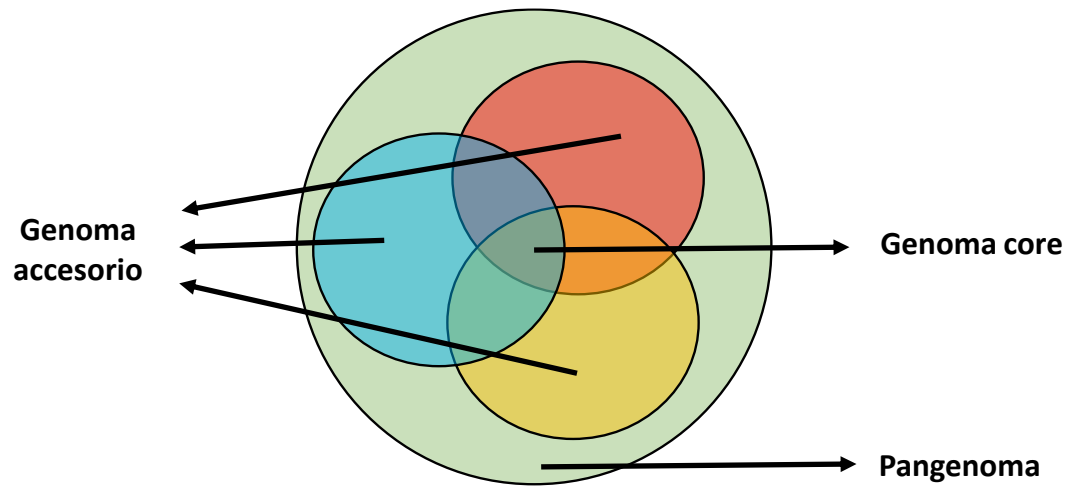


Figura 35: Representación gráfica del pangenoma, genoma core y genoma accesorio.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Caracterizar los factores de virulencia, los parámetros biológicos de patogenicidad, la resistencia a antibióticos y la disseminación clonal de una colección de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras clínicas y no clínicas (individuos sanos, animales, alimentos y ambientales).
2. Estudiar la resistencia a fluoroquinolonas y los mecanismos genéticos implicados en dicha resistencia en una selección de cepas clínicas y no clínicas, incluyendo la detección de *crpP* y el análisis de sus entornos genéticos.
3. Analizar las características biológicas y genómicas de las cepas de *P. aeruginosa* ST274 de diferentes orígenes, para poder comprender los mecanismos que favorecen su éxito.
4. Analizar y comparar las características biológicas y los marcadores moleculares de las cepas de *P. aeruginosa* de los clones de alto riesgo ST175, ST235 y ST973.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cepas de *P. aeruginosa* incluidas en el estudio

Para la realización de este trabajo se seleccionaron 275 cepas de *P. aeruginosa* de la colección del Área de Microbiología Molecular del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR). Las cepas incluidas en el estudio provenían de orígenes clínicos (131) y no clínicos (144), según muestra la Figura 36.



Figura 36: Esquema de procedencia de las cepas del estudio y número de cepas incluidas. El color del cuadrado azul/ magenta, será el que representará las cepas no clínicas / clínicas y el color del interior de cada círculo será el que represente cada origen en todo el estudio.

Los datos de procedencia de cada una de las cepas se detallan en el Anexo 1.

1.1 Cepas de *P. aeruginosa* de origen no clínico

Las cepas de *P. aeruginosa* no clínicas se aislaron, empleando medios selectivos sin suplemento antibiótico, de muestras fecales de individuos y animales sanos, muestras de alimentos vegetales y cárnicos, y muestras ambientales de suelos y ríos de La Rioja. En esta tesis se incluyeron todas las cepas que se recogieron entre 2010 y 2016.

1.1.1 Cepas de individuos sanos

Un total de 51 cepas procedían de individuos sanos de entre 0 y 66 años procedentes de las Comunidades Autónomas de La Rioja y Aragón. Todos los individuos o sus tutores legales dieron su consentimiento para participar en el estudio. Cuarenta y dos cepas procedían de muestras fecales de niños menores de 15 años recogidas en 2014. Estos niños fueron pacientes atendidos en atención primaria en distintos centros de salud de La Rioja y Aragón, por alteraciones como gastroenteritis (no causada por *Pseudomonas*), y alergias alimentarias (Ruiz-Roldán *et al.*, 2018). Por otro lado, también se incluyeron las 9 cepas aisladas en un estudio realizado entre 2010 y 2011 en el que se tomaron muestras fecales de voluntarios sanos que no habían tomado antibiótico en los meses previos al estudio (Estepa *et al.*, 2014).

1.1.2 Cepas de animales sanos

Nueve cepas de *P. aeruginosa* se aislaron de muestras fecales de animales sanos de un trabajo realizado en el periodo de 2013 a 2015 (Ruiz-Roldán *et al.*, 2020), siendo siete cepas procedentes de heces de jabalí (*Sus scrofa*) y 2 de heces de oveja (*Ovis orientalis*). Las muestras fecales de jabalíes se recogieron a partir del procesado de intestino grueso del animal, obtenido tras la muerte del animal en batidas de caza en zonas de Castilla La Mancha y Cádiz. Estas muestras fueron recogidas por veterinarios del Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC-CSIC, Ciudad Real, Castilla La Mancha). Las heces de las ovejas, propiedad de un particular de Galicia, se recogieron en frascos estériles empleando técnicas no-invasivas para los animales.

1.1.3 Cepas de alimentos

Los alimentos de los que se obtuvieron las 42 cepas procedían de supermercados, fruterías o tiendas de barrio y huertos particulares de la Comunidad Autónoma de La Rioja y Aragón. Estas cepas se aislaron en dos estudios previos realizados en el periodo 2011-2012 (Estepa *et al.*, 2015) y en 2016 (Ruiz-Roldán *et al.*, 2021). En concreto, 41 cepas se aislaron de los siguientes vegetales (nº cepas): acelga (11), lechuga (8), judía verde (7), patata (4), calabacín (4), pimiento verde (3), pepino (2), tomate (1) y cebolla (1); y una cepa fue aislada de una muestra de carne de pavo.

1.1.4 Cepas de origen ambiental

Las muestras ambientales procedían de la Comunidad Autónoma de La Rioja, aislándose: 29 cepas de *P. aeruginosa* de 14 muestras superficiales tomadas del río Iregua en noviembre de 2015 (Rojo-Bezares *et al.*, 2024), 11 cepas de agua no clorada de diferentes embalses, pantanos y ríos de toda la red hidrográfica de La Rioja y 2 cepas de muestras de tierra adquiridas en zonas urbanas (Figura 37).

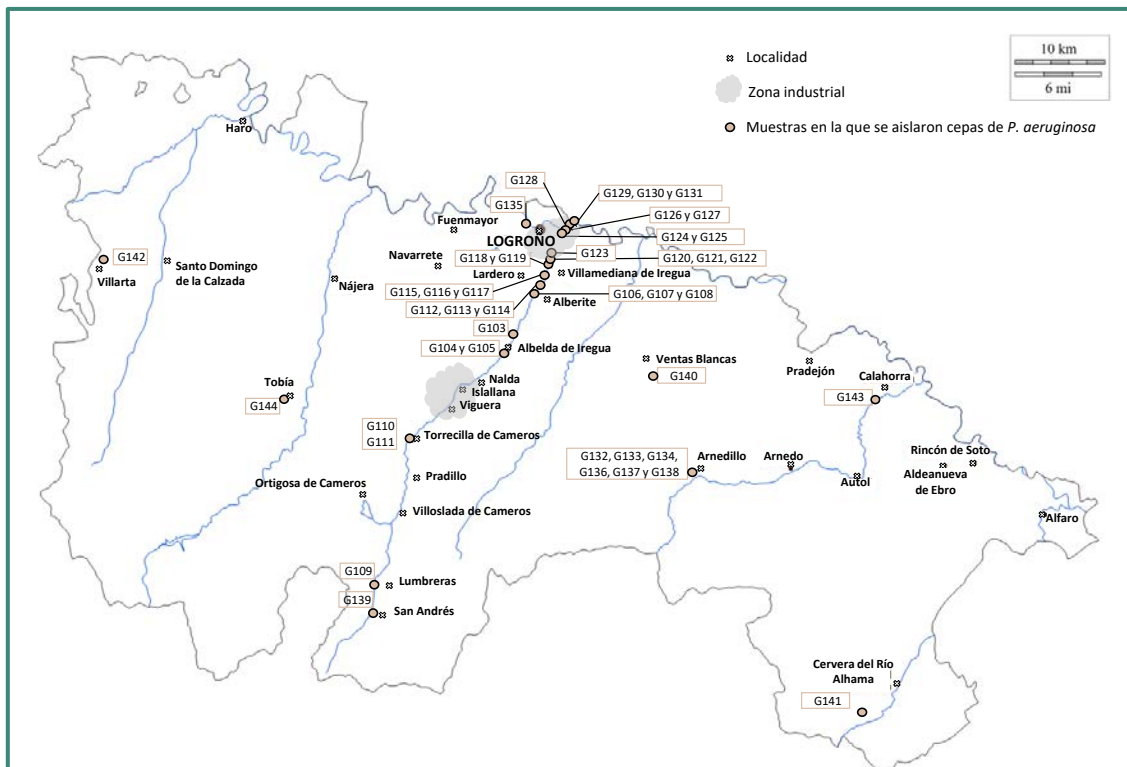


Figura 37: Mapa de La Rioja en el que se representan las localizaciones en las que se recogieron las cepas medioambientales pertenecientes a este trabajo. Las cruces indican las localidades más cercanas a los puntos de muestreo, los puntos marrones la zona de la recogida y la cepa correspondiente, y sombreado en gris las zonas industriales.

1.2 Cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico

Las cepas clínicas incluidas en esta tesis se obtuvieron de pacientes del Hospital Universitario San Pedro (HUSP) de Logroño y del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (HCULB) de Zaragoza. Entre las cepas seleccionadas para el estudio se incluyeron 64 procedentes de muestras respiratorias (36 del HUSP y 28 del HCULB), 51 de hemocultivos, 10 de orina, 5 de exudados quirúrgicos y un absceso intraabdominal de

pacientes del HUSP. En el estudio se incluyeron 63 cepas resistentes a los carbapenémicos y las 68 restantes fueron sensibles (Tabla 5).

Tabla 5: Principales datos de las cepas clínicas incluidas en este trabajo.

Origen	Hospital ^a	Nº cepas	Año del aislamiento	CRPA	Artículo de referencia
Respiratorio	HUSP	36	2013	9	-
	HCULB	28	2013	26	Bellés <i>et al.</i> , 2018
Hemocultivo	HUSP	48	2015-2018	9	-
	HCULB	3	2008 - 2010	3	Rojo-Bezares <i>et al.</i> , 2014
Orina	HCULB	5	2008 - 2010	5	Rojo-Bezares <i>et al.</i> , 2014
	HUSP	1	2007	1	Rojo-Bezares <i>et al.</i> , 2011
	HUSP	4	2015-2016	4	-
Otros ^b	HCULB	5	2008 - 2010	5	Rojo-Bezares <i>et al.</i> , 2014
	HCSP	1	2017	1	-

^aHUSP: Hospital Universitario San Pedro de Logroño, HCULB: Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, CRPA: *P. aeruginosa* resistentes a los carbapenémicos.

^bIncluyen 5 cepas aisladas de exudados quirúrgicos y una de absceso intraabdominal.

1.3 Cepas control de *P. aeruginosa*

La cepa *P. aeruginosa* PAO1 se incluyó como control en los experimentos de producción de biofilm, elastasa y pigmentos. De la misma forma, la secuencia de PAO1 se utilizó como base para los análisis bioinformáticos y las secuencias de las cepas PA7 y PA14, para algunos análisis concretos, como los análisis de relación filogenética. Finalmente, las cepas PAO1, PA7, PA14 y ATCC27853 se utilizaron como control para el análisis de la resistencia a las fluoroquinolonas.

2. Medios de cultivo.

Los medios de cultivo que se emplearon durante esta tesis fueron los siguientes:

- **Brain Heart Infusion (BHI) (Conda):** medio nutritivo para crecimiento bacteriano. Se usó tanto en medio sólido como en caldo.

- **Agar Cetrimida: (Difco™ BD):** medio selectivo para el aislamiento de *Pseudomonas spp.*
- **Müeller-Hinton (MH) (Conda):** medio de cultivo empleado principalmente para test de sensibilidad a antibióticos. Se usó tanto en medio sólido como en caldo.
- **Luria-Bertani (LB) (Sigma-Aldrich):** medio de cultivo con peptona de caseína y extracto de levadura para crecimiento bacteriano. Se usó tanto en medio sólido como en caldo.
- **Leche desnatada deshidratada (Skim Milk) (Difco™ BD):** medio líquido empleado para la conservación de microorganismos a -20°C y -80°C.
- **Medios semisólidos para motilidad:** medio LB líquido con consistencia semisólida con un 0,5% de agar (Bacto™ Agar, BD Company, USA) (swimming) o un 0,3% de agar (swarming).

2.1 Condiciones de cultivo

Todos los medios se prepararon siguiendo las recomendaciones del fabricante. Además, se suplementaron con antibiótico cuando el cultivo así lo requería. La esterilización se llevó a cabo en autoclave (20 min a 120°C y 1 atm de sobrepresión). Los cultivos se realizaron, de manera general, a 37°C durante 24 h.

2.2 Conservación de las cepas

Todas las cepas obtenidas y estudiadas se conservaron en una suspensión bacteriana en leche desnatada estéril al 10% (Difco) y congeladas a -80°C.

3. Determinación de la sensibilidad a antibióticos.

Los estudios de determinación de la sensibilidad antibiótica permiten analizar la capacidad de los diferentes antimicrobianos para inhibir el crecimiento de una población bacteriana. Existen diferentes métodos de análisis de la sensibilidad antibiótica en función del perfil de sensibilidad concreto que se quiere estudiar en cada caso, los que se han utilizado en este trabajo son:

3.1 Antibiograma.

Los estudios de determinación de la sensibilidad a antibióticos mediante el método de disco-placa (método Kirby-Bauer) se realizaron siguiendo la guía de antimicrobianos para *P. aeruginosa* del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018) y utilizando los puntos de corte de la misma para categorizar a la cepa analizada como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R).

El método seguido consistió en preparar una suspensión bacteriana con una turbidez equivalente a un 0,5 McFarland en solución salina estéril al 0,9 %. Mediante un hisopo estéril, se sembró en forma de césped toda la placa de agar MH. Posteriormente, se colocaron los discos de antibiótico comerciales (Oxoid) (Tabla 6) con una separación de unos 2 cm de centro a centro del disco. Siguiendo el esquema de colocación representado en la Figura 38. Las placas se incubaron, a 37°C durante 16-18 h. Pasado ese tiempo, se midieron los diámetros de los halos de inhibición resultantes. La interpretación y clasificación de sensibilidades se realizó según los puntos de corte para *P. aeruginosa* de CLSI (CLSI, 2018).

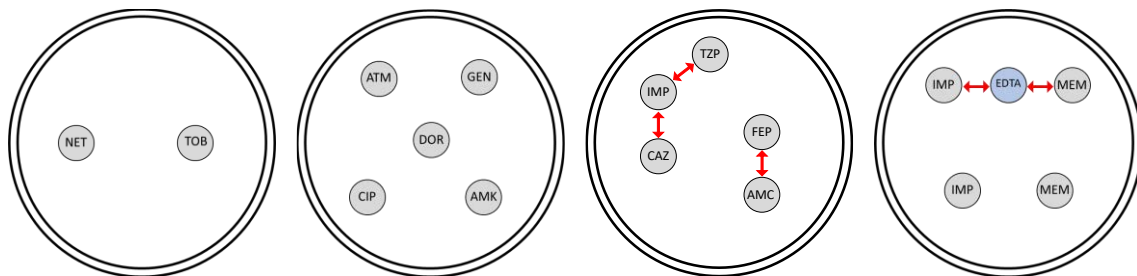


Figura 38: Distribución de los discos de antibiótico en las placas, para la realización de antibiogramas para *P. aeruginosa*. GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; AMK, amikacina; NET, netilmicina; IMP, imipenem; MEM, meropenem; DOR, doripenem; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; CIP, ciprofloxacina; ATM, aztreonam; TZP, piperacilina-tazobactam. Las flechas rojas simbolizan las interacciones a estudiar en la determinación fenotípica de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE), actividad metalo- β -lactamasa (MBL) y AmpC inducible. EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

Tabla 6: Antibióticos utilizados, familia a la que pertenecen, carga de cada disco y puntos de corte utilizados para definir su perfil de resistencia.

Familia	Antibiótico	Abreviatura	Carga por disco	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
				Resistente	Intermedio	Sensible
Aminoglucósidos	Gentamicina	GEN	10µg	≤12	13-14	≥15
	Tobramicina	TOB	10µg	≤12	13-14	≥15
	Amikacina	AMK	30µg	≤14	15-16	≥17
	Netilmicina	NET	30µg	≤12	13-14	≥15
Carbapenémicos	Imipenem	IMP	10µg	≤15	16-18	≥19
	Meropenem	MEM	10µg	≤15	16-18	≥19
	Doripenem	DOR	10µg	≤15	16-18	≥19
Cefalosporinas	Ceftazidima	CAZ	30µg	≤14	15-17	≥18
	Cefepima	FEP	30µg	≤14	15-17	≥18
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	CIP	5 µg	≤15	16-20	≥21
β-lactámicos en combinación inhibidor de β -lactamasas	Piperacilina-Tazobactam	TZP	100/10µg	≤14	15-20	≥21
Monobactámicos	Aztreonam	ATM	30µg	≤15	16-21	≥22

Las cepas de *P. aeruginosa* se clasificaron en multisensibles (multiS), moderadamente resistentes (modR), multirresistentes (MDR), extremadamente resistentes (XDR) o panresistentes (PDR) siguiendo los criterios establecidos por Mulet *et al.*, 2013 y del ECDC (Magiorakos *et al.*, 2012). En esta tesis se definieron las categorías fenotípicas en base a la resistencia a los siguientes agentes antipseudomónicos y categorías antimicrobianas: penicilinas antipseudomónicas+inhibidores de β -lactamasas (piperacilina/tazobactam), cefalosporinas antipseudomónicas (ceftazidima y cefepima), monobactámicos (aztreonam), carbapenémicos antipseudomónicos (imipenem y meropenem), fluoroquinolonas (ciprofloxacina) y aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina, amikacina y netilmicina). Las categorías antimicrobianas de polimixinas (colistina, polimixina B) y ácidos fosfónicos (fosfomicina) incluidas en las recomendaciones del ECDC, no se consideraron para clasificar las cepas.

La categoría **multiS** incluyó las cepas sensibles a todos los antibióticos testados. Se clasificaron como **modR** las cepas con resistencia a uno o más agentes antipseudomónicos de una o dos categorías antimicrobianas; el fenotipo **MDR** se definió como resistencia a uno o más agentes de tres o más categorías antimicrobianas; la categoría **XDR** incluía las cepas resistentes a uno o más agentes de más de cuatro categorías antimicrobianas y el fenotipo **PDR** se definió como la resistencia a todos los agentes en las seis categorías de antibióticos.

Por otro lado, se definió la resistencia difícil de tratar (**DTR- Difficult to Treat Resistance**) según las recomendaciones de IDSA (Kadri *et al.*, 2018) como resistencia a todos los agentes de primera línea (clásicos): combinaciones de penicilinas antipseudomónicas + inhibidores de β -lactamasa (piperacilina/tazobactam), cefalosporinas antipseudomónicas (ceftazidima y cefepima), monobactámicos (aztreonam), carbapenémicos antipseudomónicos (imipenem y meropenem) y fluoroquinolonas (ciprofloxacina).

3.2 Test sinérgico de doble disco

Para la detección de los fenotipos de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE), actividad metalo- β -lactamasa (MBL) y AmpC inducible se utilizó la técnica de sinergia entre discos.

Para la detección de BLEE se utilizaron discos de cefepima (FEP) y amoxicilina-ácido clavulánico (AMC) separados 2 cm de centro a centro del disco. El AMC actúa como inhibidor de β -lactamasas y la deformación del halo de inhibición en el disco de FEP en forma de “tapón de corcho” indica la posible presencia de una enzima BLEE, representación en Figura 39A.

Para la detección de MBL se colocó un disco blanco impregnado con 6 μ L de EDTA (0,5M, pH 8,0) en el centro y un disco de imipenem (IMP) y otro de meropenem (MEM), a cada lado y separados aproximadamente 2 cm. El EDTA, como quelante, capta el Zn^{2+} y las MBL quedan inhibidas, produciéndose de esta manera una deformación en forma de tapón de corcho cercana al disco de EDTA que indica que la cepa de estudio es posiblemente productora de MBL, como se muestra en la Figura 39B.

La presencia de la β -lactamasa tipo AmpC inducible se determinó utilizando los discos de IMP y CAZ colocados a 2 cm de distancia. La formación de un halo en forma de D entorno al antibiótico CAZ indica que la cepa de estudio es portadora de AmpC inducible (Figura 39C).

Para determinar la hiperproducción de bombas de eflujo, se analizaron los halos de ciprofloxacina y meropenem en placas preparadas con y sin 40 μ g/ml del inhibidor Phe-Arg- β -naftilamida (Sigma). Una diferencia superior a 5 mm observada en los halos de las placas con Phe-Arg- β -naftilamida implica un resultado positivo.

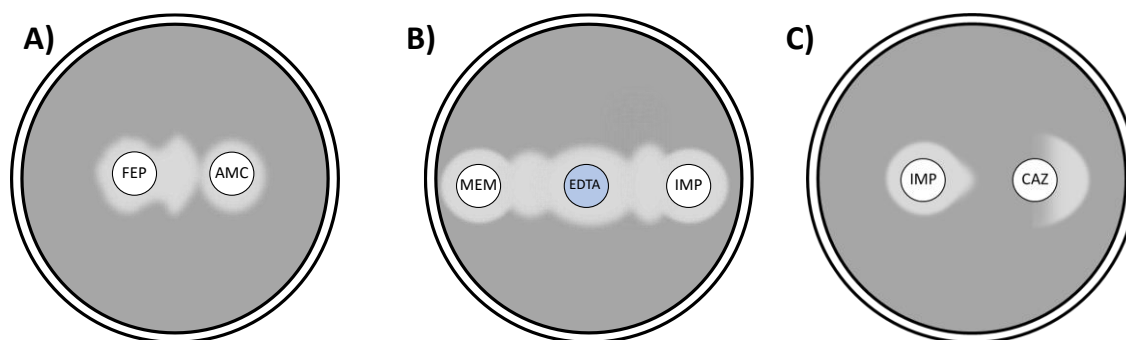


Figura 39: Esquema del test sinérgico de doble disco para la detección de: A) β -lactamasa de espectro extendido (BLEE), B) actividad metalo- β -lactamasa (MBL) y C) AmpC inducible. FEP, cefepima; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico; MEM, meropenem; IMP, imipenem; CAZ, ceftazidima; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

3.3 Dilución en agar

Se define como concentración mínima inhibitoria (CMI) a la mínima concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de una población estándar microbiana. Siguiendo las recomendaciones del CLSI (2020), se determinó la CMI de los antibióticos ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina y ofloxacina mediante la técnica de macrodilución.

Para el desarrollo de esta técnica, se prepararon placas de MH agar con diluciones seriadas 1:2 de cada antibiótico. Se añadieron en cada placa Petri 2 ml de la dilución de antibiótico correspondiente y 18 ml de MH agar atemperado a 50°C, se homogeneizó y se dejó solidificar. Se estudió un rango de concentraciones de 1.024 a 0,0075 µg/mL para los cuatro antibióticos. Se prepararon, asimismo, dos placas de MH agar sin antibiótico (inicial y final) que se utilizaron como control (Tabla 7).

Tabla 7: Antibióticos utilizados en los análisis de concentración mínima inhibitoria.

Antibiótico	Puntos de corte de CMI* (µg/mL)		
	S	I	R
Ciprofloxacina	≤ 0,5	1	≥2
Levofloxacina	≤ 1	2	≥4
Norfloxacina	≤ 4	8	≥16
Ofloxacina	≤ 2	4	≥8

* S: sensible, I: intermedio, R: resistente.

Para la siembra de las placas, se preparó un inóculo bacteriano en solución salina estéril hasta alcanzar una turbidez equivalente a 0,5 McFarland y se realizó una dilución 1/10. Mediante un replicador de Steers (Figura 40) se sembraron los inóculos equivalentes a 10⁴ UFC/gota de 32 cepas diferentes al mismo tiempo en una misma placa. Se incluyeron las placas control (MH agar sin antibiótico) al comienzo y al final de la replicación, así como las cepas de referencia *P. aeruginosa* ATCC27853, PAO1, PA7 y PA14.

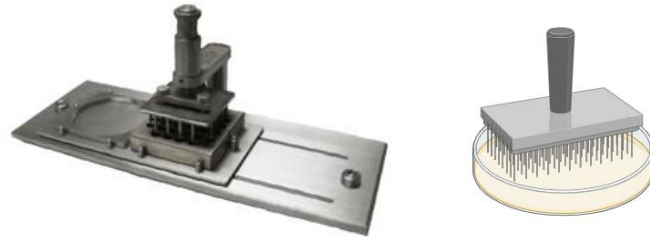


Figura 40. Replicador de Steers y esquema del mecanismo de siembra en placa.

Las placas se incubaron a 37°C durante 16-20 h (Figura 41). Se determinó la CMI de cada antibiótico y basado en los puntos de corte recomendados por el CLSI (2020), se pudo determinar la resistencia o sensibilidad de nuestras cepas a los antibióticos testados.

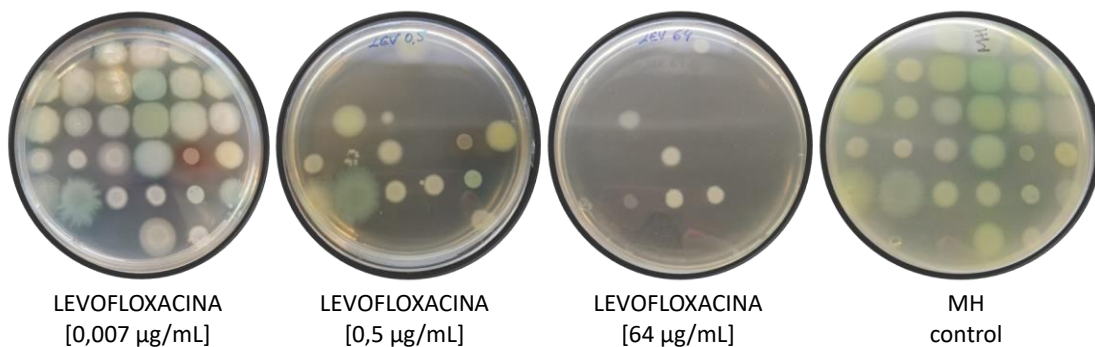


Figura 41: Ejemplo de crecimiento de las placas a diferentes concentraciones de antibiótico.

4. Extracción y cuantificación del DNA

4.1 Protocolo con resina InstaGene Matrix (BioRad)

Para realizar la extracción de DNA de las cepas de *P. aeruginosa* se usó la resina InstaGene™ Matrix (BioRad). La matriz del kit absorbe los productos de la lisis celular que podrían interferir en la PCR. El protocolo llevado a cabo fue el siguiente:

1. A partir de un cultivo bacteriano puro, de una siembra en masa en agar BHI, se resuspendieron unas colonias en 1 mL de agua miliQ, en un tubo eppendorf.
2. Se centrifugó 2 min a 12.000 rpm.

3. Se eliminó el sobrenadante, y se resuspendió el precipitado con 200 μL de resina.
4. Se incubó a 56°C durante 20 min.
5. Se vorteoó 10 s y se dejó en el termobloque a 100°C durante 8 min.
6. Se volvió a vortear 10 s y se centrifugó 5 min a 14.000 rpm.
7. Se recogió el sobrenadante en un tubo limpio y se almacenó a 4°C para su posterior uso.

Tras la extracción, se midió la concentración y calidad del DNA extraído mediante el espectrofotómetro Nanodrop® ND-100. La concentración óptima de DNA de *P. aeruginosa* para realizar una correcta PCR, se determinó entre 300-600 ng/ μL . En el caso de que se extrajera mayor concentración de DNA, se procedió a hacer una dilución de la muestra con agua miliQ. Por otro lado, la pureza del DNA se observó gracias a la relación de la absorbancia a 260/280 nm. Una muestra de DNA puro tendría un coeficiente entre 1,8 y 2,0. Un coeficiente inferior a 1,8 indica una contaminación por proteínas. Por el contrario, un coeficiente superior a 2,0 indica una cantidad importante de RNA en la muestra.

4.2 Extracción de DNA genómico.

La extracción de DNA genómico para los experimentos de secuenciación de genoma completo de las cepas seleccionadas se llevó a cabo mediante el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega).

1. Se partió de una colonia bacteriana, se sembró en tubos de 3 mL de caldo LB, y se incubaron durante 24 h a 37°C en agitación a 120 rpm.
2. Se trasvasó 1 mL del cultivo anterior a un eppendorf, y se centrifugó a 13.000 g durante 2 min, eliminando posteriormente el sobrenadante.
3. Se añadieron 600 μL de la solución Nucleic Acid Solution, mezclando mediante pipeteo para homogeneizar el pellet.
4. Se incubó a 80°C durante 5 min para lisar las células bacterianas y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
5. Se añadieron 3 μL de solución RNasa, y se mezcló invirtiendo entre 2-5 veces el tubo eppendorf.

6. Se incubaron a 37°C durante 15-60 min y posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente.
7. Se añadieron 200 µL de Protein Precipitation Solution y se vorteoó vigorosamente durante 20 s.
8. Se dejó incubar el tubo en hielo durante 5 min; luego se centrifugó a 13.000 g durante 3 min.
9. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1,5 mL, y se añadieron 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente.
10. El tubo se mezcló por inversión y se centrifugó a 13.000 g durante 2 min.
11. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el tubo.
12. Se añadieron 600 µL de etanol 70% y se mezcló el tubo mediante inversión para limpiar el pellet.
13. Se centrifugó a 13.000 g durante 2 min y se aspiró el etanol cuidadosamente.
14. Se dejó secar el tubo durante 10-15 min.
15. Se añadieron 100 µL de agua miliQ estéril libre de DNAsas, y se dejó incubar a 65°C durante 1 h. Periódicamente, se mezclaba la solución mediante inversión.
16. Se guardó el DNA a -20°C.

Para el análisis de la calidad del DNA genómico obtenido, se observaron los productos mediante la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa. Asimismo, la cuantificación del DNA genómico se realizó mediante el fluorímetro Qubit (ThermoFisher) y su calidad se determinó usando el Fragment Analyzer (Agilent).

5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR convencional se empleó en esta tesis para la amplificación de distintos genes: genes *housekeeping* para la tipificación molecular por MLST (punto 9.3) y genes de virulencia.

En todos los ensayos de PCR se empleó un control positivo para dar validez a los resultados y un control negativo, con todos los componentes excepto el DNA, reemplazado por el volumen correspondiente de agua miliQ estéril. Para la realización

de la técnica de PCR se utilizaron los termocicladores T3 Thermocycler (Biometra®) y Tpersonal (Biometra®).

De manera general, la mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 50 µl, utilizando los componentes indicados en la Tabla 8.

Tabla 8. Componentes empleados en la PCR

Componentes de PCR (Bioline)	Concentración inicial	Volumen por tubo	Concentración final
NH ₄ ⁺ buffer	10X	5µL	1X
MgCl ₂	50mM	1,5µL	1,5mM
Mezcla dNTP	10mM	1µL	0,2mM
Cebador <i>Forward</i>	25µM	1µL	0,5µM
Cebador <i>Reverse</i>	25µM	1µL	0,5µM
BioTaq DNA Polymerase	5U/µL	0,3µL*	1,5U
Agua miliQ		30,2µL	
DNA	300-600 ng/µL	10µL	
Total		50µL	

*En aquellos casos en los que el fragmento esperado tuviese un tamaño superior a 1.500 pb, se empleó 0,5 µL de Taq polimerasa.

Las secuencias de los cebadores utilizados para los estudios de virulencia, las condiciones de amplificación y los tamaños de los fragmentos de DNA amplificados se describen a continuación.

5.1 PCR para los estudios de virulencia

La presencia de genes involucrados en virulencia y *quorum sensing* de *P. aeruginosa* se estudió mediante una PCR simple convencional tal y como se ha descrito anteriormente. En la siguiente tabla (Tabla 9) se resumen los cebadores y condiciones utilizadas.

Tabla 9. Secuencias nucleotídicas de los cebadores, programa y referencias para la amplificación de genes de virulencia.

Gen	Tamaño del amplicón	Cebadores 5' → 3'	Programa	Referencia
<i>exoU</i>	(2000 pb)	F: ATGCATATCCAATCGTTG R: TCATGTGAACTCCTTATT	94°C 3min 1 ciclo	Petit <i>et al.</i> , 2013
			94°C 30s 55°C 30s 40 ciclos 72°C 2min	
<i>exoS</i>	(118 pb)	F: GCGAGGTCAGCAGAGTATCG R: TTCGGCGTCACTGTGGAT	72°C 5min 1 ciclo	Ajayi <i>et al.</i> , 2003
			94°C 3min 1 ciclo	
<i>exoY</i>	(289 pb)	F: CGGATTCTATGGCAGGGAGG R: GCCCTTGATGCACTCGACCA	94°C 30s 60°C 30s 30 ciclos 72°C 2min	Ajayi <i>et al.</i> , 2003
			72°C 5min 1 ciclo	
<i>exoT</i>	(152 pb)	F: AATCGCCGTCCAACATGCATGCG R: TGTTGCGCCGAGGTACTGCTC	94°C 3min 1 ciclo	Ajayi <i>et al.</i> , 2003
			94°C 30s 60°C 30s 30 ciclos 72°C 2min	
<i>exoA</i>	(396 pb)	F:GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC R:CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT	72°C 5min 1 ciclo	Khan & Cerniglia, 1994
			94°C 3min 1 ciclo	
<i>lasA</i>	(514 pb)	F: CGCCATCCAACCTGATGCAAT R: AGGCCGGGGTTGTACAACGGA	94°C 30s 60°C 30s 30 ciclos 72°C 2min	Lomholt <i>et al.</i> , 2001
			72°C 5min 1 ciclo	
<i>lasB</i>	(153 pb)	F: TTCTACCCGAAGGACTGATAC R: AACACCCATGATCGCAAC	94°C 3min 1 ciclo	Zhu <i>et al.</i> , 2004
			94°C 30s 55°C 30s 40 ciclos 72°C 2min	
<i>aprA</i>	(140 pb)	F: ACCCTGTCCTATTCGTTCC R: GATTGCAGCGACAACCTGG	72°C 5min 1 ciclo	Zhu <i>et al.</i> , 2004
			94°C 3min 1 ciclo	
			94°C 30s 55°C 30s 40 ciclos 72°C 2min	
			72°C 5min 1 ciclo	

Tabla 9. Secuencias nucleotídicas de los cebadores, programa y referencias para la amplificación de genes de virulencia. (Continuación)

Gen	Tamaño del amplicón	Cebadores 5' → 3'	Programa	Referencia
<i>rhlAB</i>	(151 pb)	F: TCATGGAATTGTCACAACCGC R: ATACGGCAAAATCATGGCAAC	94°C 3min 1 ciclo	<i>Lomholt et al., 2001</i>
			94°C 30s 60°C 30s 30 ciclos 72°C 2min	
<i>rhlI</i>	(625 pb)	F: CTTGGTCATGATCGAATTGCTC R: ACGGCTGACGACCTCACAC	72°C 5min 1 ciclo	<i>Schaber et al., 2004</i>
			94°C 3min 1 ciclo 94°C 30s 60°C 30s 30 ciclos 72°C 2min	
<i>rhlR</i>	(730 pb)	F: CAATGAGGAATGACGGAGGC R: GCTTCAGATGAGGCCAGC	72°C 5min 1 ciclo	<i>Schaber et al., 2004</i>
			94°C 3min 1 ciclo 94°C 30s 60°C 30s 30 ciclos 72°C 2min	
<i>lasI</i>	(650 pb)	F: ATGATCGTACAAATTGGTCGGC R: GTCATGAAACCGCCAGTCG	72°C 5min 1 ciclo	<i>Schaber et al., 2004</i>
			94°C 3min 1 ciclo 94°C 30s 60°C 30s 30 ciclos 72°C 2min	
<i>lasR</i>	(1100 pb)	F: CGGGTATCGTACTAGGTGCATCA R: GACGGGAAAGCCAGGAACTT	72°C 5min 1 ciclo	<i>Schaber et al., 2004</i>
			94°C 3min 1 ciclo 94°C 30s 60°C 30s 30 ciclos 72°C 2min	
<i>exlA*</i>	1218bp	F: TCACCTGGGAAACCTACGAC R: GGCCGCCGGTATAGTAGAAG	95°C 3min 1 ciclo	Diseño propio
			95°C 30s 60°C 30s 30 ciclos 72°C 1min	
			72°C 2min 1 ciclo	

*Se realizó con la enzima KAPPA (Hot Start)

6. Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización de los amplicones obtenidos por PCR convencional, se usó la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa.

Para la preparación del gel se utilizaron concentraciones de agarosa (Agarose D1 Low EEO, Conda) en el rango de 0,8 – 2 % (según el tamaño de amplicón) en tampón TBE 1X (dilución en agua destilada de tampón TBE 5X). El tampón TBE 5X se preparó con las siguientes cantidades: 54 g/L tris(hidroximetil)aminometano (BioRad), 27,5 g/L ácido bórico (PanReac Applichem) y 20 mL EDTA 0,5 M pH 8 (PanReac), en un volumen final de 1 L con agua estilada.

Tras sumergir el gel en una cubeta de electroforesis (BioRad) con tampón TBE 1X, se cargó el primer pocillo del gel con 2 µl del marcador de tamaño molecular, 100bp DNA ladder o 1Kb DNA ladder (Nippon Genetics EUROPE GmbH), según el tamaño de amplicón esperado. Se cargaron 10 µL de producto de PCR mezclados con 2 µL de tampón de carga [4 g sacarosa (Panreac), 0,025 g azul de bromofenol (Panreac), 0,025 g xilenocianol (Sigma) en 10 mL de agua destilada] en cada uno de los pocillos siguientes, y los controles siguiendo el mismo procedimiento. Se dejó que el gel migrara a 140 V durante 40-50 min.

El gel se tiñó por inmersión en una disolución acuosa de bromuro de etidio (1 µg/m)(BioRad) durante 30-40 min. Se visualizó el gel con un transiluminador ultravioleta y se capturó la imagen con el Chemi Doc system (BioRad), empleando el software Image Lab software version 5.2.1 (BioRad).

7. Secuenciación

7.1 Secuenciación Sanger

La secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR se llevó a cabo en aquellos casos en los que no se disponía de una cepa control positiva, para la detección de mutaciones y en el estudio de MLST. Los amplicones procedentes de la PCR fueron secuenciados en ambas direcciones por el servicio de secuenciación del Centro de

Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR) usando el secuenciador Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems). En general se utilizaron los mismos cebadores con los que se hizo la PCR, aunque también se diseñaron cebadores específicos. En aquellos casos en los que el amplicón era demasiado grande, la secuenciación se realizó con los cebadores empleados en la PCR (cebadores exteriores) y posteriormente se diseñaron cebadores internos para secuenciar completamente el fragmento de DNA amplificado.

7.1.1 Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas se analizaron empleando el programa Chromas (Chromas 1.51, Australia). Se utilizaron, además, herramientas informáticas para el tratamiento de las secuencias (<http://biomodel.uah.es/en/lab/cybertory/analysis/massager.htm>).

El amplicón de los genes estudiados se determinó alineando las secuencias obtenidas usando la herramienta Clustal Omega de la web del European Molecular Biology Laboratory (EMBL) del European Bioinformatics Institute (EBI) (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>) y se compararon con las incluidas en la base de datos GenBank con la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para la traducción de la secuencia de DNA a aminoácidos se utilizó el programa EMBOSS Transeq del EBI (https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/st/emboss_transeq).

En el análisis de MLST de *P. aeruginosa* se introdujeron las secuencias obtenidas en la base de datos PubMLST (<https://pubmlst.org/organisms/pseudomonas-aeruginosa>) para determinar la secuencia tipo (ST) en las cepas estudiadas.

7.2 Secuenciación de genoma completo (WGS)

A partir de la extracción de DNA genómico obtenido en el apartado 4.2, se procedió a la secuenciación del genoma completo de las cepas seleccionadas. La preparación de la librería genómica y la secuenciación se llevaron a cabo en la Plataforma de Genómica y Bioinformática del CIBIR. Las librerías de DNA se prepararon

siguiendo el protocolo del kit TruSeq DNA PCR Free (Illumina), la calidad final de las librerías se evaluó con Fragment Analyzer (Std. Sens. NGS Fragment Analysis kit 1–6000 bp, AATI) y se cuantificaron mediante qPCR. Posteriormente se realizó la secuenciación en un secuenciador Illumina HiSeq 1500 (Illumina).

8. Análisis bioinformático

Una vez secuenciados los genomas de las *P. aeruginosa* se llevaron a cabo diferentes análisis bioinformáticos en función del objetivo (Figura 42).

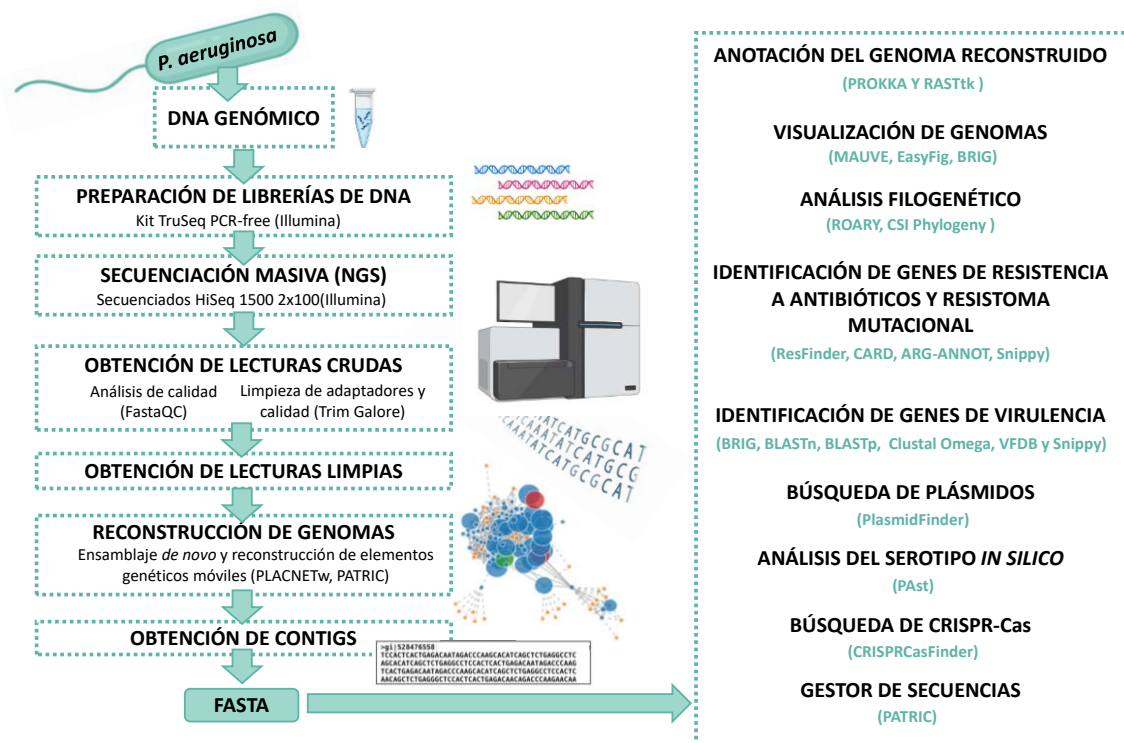


Figura 42: Procedimientos llevados a cabo una vez extraído el DNA genómico y aplicaciones utilizadas para los diferentes análisis bioinformáticos realizados.

8.1 Ensamblaje y anotación

El ensamblaje de las secuencias pertenecientes al clon ST274 se llevó a cabo mediante PLACNETw (<https://castillo.dicom.unican.es/upload/>) (Vielva *et al.*, 2017) identificando y reconstruyendo los posibles elementos móviles de nuestras cepas de *P. aeruginosa*. Estos genomas fueron posteriormente anotados con Prokka (v1.13) (Seeman, 2014). El resto de las cepas secuenciadas se ensamblaron mediante la

plataforma PATRIC (Wattam *et al.*, 2018) y se utilizó la herramienta RASTtk de la misma plataforma para la anotación de las secuencias.

Una vez obtenidos los archivos .fasta y .gbk, éstos se utilizaron en distintas aplicaciones, servicios y plataformas informáticas para llevar a cabo diferentes análisis bioinformáticos.

En alguno de los casos se tuvo que anotar a mano ciertos entornos genéticos de interés, para lo que se comprobó la homología mediante la herramienta BLASTn y BLASTp (NCBI) y se utilizó el programa Artemis (Carver *et al.*, 2012) para la anotación manual de las secuencias.

8.2 Visualización y comparación de genomas bacterianos

Para la comparación de diferentes genomas bacterianos se utilizaron programas que permiten el alineamiento y la visualización en paralelo de varios genomas:

- **MAUVE**: para la visualización y comparación de genomas completos de diferentes cepas (Darling *et al.*, 2004).
- **EasyFig**: utilizado para la visualización y comparación de regiones específicas del genoma. Este programa utiliza BLAST para realizar las comparaciones múltiples entre regiones, indicando con diferente intensidad de colores la similitud entre las secuencias comparadas (Sullivan *et al.* 2011).
- **BRIG** (BLAST Ring Image Generator) permite comparar varios genomas o secuencias mediante la representación de un anillo de homología, indicando con diferentes colores de intensidad la similitud respecto a la referencia (Alikhan *et al.*, 2011).
- **Snippy**: se utilizó para determinar las variaciones nucleotídicas en diferentes genes del genoma respecto de una bacteria de referencia (*P. aeruginosa* PAO1, PA14 o PA7) (Seemann, 2015).

8.3 Análisis filogenético

Se estudió la relación filogenética, mediante el análisis del genoma core y/o accesorio, de cepas *P. aeruginosa* pertenecientes al clon ST274 utilizando el programa

Roary (Page *et al.*, 2015) con los parámetros de similitud y cobertura mayores de 90% (Lanza *et al.*, 2014).

Para los análisis filogenéticos del resto de estudios se utilizó la herramienta CSI Phylogeny 1.4 (Kaas *et al.*, 2014) del servicio del *Center for Genomic Epidemiology* del *Technical University of Denmark* (DTU) (<http://www.genomicepidemiology.org/>)

Con los resultados obtenidos se construyeron árboles filogenéticos utilizando las herramientas IQ-Tree 1.6.12 (Chernomor *et al.*, 2016) e iTol V5.6.3 (Letunic & Bork, 2021).

8.4 Identificación de genes de resistencia a antibióticos.

Resistoma mutacional

La presencia de determinantes de resistencia se evaluó usando diferentes bases de datos:

- ResFinder V3.2 (Zankari *et al.*, 2012) del servicio del *Center for Genomic Epidemiology* del DTU (<http://www.genomicepidemiology.org/>).
- Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) (<https://card.mcmaster.ca/>) (Alcock *et al.*, 2020).
- Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation (ARG-ANNOT) (<https://www.mediterranee-infection.com/acces-ressources/base-de-donnees/arg-annot-2/>) (Gupta *et al.*, 2014).

Además, el resistoma mutacional se determinó analizando la presencia de mutaciones en un panel de 170 genes implicados en la resistencia antimicrobiana descargados de la base de datos del genoma de *Pseudomonas* (www.pseudomonas.com Winsor *et al.*, 2016) (Anexo 2). La comparación se realizó respecto a la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1, utilizando la misma base de datos. Para ello, se utilizaron las herramientas: BLASTn, BLASTp, Clustal Omega y Snippy V4.5.0 ya descritas.

8.5 Identificación de genes de virulencia

Para la identificación de los genes de virulencia se utilizó la base de datos Virulence Factor DataBase (VFDB) (Liu *et al.*, 2019)

(<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) que incluye 250 genes de virulencia para *P. aeruginosa* (Anexo 2). Además, se estudió la presencia de mutaciones en estos genes utilizando las herramientas BRIG, BLASTn, BLASTp, Clustal Omega y Snippy V4.5.0 ya descritas.

8.6 Búsqueda de plásmidos

La aplicación PlasmidFinder 1.3 (Carattoli *et al.*, 2014), del servicio del *Center for Genomic Epidemiology* del *Technical University of Denmark* (DTU) (<http://www.genomicepidemiology.org/>) se utilizó para determinar la presencia de plásmidos en las cepas de *P. aeruginosa* secuenciadas por NGS.

8.7 Análisis del serotipo *in silico*

Mediante la aplicación *Pseudomonas aeruginosa* serotyper (PAst 1.0) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PAst/>) (Thrane *et al.*, 2016) del servicio del *Center for Genomic Epidemiology* del *Technical University of Denmark* (DTU) se identificaron *in silico* los serotipos genéticos que presentaban cada una de las cepas de *P. aeruginosa* secuenciadas.

8.8 Búsqueda de CRISPR-Cas

El sistema CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*)-Cas (*CRISPR-associated protein*) fue detectado mediante CRISPRCasFinder (CRISPR-Cas++ 1.1.2) (Couvin *et al.*, 2018), utilizando una evidencia ≥ 4 .

8.9 Comparación estructural de proteínas

La estructura de las proteínas se simuló mediante SWISS-MODEL, (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) del servicio *Biozentrum of the University of Basel*, utilizando siempre el modelo con mayor puntuación (Waterhouse *et al.*, 2018).

El programa RasMol se utilizó para visualizar la estructura tridimensional de las proteínas de interés a partir de la secuencia de aminoácidos obtenida (Herbert, 2009).

9. Tipificación molecular

El tipado de las 275 cepas de *P. aeruginosa* de este estudio se realizó mediante las técnicas de serotipado PFGE y MLST

9.1 Serotipo

El estudio del serotipo se realizó con una colección de 16 antisueros monovalentes para *P. aeruginosa* (BioRad). La técnica consiste en analizar la reacción de aglutinación de las cepas de estudio frente a estos 16 antisueros monovalentes, siguiendo el esquema International Antigenic Typing System (IATS).

Para llevar a cabo esta técnica se partió de un cultivo puro fresco de cada una de las cepas de *P. aeruginosa* en agar BHI. En primer lugar, se determinó la capacidad autoaglutinante de la cepa mediante suspensión de la colonia bacteriana en una gota de solución salina estéril. Las cepas no autoaglutinantes, fueron testadas con todos los distintos antisueros monovalentes. Para ello se añadió una gota de cada uno, por separado, y se mezcló homogéneamente con la colonia. Se consideró resultado positivo cuando se observó aglutinación y negativo cuando no había agregados. Por último, se consideró que una cepa poliaglutinaba cuando se observaron agregados con más de un antisuero estudiado (Figura 43).

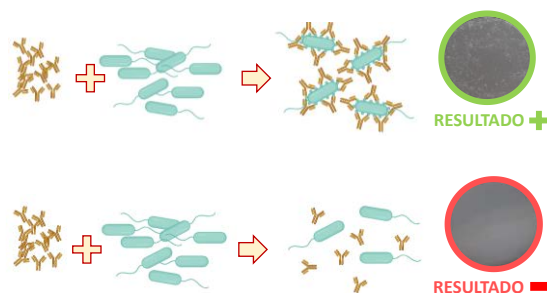


Figura 43. Esquema del análisis del serotipo. En la parte superior, modelo positivo de aglutinación y en la inferior imagen de resultado negativo.

9.2 PFGE

Para conocer la relación clonal entre las cepas de *P. aeruginosa* del estudio, se utilizó la técnica de PFGE, con el protocolo propuesto en el artículo de Rojo-Bezares *et al.*, 2011 y los siguientes pasos:

9.2.1 Preparación de insertos

A partir de un cultivo bacteriano puro de 24 h en placa de agar BHI se inocularon 3-4 colonias en 3 mL de BHI líquido, y se incubaron a 37°C toda la noche (16 h) con agitación. Se centrifugó 1 mL de este cultivo a 13.000 rpm durante 2 min (repetiendo la centrifugación en caso de que fuera necesario). Posteriormente, se eliminó el sobrenadante. Este precipitado se resuspendió con 1 mL de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8), y se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió de nuevo en 1 mL de buffer TE.

Por otro lado, se preparó agarosa (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad) al 1,5% en buffer TE y se mantuvo a 56°C. Se mezclaron 0,5 mL de la suspensión bacteriana con 0,5 mL de agarosa y se distribuyó en los moldes, preparando 3 insertos por aislado. Se dejó solidificar unos minutos a 4°C.

9.2.2 Lisis de insertos

Se pasaron los 3 insertos solidificados a un tubo de 15 mL (un tubo por cepa), y se añadieron 3 mL de buffer de lisis (50 mM Tris; 50 mM EDTA; 1% N-laurilsarcosil (Sigma); 2 mg/mL proteinasa K (Sigma), pH 8) a cada tubo y se dejaron incubar durante 6 h en un baño de agua con agitación a 56°C. Después de ese tiempo, se eliminó el buffer de lisis y se preparó otro buffer de lisis con una concentración de proteinasa K de 0,1 mg/mL, que se dejó en agitación a 56°C durante toda la noche.

9.2.3 Lavado de insertos

Tras la incubación a 56°C toda la noche se eliminó completamente el buffer de lisis y se realizaron los siguientes lavados: 1) lavado con 10 mL de agua destilada autoclavada, durante 10 min a 56°C en agitación; 2) tres lavados con 10 mL de TE/tiourea durante 30 min a 56°C en agitación, y 3) lavado con 10 mL de TE/tiourea durante 30 min, a temperatura ambiente. Después del último lavado, se cambió el buffer TE/tiourea y se guardaron los insertos a 4°C hasta su posterior utilización.

9.2.4 Digestión enzimática de los insertos

Para llevar a cabo la digestión enzimática, se usó medio inserto para cada aislado a analizar y 100 μL de solución de digestión con la enzima de restricción *SpeI* (Takara-Clontech): 1 μL *SpeI* (20U/ μl), 10 μL de buffer (10X) y 89 μL de agua destilada autoclavada. Se dejaron incubar a 37°C durante 6 h.

9.2.5 Preparación del gel de agarosa

Se disolvió agarosa (Agarosa D5, Pronadisa) al 1% en TBE 0,5X, se vertió sobre el molde del gel, con el peine de pocillos previamente colocado, y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el peine y se introdujeron los insertos digeridos en los pocillos, dejando el primero y el último de éstos para el marcador de tamaño molecular (Lambda Ladder PFG Marker, New England BioLabs). Finalmente, se sellaron los pocillos cubriendo con agarosa de la misma concentración atemperada a 50°C.

9.2.6 Electroforesis

La electroforesis se realizó en una cubeta de electroforesis CHEF-DR II (BioRad) con 2 L de TBE 0,5X suplementado con tiourea 75 μM , para evitar la degradación del DNA. La electroforesis se realizó con las siguientes condiciones: una rampa lineal pulsada de 5 a 15 seg durante 10 h; seguida de una rampa lineal pulsada de 15 a 45 seg durante 10 h, ambas rampas con un ángulo de 120°, gradiente de voltaje de 6V/cm y temperatura de 14°C.

9.2.7 Tinción del gel y visualización

Se tiñó el gel por inmersión durante 30 min en una disolución acuosa de bromuro de etidio (BioRad) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se visualizó el gel en un transiluminador ultravioleta y se fotografió con un captador de imágenes Chemi Doc system (BioRad), empleando el software Image Lab software v5.2.1 (BioRad). Posteriormente se destiñó el gel con agua destilada.

9.2.8 Análisis de los patrones de PFGE

Se realizó un análisis informático de los geles mediante el software GelJ v2 (Heras *et al.*, 2015), usando el coeficiente Dice, la clasificación por método UPGMA y el coeficiente de similitud que proporciona dicho software. Se consideraron patrones indistinguibles cuando presentaron >90% de similitud y estrechamente relacionadas si era >80%.

9.3 MLST

La tipificación molecular mediante la técnica de MLST se basa en el estudio de las secuencias nucleotídicas de 7 genes *housekeeping*, que codifican fragmentos estables dentro de cada género bacteriano. La combinación numérica de estos siete alelos determina lo que se denomina Secuencia Tipo (ST). En el caso de *P. aeruginosa*, los genes y las proteínas que codifican estos 7 genes son:

- *acsA* (Acetilcoenzima A sintetasa)
- *aroE* (Shikimate deshidrogenasa)
- *guaA* (GMP sintasa)
- *mutL* (Proteína reparadora de DNA *mismatch*)
- *nuoD* (NADH deshidrogenasa I, cadena C y D)
- *ppsA* (Fosfoenolpiruvato sintasa)
- *trpE* (Componente I de antralita sintetasa)

Para ello, se partió de los estudios realizados por Curran *et al.* (2004), que diseñaron y optimizaron una serie de cebadores para amplificar el DNA mediante PCR, y unos cebadores alternativos para posteriormente secuenciar. En la Tabla 10 y 11 se describen las secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados, tanto para la PCR como para secuenciación, el tamaño de amplicón y la temperatura de hibridación.

Tabla 10. Secuencia nucleotídica, tamaño de amplicón y temperatura de hibridación de los 7 genes *housekeeping* usados para la técnica de PCR.

Gen	Cebadores (5'→3')	Tamaño amplicón	Temperatura hibridación
<i>acsA</i>	F: ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC R: GACATAGATGCCCTGCCCTTGAT	842pb	54°C
<i>aroE</i>	F: TGGGGCTATGACTGGAAACC R: TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA	1053pb	55°C
<i>guaA</i>	F: CGGCCTCGACGTGTGGATGA R: GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA	940pb	56°C
<i>mutL</i>	F: CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG R: CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC	940pb	58°C
<i>nuoD</i>	F: ACCGCCACCCGTAAGT R: TCTCGCCCATCTTGACCA	1042pb	55°C
<i>ppsA</i>	F: GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG R: GGGTTCTTCTTCCGGCTCGTAG	989pb	56°C
<i>trpE</i>	F: GCGGCCAGGGTCGTGAG R: CCCGGCGCTTGTGATGGTT	811pb	56°C

Tabla 11. Secuencia nucleotídica y tamaño de amplicón de los 7 genes *housekeeping* usados para la secuenciación de los mismos.

Gen	Cebadores (5'→3')	Tamaño amplicón
<i>acsA</i>	F: GCCACACCTACATCGTCTAT R: AGTTGCCGAGGTTGTCCAC	390pb
<i>aroE</i>	F: ATGTCACCGTGCCGTTCAAG R: TGAAGGCAGTCGGTTCCTTG	495pb
<i>guaA</i>	F: AGGTCGGTTCCTCAAGGTC R: GACGTTGTGGTGC GACTTGA	372pb
<i>mutL</i>	F: AGAAGACCGAGTTCGACCAT R: GGTGCCATAGAGGAAGTCAT	441pb
<i>nuoD</i>	F: ACGGCGAGAACGAGGACTAC R: TGGCGGTGGTGAAGGTGAA	366pb
<i>ppsA</i>	F: GGTGACGACGGCAAGCTGTA R: GTATCGCCTTCGGCACAGGA	369pb
<i>trpE</i>	F: TTCAACTTCGGCGACTTCCA R: GGTGTCCATGTTGCCGTTCC	441pb

El programa de PCR utilizado fue: desnaturalización inicial a 95°C 3 min; 30 ciclos de desnaturalización 95°C 1 min, hibridación a T^h hibridación (Tabla 10) 1 min y elongación a 72°C 1 min; elongación final a 72°C 10 min. En el caso del gen *nuoD* se emplearon 35 ciclos de amplificación.

Para llevar a cabo la amplificación por PCR, cada gen necesitó unas condiciones distintas, con una polimerasa concreta, y unos volúmenes distintos (Tabla 12). Se requería una concentración baja de DNA (rango de 30 – 60 ng/μL).

Tabla 12: Condiciones y polimerasas empleadas para la PCR de los genes *housekeeping* para la determinación del MLST

Componentes PCR	Genes <i>housekeeping</i> y enzima polimerasa empleada (Distribuidor)		
	<i>acsA, guaA, nuoD, ppsA, trpE</i>	<i>mutL</i>	<i>aroE</i>
Buffer de reacción ^a	5 μL	5 μL	5 μL
MgCl ₂	1,5 μL	1,5 μL	1,5 μL
dNTPs (10 mM)	1 μL	1 μL	0,5 μL
Cebador F (25 μM)	1 μL	1 μL	0,5 μL
Cebador R (25 μM)	1 μL	1 μL	0,5 μL
Polimerasa (5 U/μL)	0,3 μL	0,3 μL	0,1 μL
Agua miliQ	30,2 μL	30,2 μL	11,9 μL
DNA (30-60 ng/μL)	10 μL	10 μL	5 μL
Total	50 μL	50 μL	25 μL

^a Immobuffer 10X, NH₄⁺ buffer 10X y KAPA Taq HotStart buffer 5X para Immolase DNA Polymerase, BioTaq DNA Polymerase y KAPA Taq HotStart DNA Polymerase, respectivamente.

Los amplicones obtenidos se enviaron a secuenciar al servicio de secuenciación del CIBIR. Una vez se obtuvieron las secuencias, se analizaron mediante software bioinformático y se compararon en la web *Pseudomonas aeruginosa* MLST Database (<https://pubmlst.org/organisms/pseudomonas-aeruginosa/>) (Jolley *et al.*, 2018). Mediante la combinación de los 7 alelos se obtuvo la secuencia tipo (ST) de la cepa.

Los programas **Philoviz** (Carriço *et al.*, 2018) y **eBURST** (Feil *et al.*, 2004) se utilizaron para analizar los resultados de tipificación de los perfiles alélicos de las STs.

10. Cuantificación de la producción de biofilm

La producción de biofilm se analizó mediante dos métodos: cuantificando la biomasa de biofilm mediante tinción con cristal violeta (CV) o cuantificando la actividad metabólica (o viabilidad bacteriana) en el biofilm mediante el análisis con diacetato de fluoresceína (FDA) (Figura 43). Para ambos análisis lo primero que se realizó fue el crecimiento de la cepa bacteriana en placas de microtiter de 96 pocillos con el fondo plano (Greiner bio-one CELLSTAR®), siguiendo las recomendaciones descritas por Peeters *et al.*, 2008.

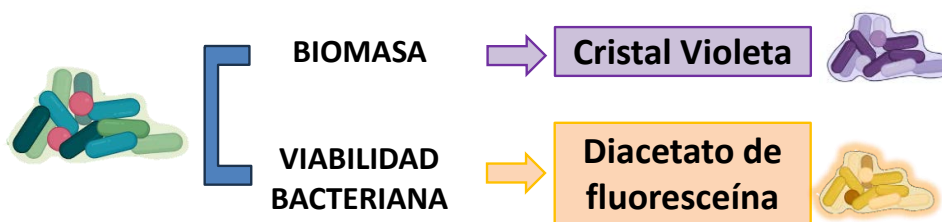


Figura 44. Esquema del análisis de la producción de biofilm mediante las técnicas de CV (cuantificación de biomasa) o FDA (cuantificación de actividad metabólica en el biofilm).

La preparación de las placas para permitir el crecimiento y la formación de biofilm fue la misma para los dos procedimientos, de modo que se utilizó una placa para el análisis de cada parámetro. Se siguió el siguiente protocolo:

1. Partiendo de un cultivo bacteriano puro en BHI agar, se preparó una suspensión bacteriana 0,5 McFarland en 3 mL de MH líquido.
2. Se realizó una dilución 1/100 de la suspensión en un nuevo tubo de MH líquido para conseguir una concentración bacteriana de 10^6 UFC/mL.
3. De esta suspensión bacteriana se añadieron 200 μ L a cada pocillo de cada placa microtiter de 96 pocillos, usando 8 pocillos por cepa y placa. Se incubaron en estufa a 37°C durante 24 h.

Se incluyó en cada placa la cepa *P. aeruginosa* PAO1 como control y se dejaron pocillos que contenían solo MH líquido, sin microorganismo, como control negativo (Figura 45).

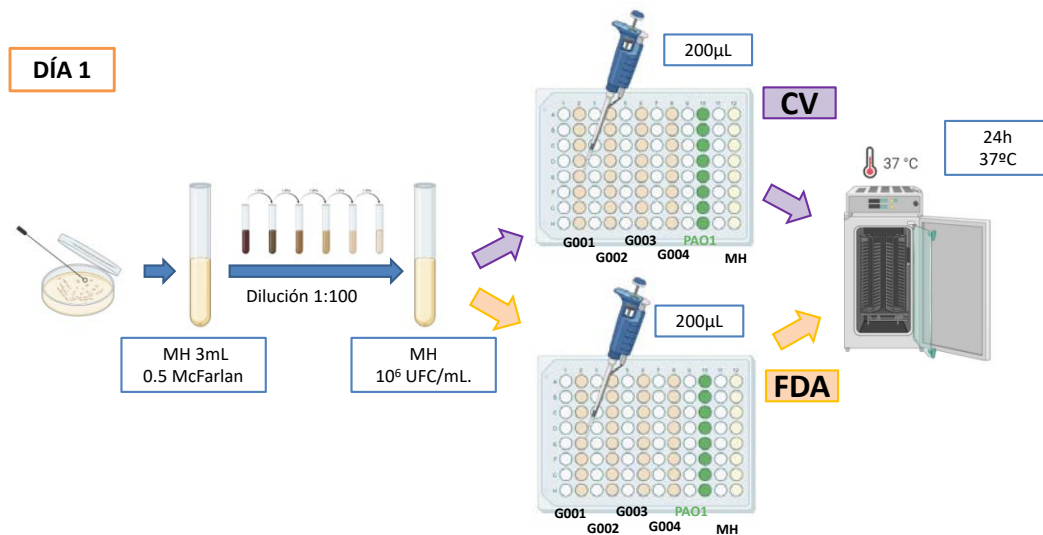


Figura 45: Representación esquemática del protocolo seguido para el análisis del biofilm. CV: cristal violeta (ensayo de la cuantificación de biomasa); FDA: diacetato de fluoresceína (ensayo de la cuantificación de actividad metabólica del biofilm); MH: Müller-Hinton. Los pocillos sombreados de naranja representan las cepas, los verdes la localización de PAO1 y en amarillo el control negativo (solo medio MH).

10.1 Cuantificación de la biomasa

La biomasa del biofilm se cuantificó mediante el ensayo con cristal violeta tras las 24 h de incubación de las placas, para ello se siguieron los siguientes pasos (Figura 46):

1. Se vació la placa con una inversión rápida y seca para eliminar la suspensión de bacterias planctónicas.
2. Se lavaron los pocillos con 200 µL/pocillo de buffer PBS 1X (preparado a partir de Phosphate Buffer Solution 10X, Sigma), que se eliminó rápidamente, mediante inversión rápida.
3. Para fijar el biofilm se añadieron 200 µL/pocillo de metanol (PanReac Applichem), sin tocar el biofilm, y se dejó incubar 15 min a temperatura ambiente.
4. Se vació la placa con un golpe seco y se dejó secar 10-15 min a temperatura ambiente.
5. La tinción con cristal violeta se realizó añadiendo 200 µL/pocillo de una solución al 10 % (v/v) de cristal violeta (Sigma-Aldrich) en PBS 1X y se dejó incubar la placa 20 min a temperatura ambiente.

6. Se vació la placa invirtiéndola y se lavó el exceso de cristal violeta con agua. Se secó la placa sobre papel secante.
7. Una vez seca, se añadieron 200 μ L/pocillo de una solución acuosa al 66 % de ácido acético (PanReac Applichem) y se dejó incubar 1 h a temperatura ambiente, para solubilizar el cristal violeta que había teñido el biofilm.
8. Se midió la absorbancia a 590 nm en el espectrofotómetro POLARstar Omega (BMG- LABTECH) y los resultados se analizaron con el software Omega 1.20 y Omega-Data Analysis (BMG-LABTECH).
9. Los resultados se expresaron como porcentaje de biofilm respecto a la producción de biofilm de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1.

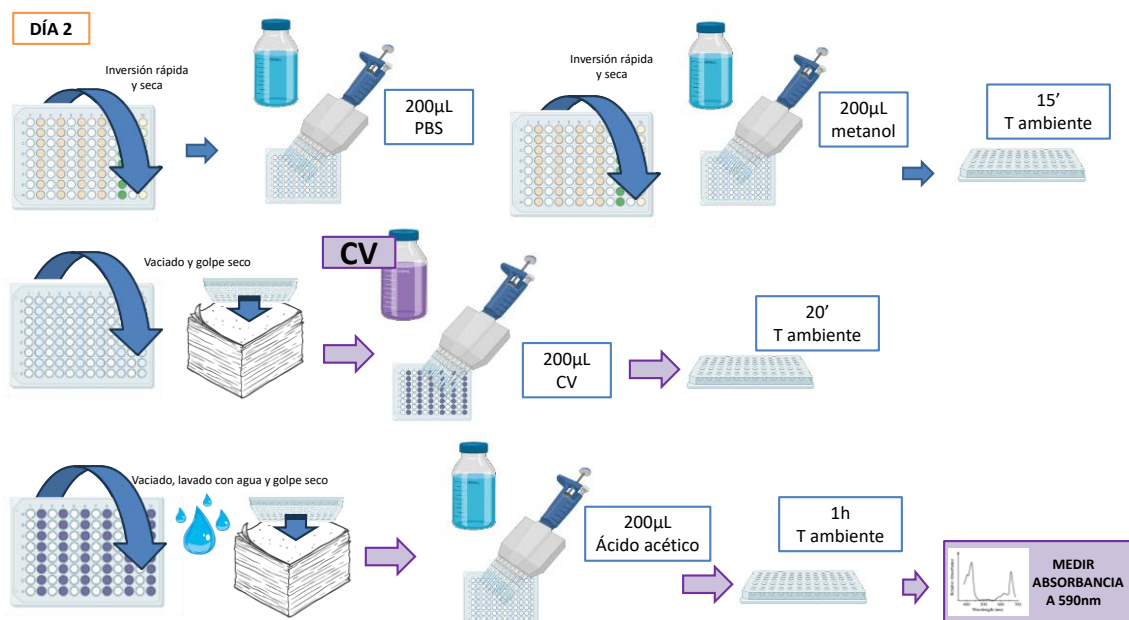


Figura 46: Esquema del protocolo utilizado para el análisis de la cuantificación de la biomasa del biofilm mediante tinción con cristal violeta.

10.2 Cuantificación de la actividad metabólica dentro del biofilm

Tras las 24 h de incubación de las placas con la suspensión bacteriana se cuantificó la actividad metabólica del biofilm, mediante el ensayo con FDA, para ello se siguieron los siguientes pasos (Figura 47):

1. Se vació la placa con una inversión rápida y seca para eliminar la suspensión de bacterias planctónicas.

2. Se lavaron los pocillos con 200 μL /pocillo de buffer MOPS 100 mM (20,9 g MOPS, 5,6 g NaCl en 1 L de agua destilada, a pH 7, Sigma), sin tocar el biofilm y se eliminó rápidamente.
3. A partir de una solución de FDA en acetona (10 mg/mL), se preparó una dilución 1 % en MOPS, se añadieron 200 μL /pocillo, y se dejó incubar 1h a 37°C, protegido de la luz en todo momento.
4. Se midió la fluorescencia (λ emisión de 494 nm y λ excitación de 518 nm), en el espectrofotómetro POLARstar Omega (BMG-LABTECH), y los resultados se analizaron con el software Omega 1.20 y Omega-Data Analysis (BMG-LABTECH).
5. Los resultados se expresaron como porcentaje de biofilm respecto a la producción de biofilm de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1.

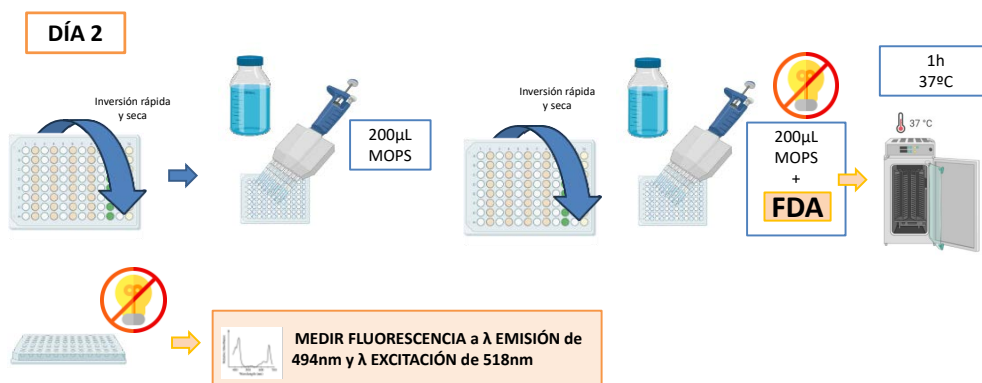


Figura 47: Esquema del protocolo utilizado para la cuantificación de la actividad metabólica del biofilm mediante FDA (diacetato de fluoresceína).

11. Producción de pigmentos

El estudio de la producción de los pigmentos piorrubina, piocianina y pioverdina se llevó a cabo empleando protocolos adaptados de *Anantharajah et al.*, 2017 e incluyendo en todos los ensayos la cepa *P. aeruginosa* PAO1 como control (Figura 48).

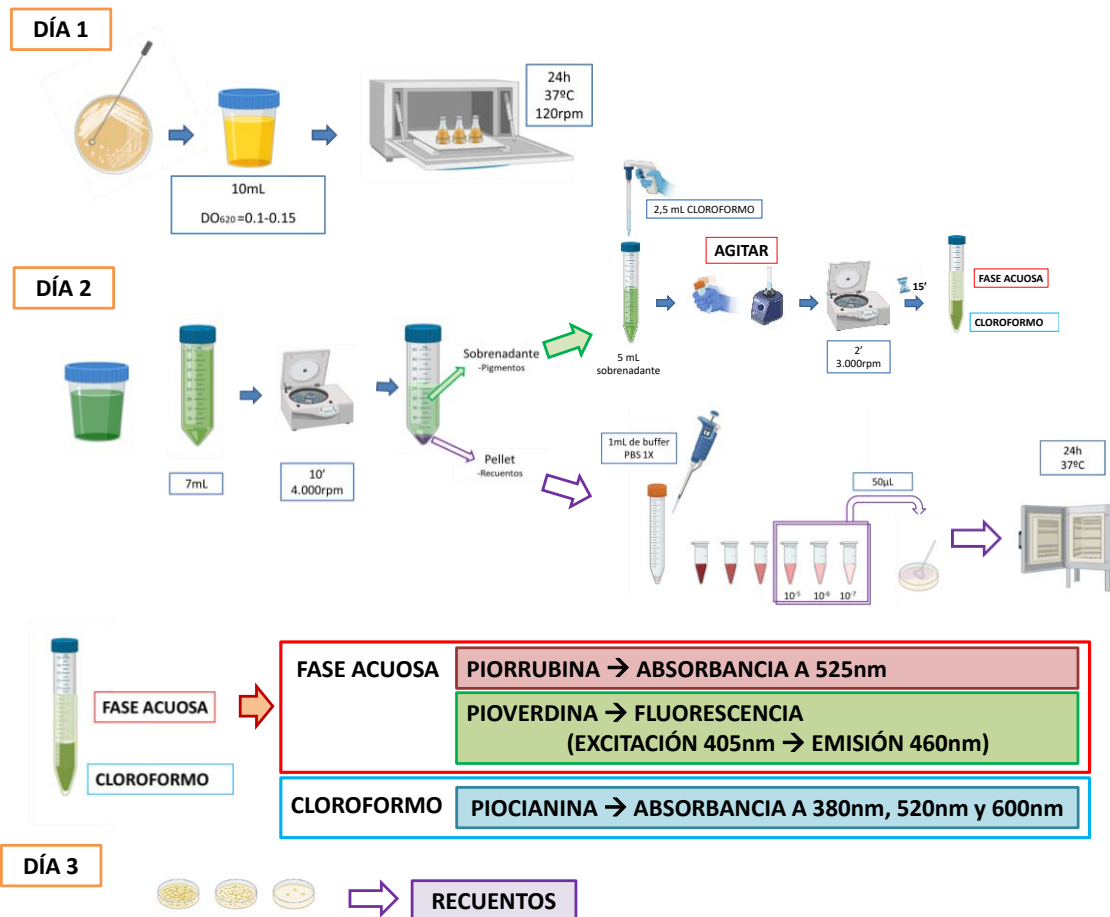


Figura 48. Esquema del protocolo utilizado para la cuantificación de la producción de pigmentos.

Para todos los pigmentos estudiados se sigue el mismo procedimiento inicial.

1. A partir de un cultivo puro en agar BHI de 24h de la cepa en estudio, se realizó una suspensión bacteriana en 10 mL de medio LB líquido, hasta alcanzar la absorbancia DO₆₂₀= 0,10 - 0,15.
2. Se incubó a 37°C en agitación a 120 rpm durante 24 h.
3. Se recogieron 7 mL de la suspensión bacteriana en un tubo y se centrifugó 10 min a 4.000 rpm.
4. Con el precipitado se hizo el recuento bacteriano y con el sobrenadante se procedió a la extracción de los pigmentos.

11.1 Recuentos bacterianos para análisis de pigmentos

Tras la centrifugación, todo el precipitado se resuspendió en 1 mL de buffer PBS 1X (Sigma). Se realizaron diluciones seriadas 1:10 y se sembraron 50 μ L de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} en placas de agar BHI (por duplicado). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h y se hizo el recuento de colonias. Se tuvieron en cuenta aquellas placas en las que se podían contar entre 30 y 300 colonias. Se calculó la concentración bacteriana en UFC/mL.

11.2 Cuantificación de la producción de pigmentos

Para la extracción de pigmentos se trasvasaron 5 mL del sobrenadante a otro tubo, se añadieron 2,5 mL de cloroformo puro (Merck) y se vorteoó hasta su perfecta homogeneización. Se centrifugó 2 min a 3.000 rpm y se dejó 15 min a temperatura ambiente para que se separaran perfectamente las dos fases, como se muestra en la Figura 49.

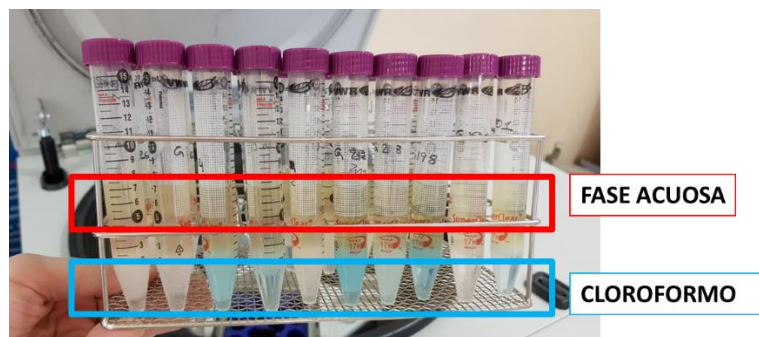


Figura 49: Fases acuosa y orgánica (cloroformo) obtenidas para la cuantificación de pigmentos.

11.2.1 Piorrubina y pioverdina

La piorrubina y pioverdina quedan disueltas en la fase acuosa (remarcada en rojo en la Figura 49), por lo que para su cuantificación se trasvasó la fase acuosa a un tubo limpio y se distribuyeron 100 μ L/pocillo en placas de microtiter en fondo U (Deltalab), por triplicado. Mediante el espectrofotómetro POLARstar Omega (BMG-LABTECH) y el

software Omega 1.20 y Omega-Data Analysis (BMG-LABTECH), se midieron los pigmentos:

- **Piorrubina:** se midió la absorbancia a 525 nm.
- **Pioverdina:** se midió la fluorescencia a λ excitación de 405 nm y λ emisión de 460 nm.

11.2.2 Piocianina

La piocianina queda disuelta en la fase orgánica (cloroformo) (representada en azul en la Figura 49), y para su cuantificación fue necesario quitar la interfase (intermedia) con una pipeta sin extraer la orgánica y seguir con el siguiente protocolo.

1. Se añadieron 500 μ L de ácido clorhídrico 0,2 N (HCl 12M, VWR) a la fase orgánica y se vorteoó hasta su perfecta homogeneización.
2. Se centrifugó 2 min a 3000 rpm y se recuperó la fase superior.
3. Se distribuyeron 100 μ L/pocillo en placas de microtiter en fondo U (Deltalab), por triplicado, y mediante el espectrofotómetro POLARstar Omega (BMG-LABTECH) y el software Omega 1.20 y Omega-Data Analysis (BMG-LABTECH) se midió la absorbancia a 380, 520 y 600 nm. Para la cuantificación de piocianina se emplearon las rectas de regresión descritas en la Figura 50.

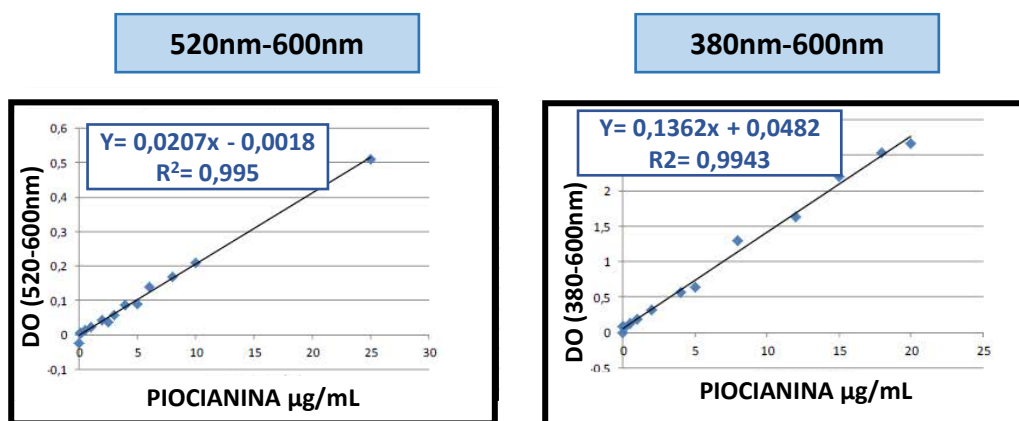


Figura 50. Rectas de regresión empleadas para la cuantificación de piocianina.

La producción de todos los pigmentos se calculó en comparación con la control PAO1 (incluida en cada experimento) cuya producción se consideró el 100%.

12. Actividad elastasa

El estudio de la actividad elastasa se llevó a cabo mediante el protocolo adaptado de *Pearson et al.*, 1997 empleando la cepa *P. aeruginosa* PAO1 como control, de manera que los resultados se obtienen como porcentaje respecto a esta cepa de referencia (Figura 51).

1. A partir de un cultivo puro en agar BHI de la cepa en estudio de 24h, se realizó una suspensión bacteriana en 10 mL de medio LB líquido, hasta alcanzar la absorbancia $DO_{620} = 0,10 - 0,15$.
2. Se incubó a 37°C en agitación a 120 rpm durante 24 h.
3. Se recogieron 7 mL de la suspensión bacteriana en un tubo y se centrifugó 10 min a 4.000 rpm.
4. Con el precipitado se hizo el recuento bacteriano siguiendo el mismo procedimiento explicado para los pigmentos (apartado 11.1) y con el sobrenadante se analizó la actividad elastasa.
5. En un tubo eppendorf de 2 mL se pesaron 20 mg Elastina Congo Red (ECR, Sigma) y se añadieron 900 μ L de buffer Tris/CaCl₂ (Tris HCl 0,1 M, CaCl₂ 1 mM). A este preparado, se añadieron 900 μ L del sobrenadante bacteriano y se agitó hasta su completa homogeneización. Se empleó como control negativo 10 mg de ECR con 900 μ L de buffer Tris/CaCl₂, sin sobrenadante bacteriano.
6. Se dejó en incubación a 37°C durante 20 h a 600 rpm (Eppendorf Thermomixer confort).
7. Tras la incubación, se centrifugó 5 min a 13.000 g.
8. Se distribuyeron 200 μ L/pocillo del sobrenadante, por triplicado, en una placa de microtiter con fondo U (Deltalab) y se midió la absorbancia a 450 y 600 nm en el espectrofotómetro POLARstar Omega (BMG-LABTECH). Los resultados se analizaron con el software Omega 1.20 y Omega-Data Analysis (BMG-LABTECH). En los casos que se observó saturación en la medida del espectrofotómetro, se diluyó toda la placa con buffer Tris/CaCl₂.
9. El cálculo de la actividad elastasa se llevó a cabo determinando la resta de absorbancia 450-600 nm y dividiendo por la concentración bacteriana.

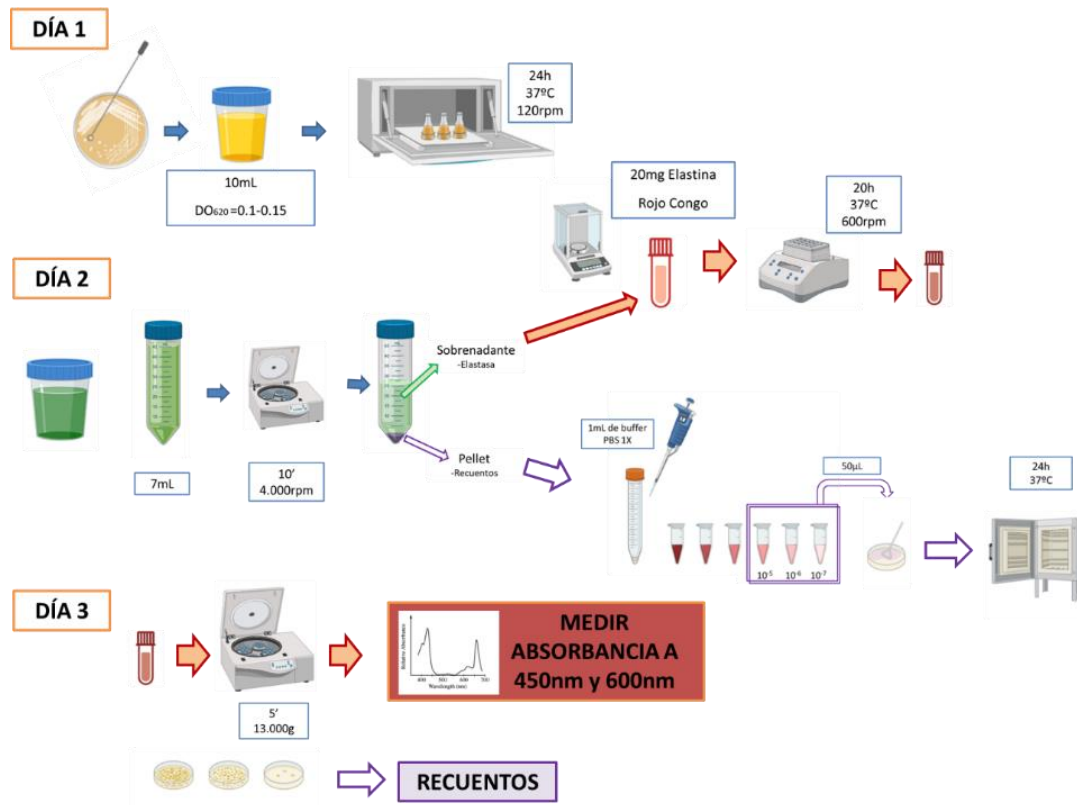


Figura 51: Esquema del protocolo utilizado para la cuantificación de la actividad elastasa.

Se debe tener en cuenta, que las cepas que producen elevados niveles de pirrubina pueden alterar los valores de actividad elastasa, debido a la coloración marronácea del pigmento, similar al color del compuesto Elastina Congo Red utilizado.

13. Motilidad

Para el estudio de la motilidad de las cepas de este trabajo se analizó la capacidad swarming y swimming de las mismas siguiendo el protocolo descrito por Wei *et al.*, 2011 (con algunas modificaciones) (Figura 52):

1. Partiendo de un cultivo bacteriano puro y fresco, se cogió una colonia y se realizó una suspensión bacteriana en caldo LB hasta conseguir una absorbancia DO₆₂₀ de 0,1-0,2.
2. Se incubaron a 37°C con agitación 200-300 rpm hasta alcanzar su fase exponencial de crecimiento DO₆₂₀=0,8 (aproximadamente 1x10⁹ bacterias).

3. Paralelamente a este crecimiento bacteriano se prepararon placas con medios LB semisólidos:
 - a. Para el análisis del swimming, el medio LB semisólido tenía un 0,5% de agar.
 - b. Para el análisis del swarming, el medio LB semisólido tenía un 0,3% de agar.
4. Una vez alcanzada la $DO_{620}=0,8$, se sembró una gota de 4 μ L de la suspensión bacteriana en el centro de cada placa (atendiendo a que la punta de la pipeta no toque/rompa el agar).
5. Las placas se colocaron en la estufa (evitando que se mueva la gota de suspensión bacteriana) y se incubaron a 37°C durante 24h.
6. Se tomaron imágenes de las placas con el captador Chemi Doc system (BioRad) y empleando el software Image Lab software (version 5.2.1 (BioRad)). Todas las imágenes se tomaron con las mismas referencias de posición y enfoque: se empleó un molde que centraba la placa y se realizaron con luz "EPI WHITE" y exposición manual a 0,700. Para un correcto análisis de la imagen, tras el *freeze* se modificó la imagen empleando los siguientes valores: H: 334, L: 308 y γ : 0,7.
7. Estos experimentos se realizaron, al menos, por triplicado, para cada cepa a estudiar.

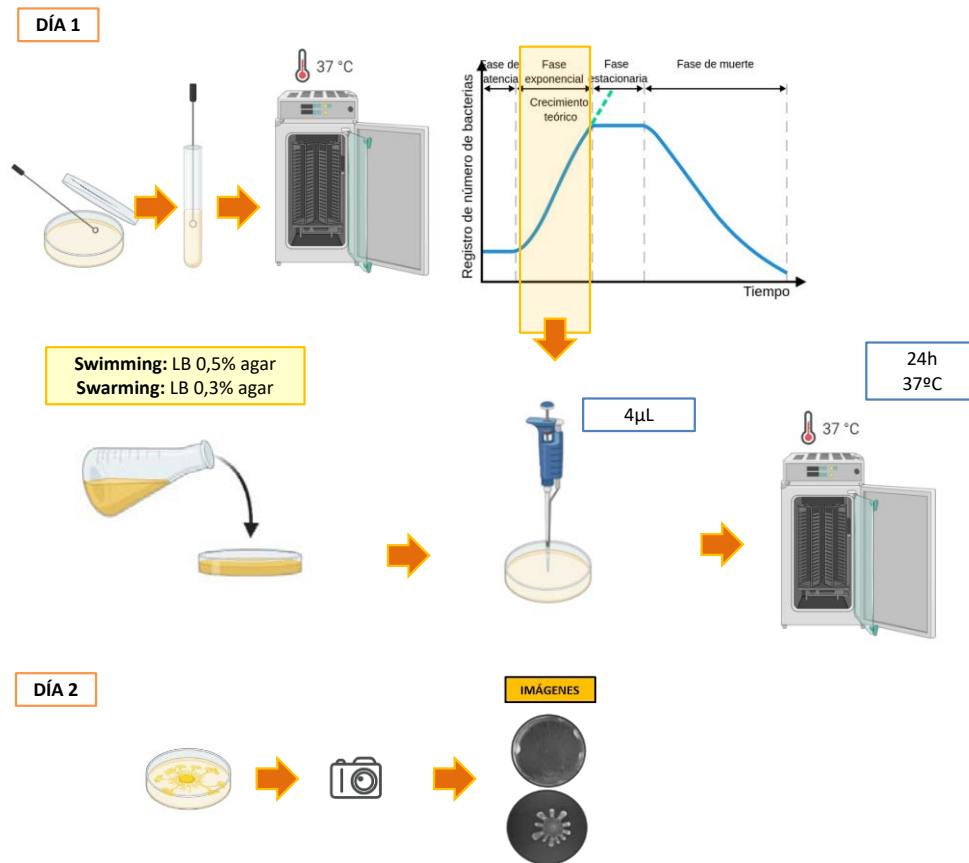


Figura 52: Esquema del protocolo seguido para el análisis de la motilidad bacteriana.

13.1 Análisis de las imágenes

Para cuantificar la motilidad bacteriana se calculó el área que cada cepa había recorrido durante las 24 h de incubación. Para medir el área de crecimiento en las imágenes captadas se utilizaron dos procedimientos: uno manual y otro automático, mediante el uso del programa **Motility-J**, que ha sido diseñado durante el transcurso de esta tesis por el Departamento de Matemáticas de la Universidad de la Rioja en colaboración con el grupo de Microbiología Molecular del CIBIR.

13.1.1 Análisis manual de las imágenes

El análisis manual de las imágenes se realizó utilizando el programa Image Lab Versión 5.2.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) con la herramienta de medida de volumen. Para ello se definió manualmente el borde del área recorrido por la bacteria y el propio programa informático calculó el área en mm².

13.1.2 Análisis automático de las imágenes

En este caso, se utilizó el programa Motility-J (Casado-García *et al.*, 2021). Esta herramienta incorpora un mecanismo de clasificación que en primer lugar determina si la bacteria ha cubierto toda la placa Petri o no, clasificándolas en completas (6400mm²) o incompletas.

Para aquellas clasificadas como incompletas utilizó un modelo de segmentación que determina de forma automática el área de propagación de la bacteria. (Figura 53)

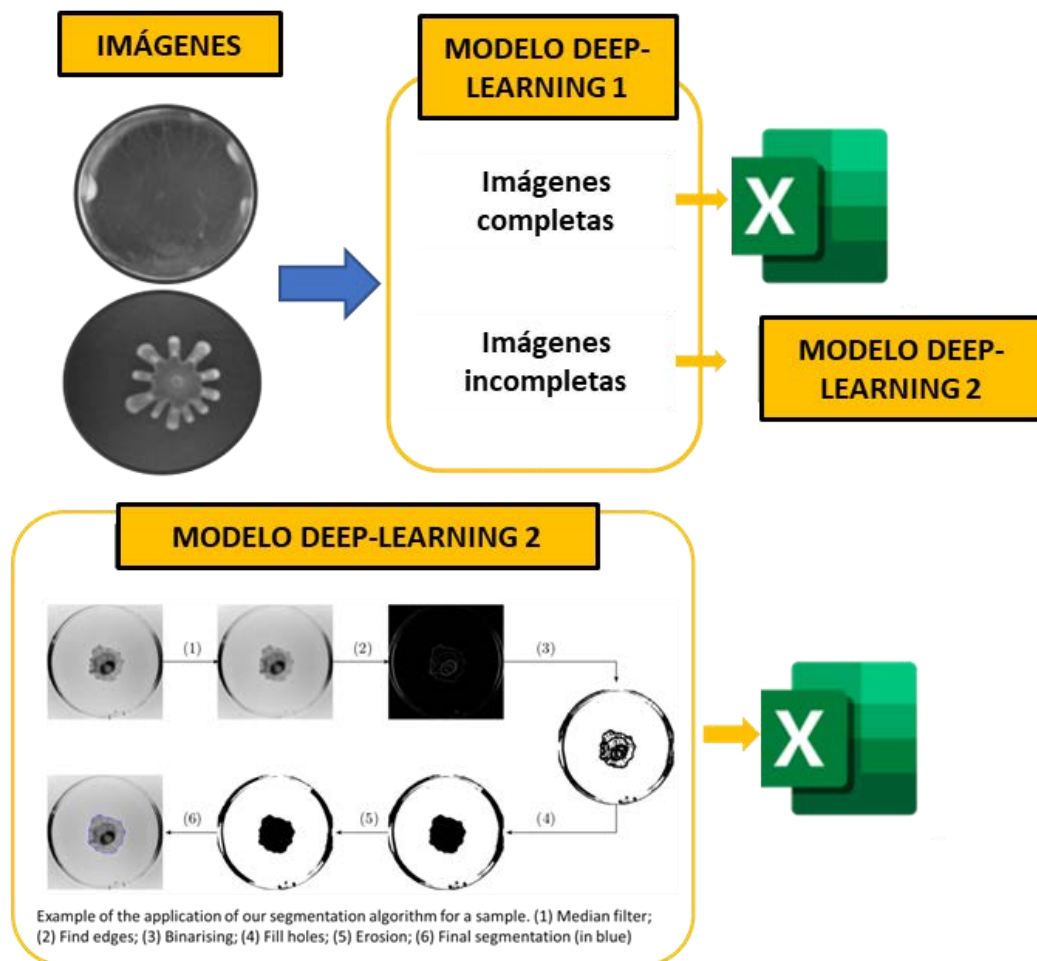


Figura 53: Esquema de trabajo del programa MotilityJ.

14. Análisis de los resultados

Los resultados obtenidos en este trabajo se analizaron descriptivamente con Microsoft-Excel 2016 y estadísticamente con el software informático SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*) V25, siguiendo el esquema de análisis que se muestra en la Figura 54.

Los análisis descriptivos se realizaron mediante Microsoft-Excel, utilizando las tablas dinámicas que permiten generar automáticamente informes de análisis descriptivos de gran cantidad de datos. Además, Microsoft-Excel se utilizó para el cálculo de los rangos de producción (muy alta, alta, media y baja) para la categorización de los parámetros biológicos.

El software informático SPSS se utilizó para el análisis estadístico de los datos. En primer lugar, para todos los grupos se realizó un análisis de normalidad utilizando la **Prueba de Kolmogórov-Smirnov**. En el caso de que los datos se ajustaran bien a una distribución normal y se pudiera concluir que los datos son normales, se utilizaron las pruebas de comparaciones paramétricas. En estos análisis si la comparación se realizaba entre dos grupos se utilizó la **Prueba t- Student** utilizando además la **Prueba de Levene de igualdad de varianzas** para informar del dato exacto del valor p. En los análisis en los que se comparaban más de dos grupos, se utilizó la **prueba de ANOVA y Corrección de Bonferroni** para el valor p. Cuando la **Prueba de Kolmogórov-Smirnov** indicó que no se seguía una distribución normal, se realizaron comparaciones no paramétricas, en el caso comparaciones entre dos grupos se utilizó **Prueba U de Mann-Whitney** y en el caso de que las comparaciones entre más de dos grupos se utilizó la **Prueba de Kruskal-Wallis**

En todos los análisis estadísticos se utilizó un nivel de significancia de **$p \leq 0,05$** para indicar que los datos obtenidos eran estadísticamente significativos.



Figura 54: Esquema del procedimiento seguido para el análisis descriptivo y estadístico de los datos de este trabajo.

15. Construcción de las Figuras.

Para la realización de las Figuras y gráficos de este trabajo se han utilizado los siguientes programas:

- Gráficos de diagramas de sectores: Microsoft- Excel 2016
- Pictogramas: canva (www.canva.com).
- Figuras que explican procesos biológicos y protocolos de laboratorio: biorender (www.BioRender.com).
- Gráficos de barras, dispersión y heatmaps: Graphpad Prism (San Diego, California, USA) v8.0.1.
- Edición y adaptación de Figuras al castellano Microsoft- Power-Point 2016.

RESULTADOS

RESULTADOS

El siguiente resumen gráfico esquematiza los resultados obtenidos en esta tesis (Figura 55).

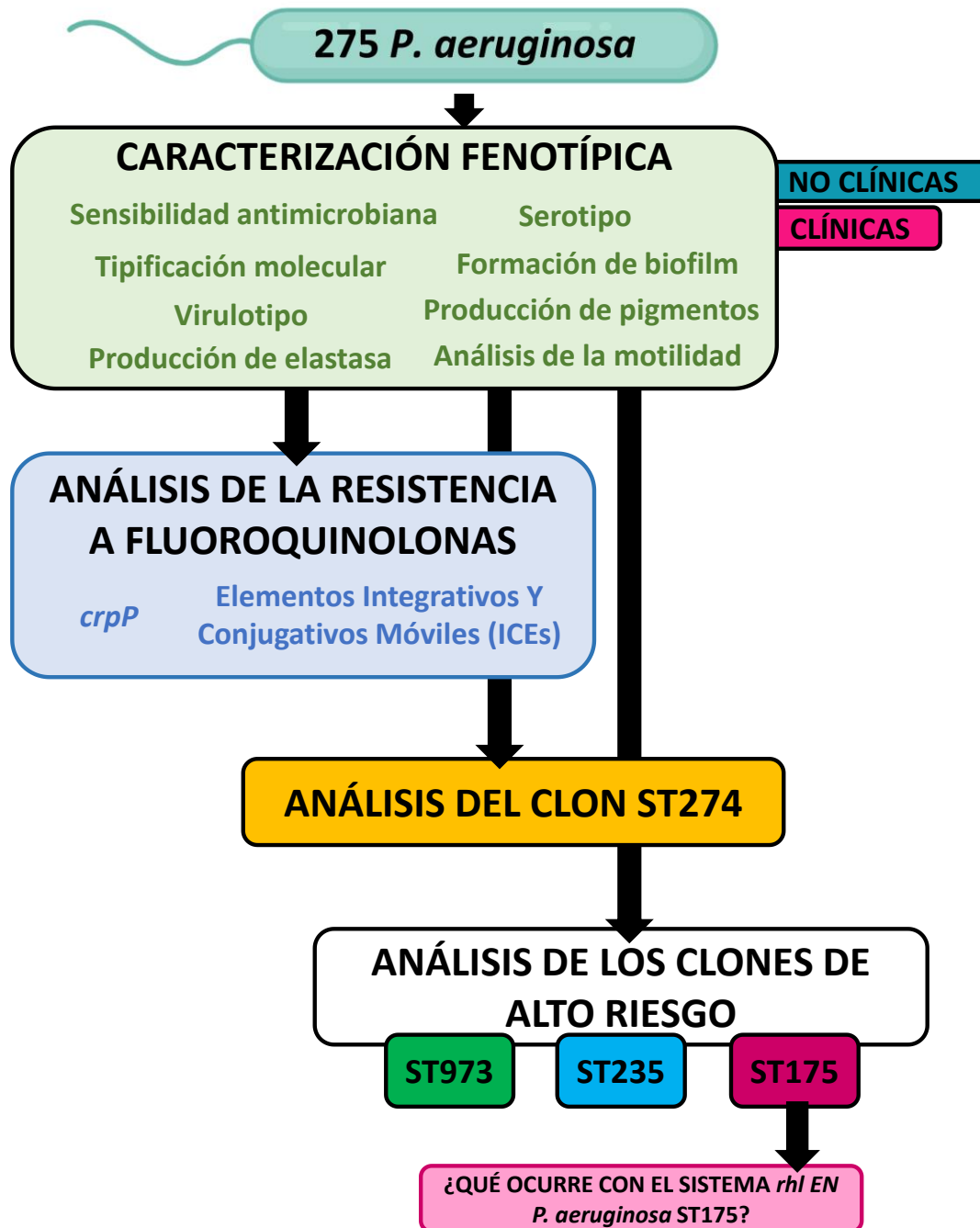


Figura 55: Resumen gráfico de los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis.

1. Caracterización de las cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico y no-clínico

Las 275 cepas de *P. aeruginosa* de diferentes orígenes incluidas en el estudio se han caracterizado en esta tesis analizando su resistencia a antibióticos, su capacidad de producir biofilm y pigmentos, su actividad elastasa y su motilidad; así mismo se ha analizado su virulotipo y se ha realizado la tipificación molecular de todas ellas mediante serotipado, PFGE y MLST. Todos los resultados se detallan en el Anexo 3.

1.1 Fenotipo de resistencia a agentes antipseudomónicos

Se determinaron los valores de resistencia a 12 antibióticos antipseudomónicos (Tabla 6 de materiales y métodos) siguiendo los puntos de corte determinados por el CLSI (2018). La resistencia a cada agente antipseudomónico analizado se muestra en las Figuras 56 y 57.

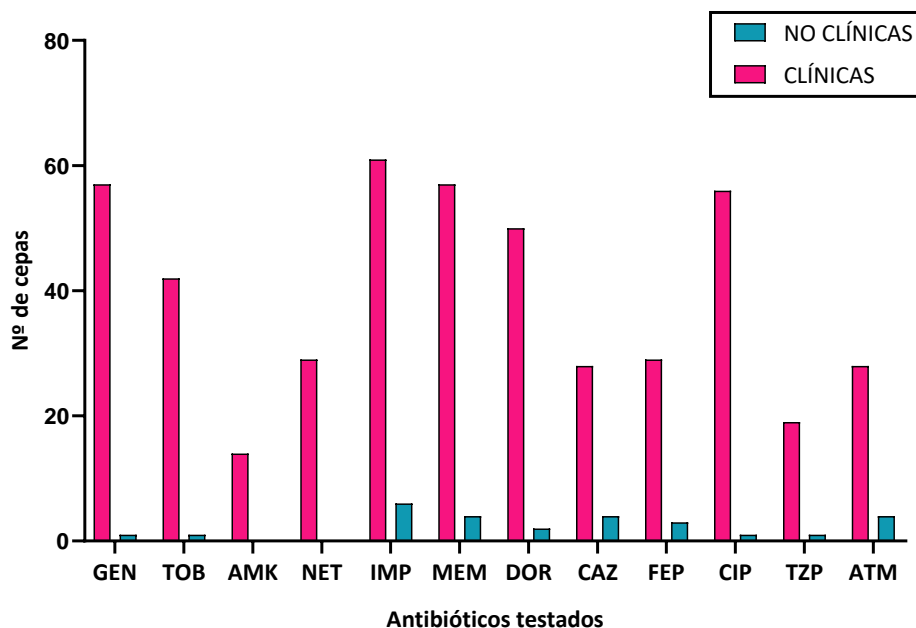


Figura 56. Número de cepas resistentes a los diferentes antipseudomónicos testados. Las cepas de origen no clínico se muestran en azul y las clínicas en magenta. GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; AMK, amikacina; NET, netilmicina; IMP, imipenem; MEM, meropenem; DOR, doripenem; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; CIP, ciprofloxacina; TZP, piperacilina-tazobactam y ATM, aztreonam.

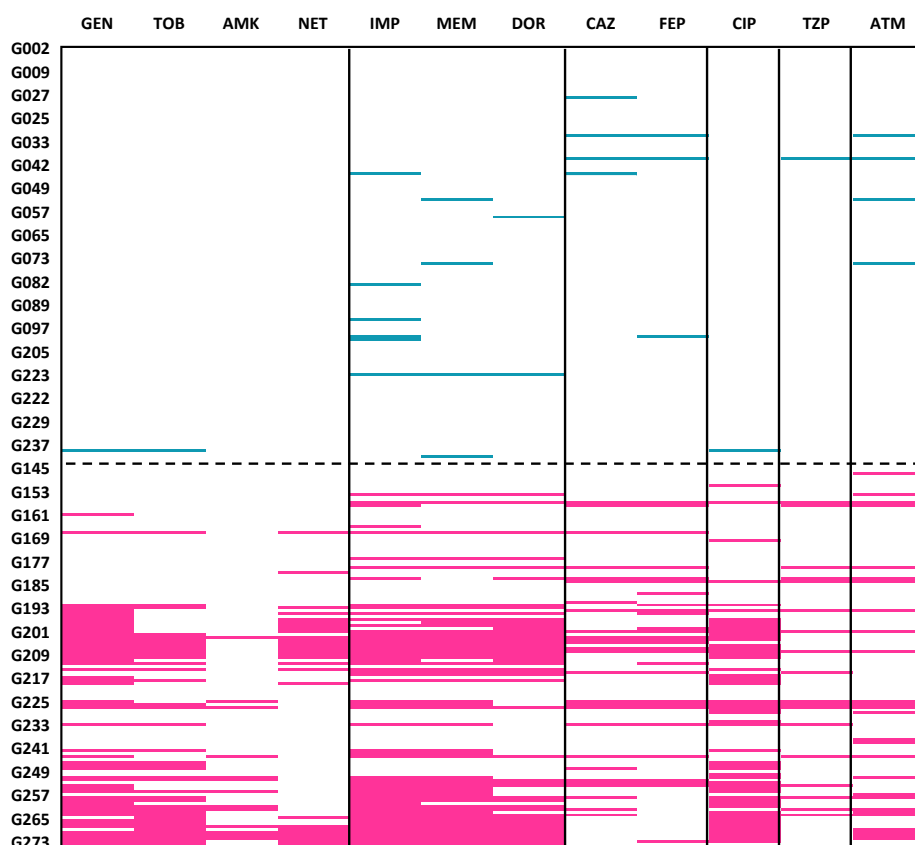


Figura 57. Fenotipo de resistencia de cada cepa a los diferentes antipseudomónicos testados. La presencia de color sólido indica la resistencia de esa cepa al antibiótico de dicha columna. La línea negra horizontal punteada separa las cepas de origen no clínico (superior, en azul) de las clínicas (inferior, en magenta). Las líneas negras verticales separan las diferentes categorías de antibióticos (aminoglucósidos, carbapenémicos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, penicilina más inhibidor de β -lactamasa y monobactámico). GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; AMK, amikacina; NET, netilmicina; IMP, imipenem; MEM, meropenem; DOR, doripenem; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; CIP, ciprofloxacina; TZP, piperacilina-tazobactam; ATM, aztreonam.

Los porcentajes de resistencia frente a los diferentes antibióticos testados en las 275 cepas de *P. aeruginosa* fueron los siguientes: gentamicina (21%); tobramicina (15%); amikacina (5%); netilmicina (10%); imipenem (24%); meropenem (22%); doripenem (19%); ceftazidima (12%); cefepima (12%); ciprofloxacina (21%); piperacilina-tazobactam (7%) y aztreonam (12%).

Los porcentajes de resistencia a cada uno de los antibióticos testados, diferenciando por los orígenes clínico y no clínico, se recogen en la Figura 58. Entre las cepas de *P. aeruginosa* de origen no clínico, destacan 6 cepas resistentes a imipenem (2,2%), 4 cepas resistentes a meropenem (1,5%) y 4 cepas resistentes a aztreonam (1,5%). En el caso de las cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico, destacan 61 cepas resistentes a imipenem (22%), seguido de meropenem y gentamicina con 57 cepas

resistentes en cada caso (20,7%) y 56 cepas resistentes a ciprofloxacina (20,3%). Se detectó resistencia a amikacina y netilmicina únicamente en las cepas clínicas.

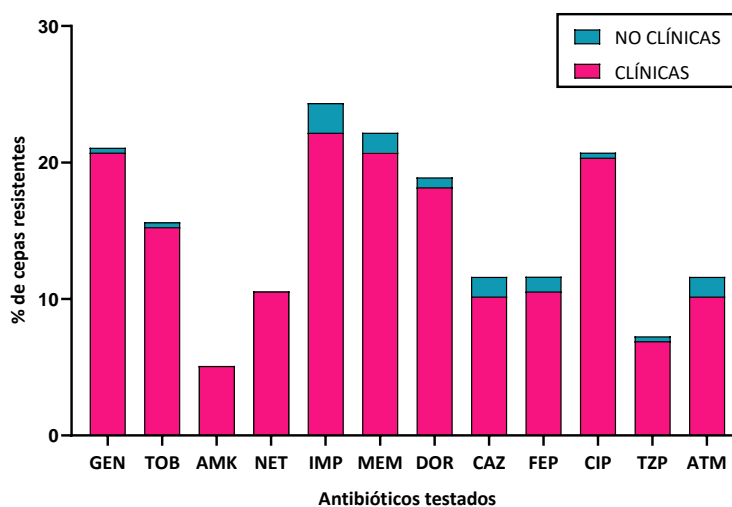


Figura 58: Porcentaje de cepas resistentes a los distintos agentes antipseudomónicos desglosado por origen clínico (magenta) y no clínico (azul). GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; AMK, amikacina; NET, netilmicina; IMP, imipenem; MEM, meropenem; DOR, doripenem; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; CIP, ciprofloxacina; TZP, piperacilina-tazobactam; ATM, aztreonam.

Las cepas se clasificaron en multiS, modR, MDR y XDR según su fenotipo de resistencia a diferentes categorías de antibióticos (ver Material y Métodos): 175 cepas (64% del total de cepas analizadas) fueron multiS, 41 cepas (15%) resultaron modR, 50 (18%) fueron MDR y 9 cepas (3%) XDR. Ninguna de las cepas estudiadas resultó PDR.

Considerando el origen de las cepas, el 90% de las cepas no clínicas se clasificaron en multiS (130 cepas), 9% modR (13 cepas) y 1% MDR (una cepa) y entre las cepas clínicas encontramos 34% multiS (45 cepas), 21% modR (28 cepas), 37% MDR (49 cepas) y 7% XDR (9 cepas) (Figura 59).

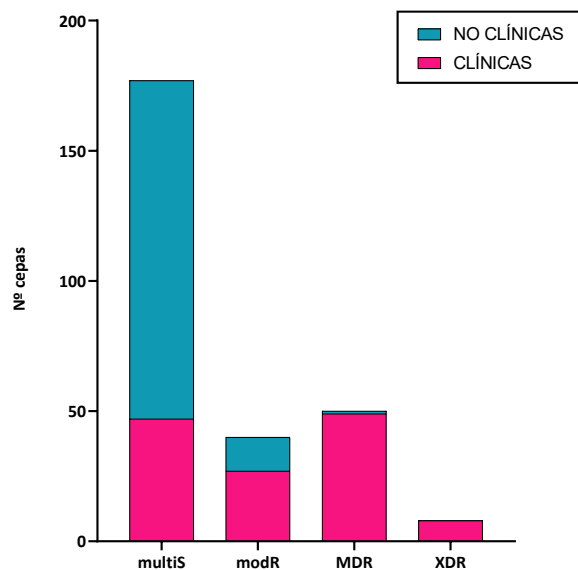


Figura 59. Perfiles de multiS, modR, MDR y XDR de las cepas analizadas en función de su origen clínico/no clínico.

La relación concreta del origen de la muestra y el perfil de resistencia se muestra en la Figura 60 y en la Tabla 13. Todas las cepas MDR y XDR pertenecían a orígenes clínicos, excepto una cepa MDR aislada de un individuo sano. El fenotipo XDR se encontró mayoritariamente en las cepas agrupadas en “otros” orígenes clínicos (exudados quirúrgicos y absceso intraabdominal), siendo un 17% de cepas XDR, seguido de las cepas aisladas de sangre con un 14% de cepas XDR, orina con un 10% y respiratorio con un 8%. En las muestras de orina y en el grupo de “otros” no se encontraron cepas sensibles ni modR.

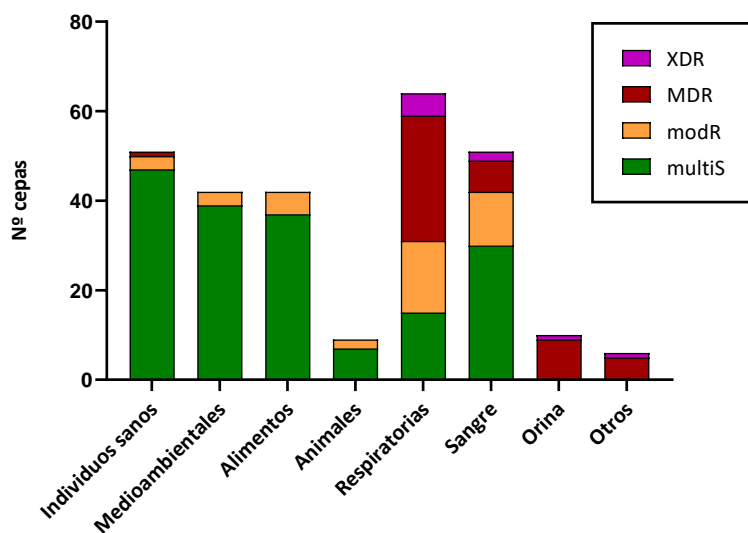


Figura 60: Clasificación de los perfiles de multiS, modR, MDR y XDR en función del origen de cada cepa.

Tabla 13. Clasificación de las cepas de *P. aeruginosa* según su origen y perfil fenotípico.

	Nº Cepas			
	multiS	modR	MDR	XDR
Individuos sanos	47	3	1	0
Medioambientales	39	3	0	0
Alimentos	37	5	0	0
Animales	7	2	0	0
Respiratorias	15	16	28	5
Sangre	30	12	7	2
Orina	0	0	9	1
Otros	0	0	5	1

1.2 Tipificación bacteriana

1.2.1 Serotipado

Se analizó el serotipo de las 275 cepas de *P. aeruginosa* mediante aglutinación con 16 antisueros. La Figura 61 resume los serotipos encontrados en las distintas cepas según los diferentes orígenes, siguiendo las directrices del IATS.

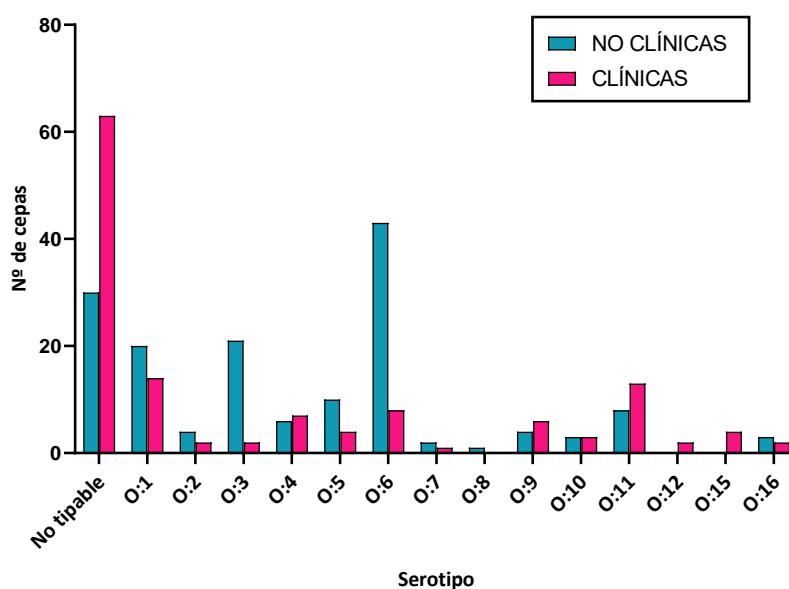


Figura 61. Serotipos detectados en las 275 cepas de *P. aeruginosa* según su origen no clínico (azul) o clínico (magenta).

El serotipo no tipable (Tabla 14) fue el más frecuente entre las *P. aeruginosa* de nuestro estudio (30%). Entre las cepas no clínicas, el serotipo mayoritario fue el O:6 (30%), seguido de las no tipables (13%) y del O:3 (15%). Entre las cepas clínicas, casi la mitad de ellas resultaron no tipables (48%), y los serotipos más frecuentes fueron: O:1 (11%) y O:11 (10%).

Tabla 14. Serotipos no tipables encontrados en las 275 cepas de *P. aeruginosa* en función de los distintos orígenes.

	No clínicas (%) ^a	Clínica (%) ^a
No aglutinante	8 (5,6)	2 (1,5)
Autoaglutinante	0	19 (14,5)
Poliaglutinante	11 (7,6)	42 (31,1)

^a El porcentaje está calculado en relación con el total de cepas de cada origen.

Desglosando los serotipos por origen (Figura 62), se observó que las cepas de origen respiratorio resultaron mayoritariamente no tipables (61%), seguido del serotipo O:11 (14%). Los serotipos mayoritarios en las cepas procedentes de hemocultivos fueron el no tipable (25%) o el serotipo O:1 (19%). La mayoría de las cepas de orina presentaron serotipo no tipable (60%), seguido del serotipo O:4 (30%).

En las cepas no clínicas, observamos que las cepas procedentes de individuos sanos presentaban mayoritariamente serotipo O:6 (8%), seguido del no tipable (7%) y del O:1 (6%). De las 9 cepas de muestras animales, 6 presentaron serotipo O:3 (67%) y las tres restantes el serotipo O:6 (33%). Entre las cepas aisladas de alimentos, encontramos alta diversidad de serotipos, destacando el serotipo O:6 (38%) y el serotipo no tipable (19%). Finalmente, las muestras medioambientales también presentaban serotipo O:6 (31%), seguido de serotipo O:3 (21%) y del serotipo O:1 (19%).

Con todos estos resultados, es importante destacar que: cepas no tipables se observaron en todos los orígenes, salvo las provenientes de animales; que el serotipo O:8 solo se encontró en una cepa de origen alimentario; que los serotipos O:3, O:4, O:6 y O:11 estaban presentes prácticamente en todos los orígenes y que los serotipos O:13 y O:14 no se detectaron en ninguna de las 275 cepas estudiadas. Las cepas de hemocultivos son las que mayor variabilidad de serotipos mostraron y las de origen

animal las que menor variabilidad presentó, ya que todas las cepas presentaban serotipo O:3 u O:6.

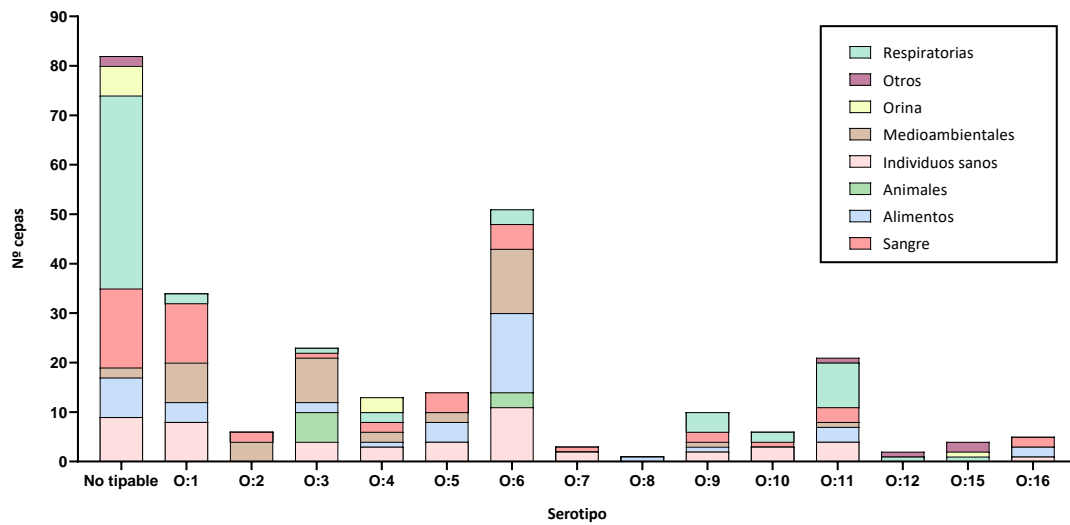


Figura 62: Serotipos encontrados en las cepas de *P. aeruginosa* analizadas en función de su origen específico

La relación entre el serotipo y el fenotipo de resistencia a antibióticos se resume en la Figura 63. Puede observarse que los serotipos O:12 y O:15 solo se detectaron en cepas MDR. Por otro lado, las cepas con fenotipo XDR presentaron un serotipo no tipable (71%), O:4 (14%) u O:11 (14%).

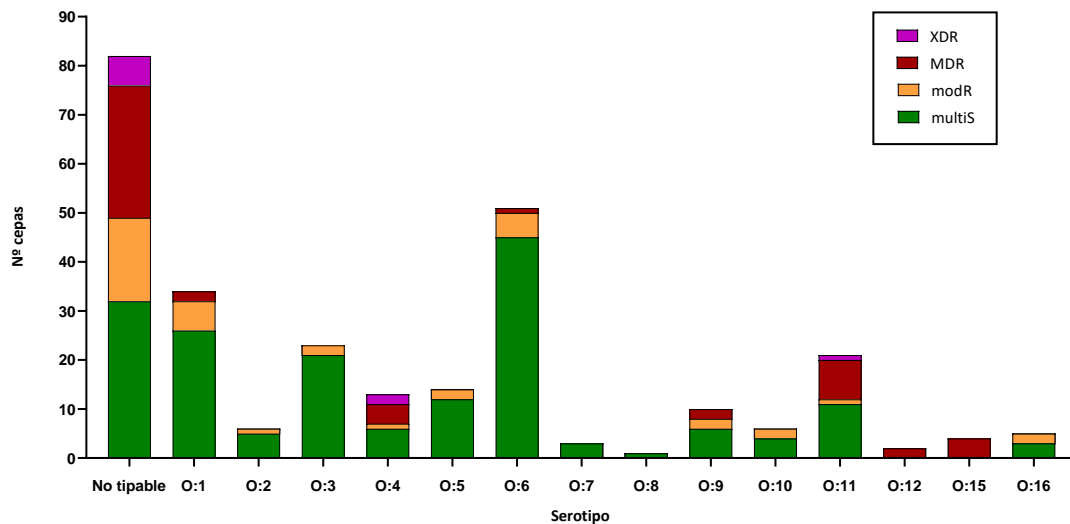


Figura 63: Serotipos detectados en las cepas de *P. aeruginosa* incluidas en el estudio en función de su fenotipo de resistencia.

1.2.2 MLST

Se determinó la secuencia tipo (ST) de las 275 cepas de *P. aeruginosa* incluidas en este estudio, encontrándose un total de 127 STs diferentes (95 STs entre cepas no clínicas y 49 STs en cepas clínicas). Además, se compartieron 17 STs entre los dos orígenes, que incluyen a los clones intercontinentales ST17, ST155, ST244, ST252, ST274 y ST395 (Figura 64). En este trabajo se han descrito 27 STs nuevos en un total de 32 cepas (30 no clínicas y 2 clínicas). Las combinaciones alélicas de éstos, que se recogen en la Tabla 15, se enviaron a la base de datos de PubMLST de *P. aeruginosa* que asignó los nuevos STs.

Tabla 15: Nuevas combinaciones alélicas y las secuencias tipo (STs) asignadas por PubMLST de *P. aeruginosa*.

Nueva ST asignada	Combinaciones de alelos de los genes							Cepas ^a
	<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>guaA</i>	<i>mutL</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>trpE</i>	
ST2241	11	5	36	3	3	1	1	G015
ST2242	5	146	79	20	1	7	24	G017
ST2222	7	5	26	72	3	47	10	G035
ST2223	32	5	61	13	1	126	54	G038
ST2096	118	106	85	166	3	54	90	G052, G053
ST2252	11	144	11	5	60	4	7	G055
ST1732	128	3	85	53	60	54	90	G058
ST2194	16	204	11	3	4	76	1	G060
ST2427	5	4	3	3	12	11	8	G062
ST2429	6	66	11	3	29	4	9	G065
ST2430	28	5	1	3	2	13	10	G066
ST2448	111	212	64	26	48	24	32	G067
ST2428	11	19	6	18	4	15	19	G072
ST2431	9	12	5	5	1	6	47	G076
ST2432	1	22	7	5	4	4	2	G077 y G079
ST2416	17	5	57	64	4	4	4	G094 y G097
ST1455	15	5	11	3	58	42	9	G100
ST1456	11	13	109	5	1	1	47	G101
ST2540	11	48	11	77	4	4	7	G113 y G114
ST2543	5	11	65	33	12	6	26	G117
ST2544	5	54	99	48	1	1	3	G120
ST2545	6	5	11	5	2	42	7	G125
ST2547	16	4	26	3	2	4	1	G130
ST2548	118	106	85	86	60	54	72	G131
ST2068	28	129	7	3	4	12	3	G132 y G134
ST3145	4	4	16	12	1	6	7	G157
ST3146	6	3	36	3	4	4	19	G163

^a Las cepas de origen clínico se indican en letra magenta y las no clínicas en azul.

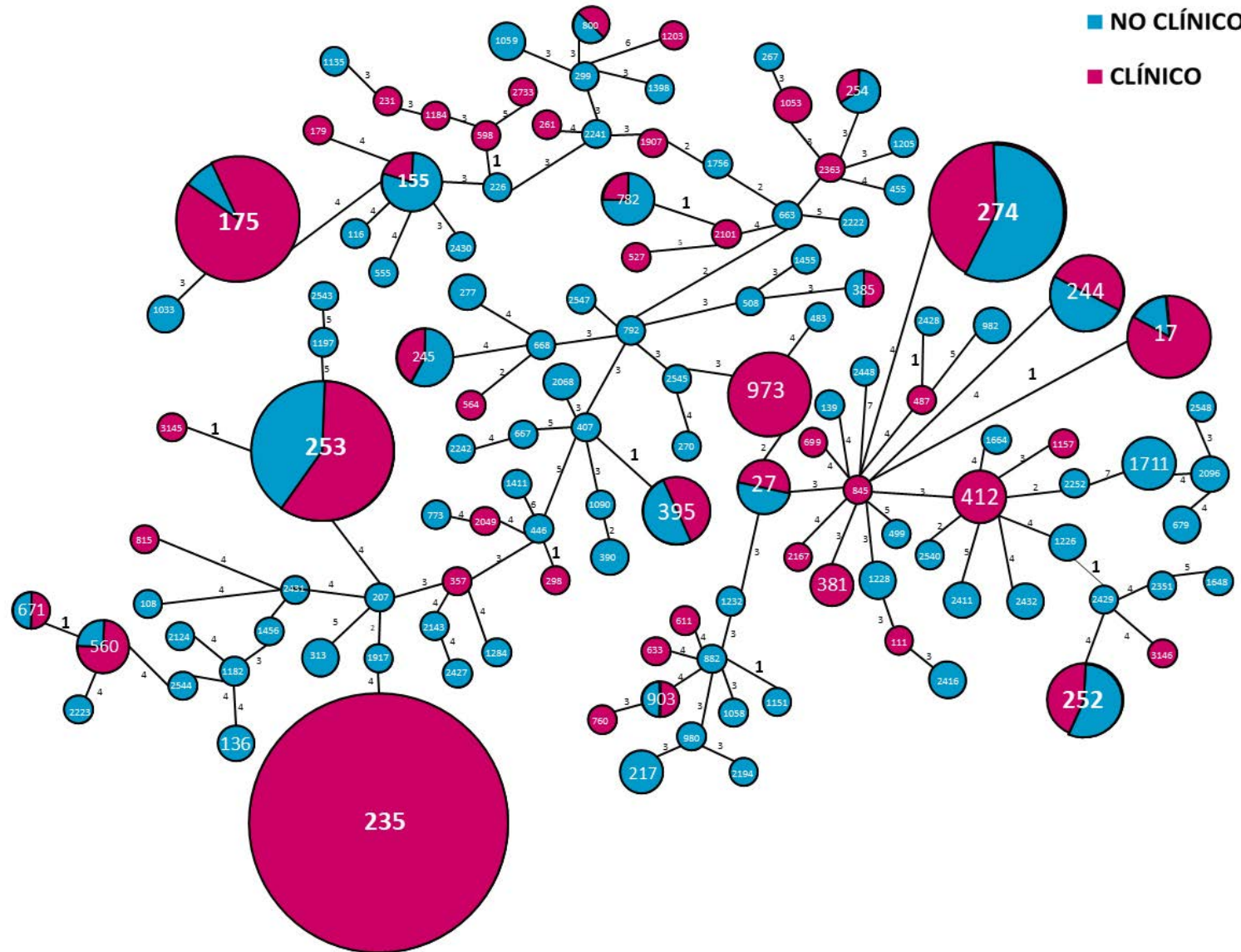


Figura 64. Representación de Phyloviz de todas las STs detectadas entre las cepas de este trabajo. El tamaño de los círculos es proporcional a la cantidad de cepas que presenta dicho ST y los números en las líneas indican el número de alelos que cambian entre los diferentes ST conectados.

Entre todas las cepas de *P. aeruginosa* incluidas en este trabajo, las secuencias tipo más frecuentemente detectadas fueron ST235 (30 cepas, 10,9%), ST253 (15 cepas, 5,5%), ST274 (14 cepas, 5,1%), ST175 (13 cepas, 4,7%), ST244 (8 cepas, 2,9%), ST973 (8 cepas, 2,9%), ST17 (7 cepas, 2,5%), ST252 (7 cepas, 2,5%) y ST395 (6 cepas, 2,2%).

Si atendemos a los diferentes orígenes, las secuencias tipo más prevalentes entre las cepas clínicas fueron: ST235 (30 cepas), ST175 (12 cepas), ST253 (9 cepas), ST973 (8 cepas) y ST17 (6 cepas). Mientras que, entre las cepas no clínicas, con una distribución más heterogénea destacan: ST274 (8 cepas), ST253 (6 cepas), ST155 (4 cepas), ST244 (4 cepas), ST252 (4 cepas) y ST1711 (4 cepas).

Por otro lado, 17 STs se compartían entre ambos orígenes: ST155, ST17, ST175, ST244, ST245, ST252, ST253, ST254, ST27, ST274, ST385, ST395, ST560, ST671, ST782, ST800 y ST903 (Figura 65).

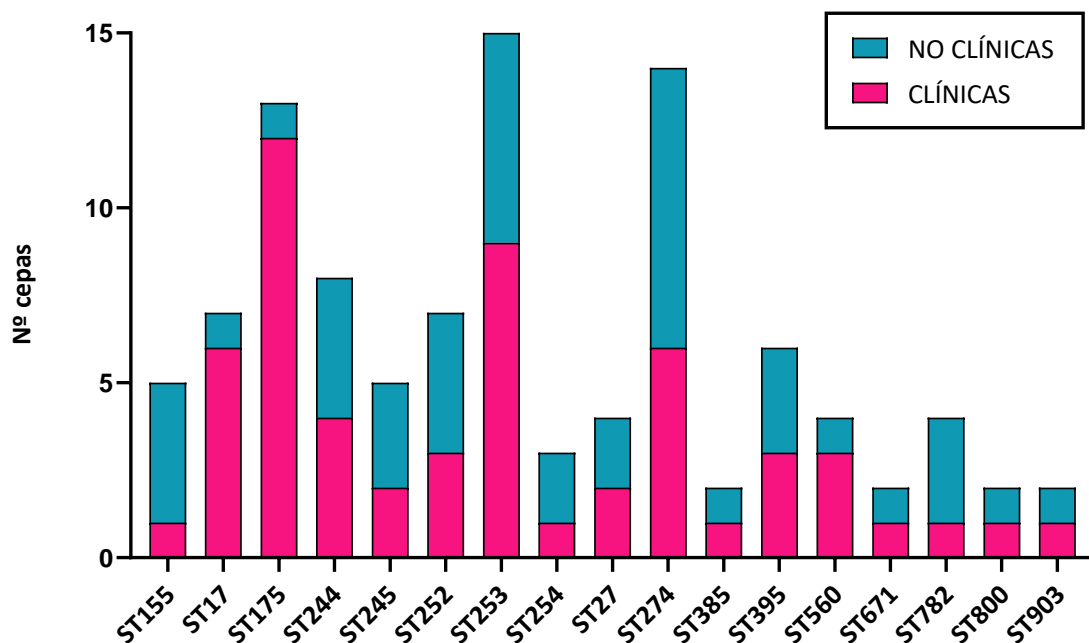


Figura 65. Representación gráfica de los ST compartidos entre las cepas no clínicas (azul) o clínicas (magenta).

Cabe destacar que la mitad de las cepas estaban agrupadas en 18 STs (que corresponden a los STs que agrupan 3 ó más cepas y en esta tesis se denominan “clones mayoritarios”). Se observó un comportamiento más clonal entre las cepas clínicas,

estando un 74% de ellas agrupadas en estos 18 STs. Las cepas no clínicas mostraron una población genómicamente más diversa y solo un 32% de ellas se encontraban en estos 18 STs. Además, 88 STs estaban representados por una única cepa, incluyendo un 32% del total de cepas; y agrupaban un 42% de las cepas no clínicas y un 21% de las cepas clínicas (Figura 64).

Al analizar más exhaustivamente las STs detectadas en función de las diferentes fuentes de aislamiento se puede observar una distribución muy heterogénea (Figura 66), destacando resultados como que ST235, ST412 y ST381 fueron detectados exclusivamente en cepas de origen clínico; ST973 se detectó únicamente en cepas clínicas provenientes del HCULB; ST313 se encontró en cepas no clínicas aisladas en Zaragoza, o los clones ST1711 y ST217 detectados únicamente en cepas aisladas de animales y medioambiente, respectivamente.

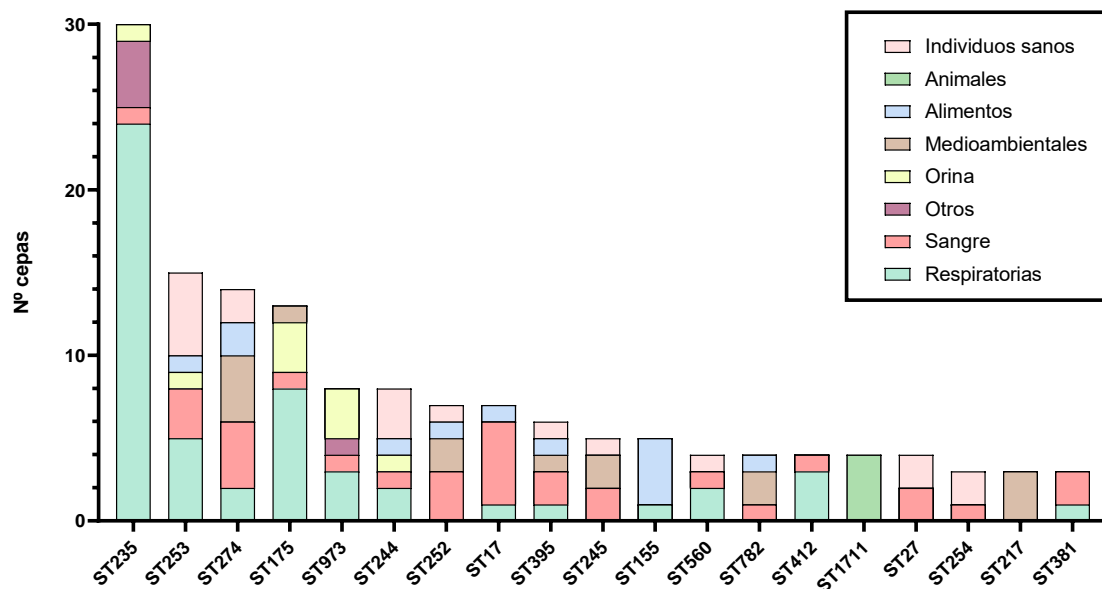


Figura 66. Distribución de las secuencias tipo mayoritarias (aquellas detectadas en más de 3 aislados de *P. aeruginosa*), en los diferentes orígenes de las cepas de *P. aeruginosa* incluidas en el estudio.

De entre los 10 clones de alto riesgo definidos para *P. aeruginosa* a nivel mundial, que incluyen ST235, ST111, ST233, ST244, ST357, ST308, ST175, ST277, ST654 y ST298 (Del Barrio-Tofiño,2020); en nuestro estudio hemos encontrado el ST235 (30 cepas clínicas), ST111 (una cepa clínica), ST244 (8 cepas, 4 de origen clínico y 4 no clínico),

ST357 (una cepa clínica), ST175 (13 cepas, 12 de origen clínico y una no clínico), ST277 (2 cepas no clínicas) y ST298 (una cepa clínica).

Teniendo en cuenta el fenotipo de resistencia a antibióticos, observamos que hay varios STs donde se agrupan mayoritariamente las cepas MDR y XDR (Figura 67), destacando los clones ST175, ST235 y ST244 que además son clones de alto riesgo, el clon internacional ST274 y el clon ST973 que se describe en esta tesis como clon local de alto riesgo.

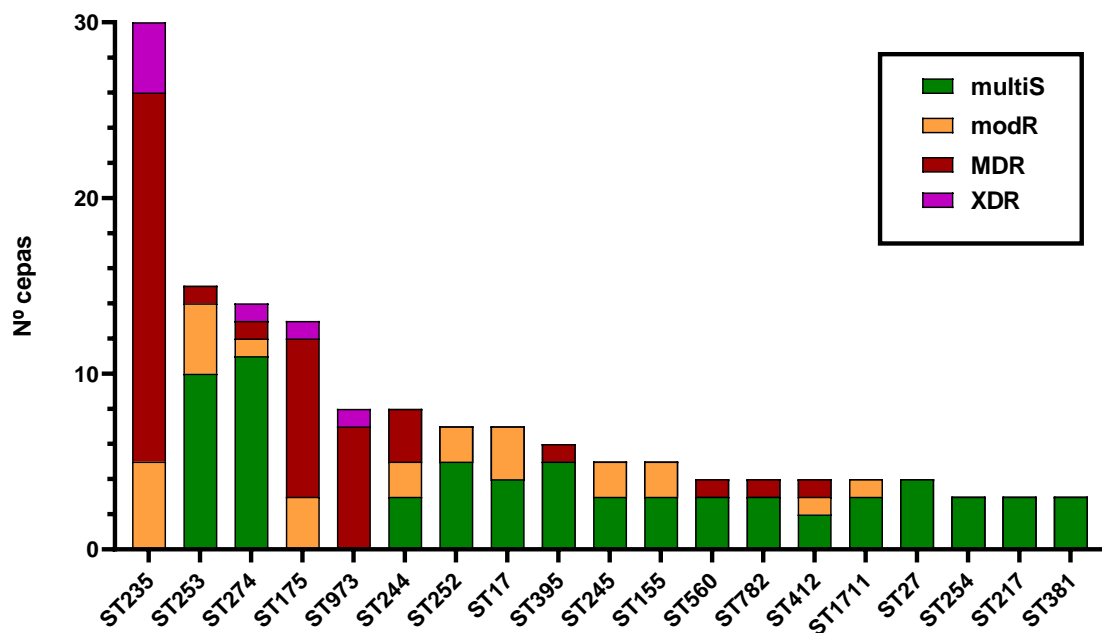


Figura 67. Distribución de las cepas según sus fenotipos de resistencia a antibióticos y sus secuencias tipo mayoritarias (aquellas detectadas en más de 3 aislados de *P. aeruginosa*).

Se observó asociación entre el serotipo y la secuencia tipo en los clones mayoritarios (Figura 68). Sin tener en cuenta los serotipos no tipables que representan la mayoría de las cepas de estos STs mayoritarios, destaca la asociación entre el serotipo O:11 en el ST235; O:10 en ST253; O:3 en el ST274; O:15 en ST973; O:1 en el ST17, O:6 en ST395, O:5 en ST245 y O:3 en ST1711.

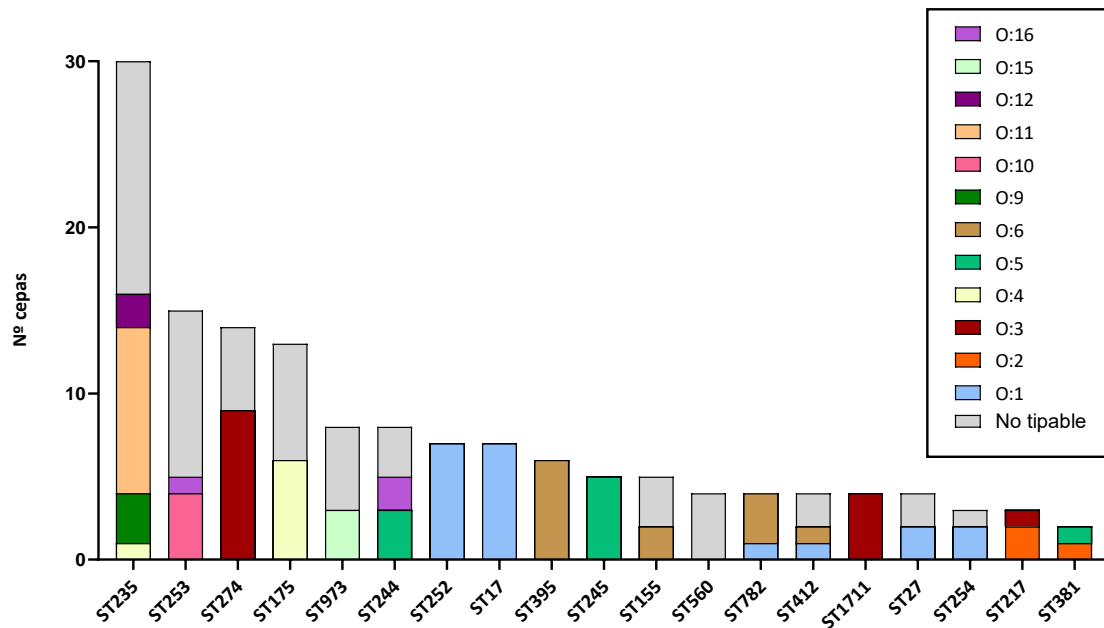


Figura 68: Distribución de las cepas pertenecientes a STs mayoritarios (>3 aislados) según su serotipo.

Utilizando el algoritmo eBURST se determinaron las relaciones entre todas las STs detectadas en las cepas de esta tesis con respecto a todos los descritos (a fecha de febrero de 2020) y se muestran en la Figura 69. Algunas de las cepas pertenecían a complejos clonales ya descritos, como se muestra en los cuadros inferiores de la Figura 69.

Además, en este trabajo se define el complejo clonal 560 (CC560) que incluye el ST560 como founder (ST central) y más de diez SLV (single locus variant) asociados, entre los que se encuentra ST671 de nuestro estudio (Figura 69).

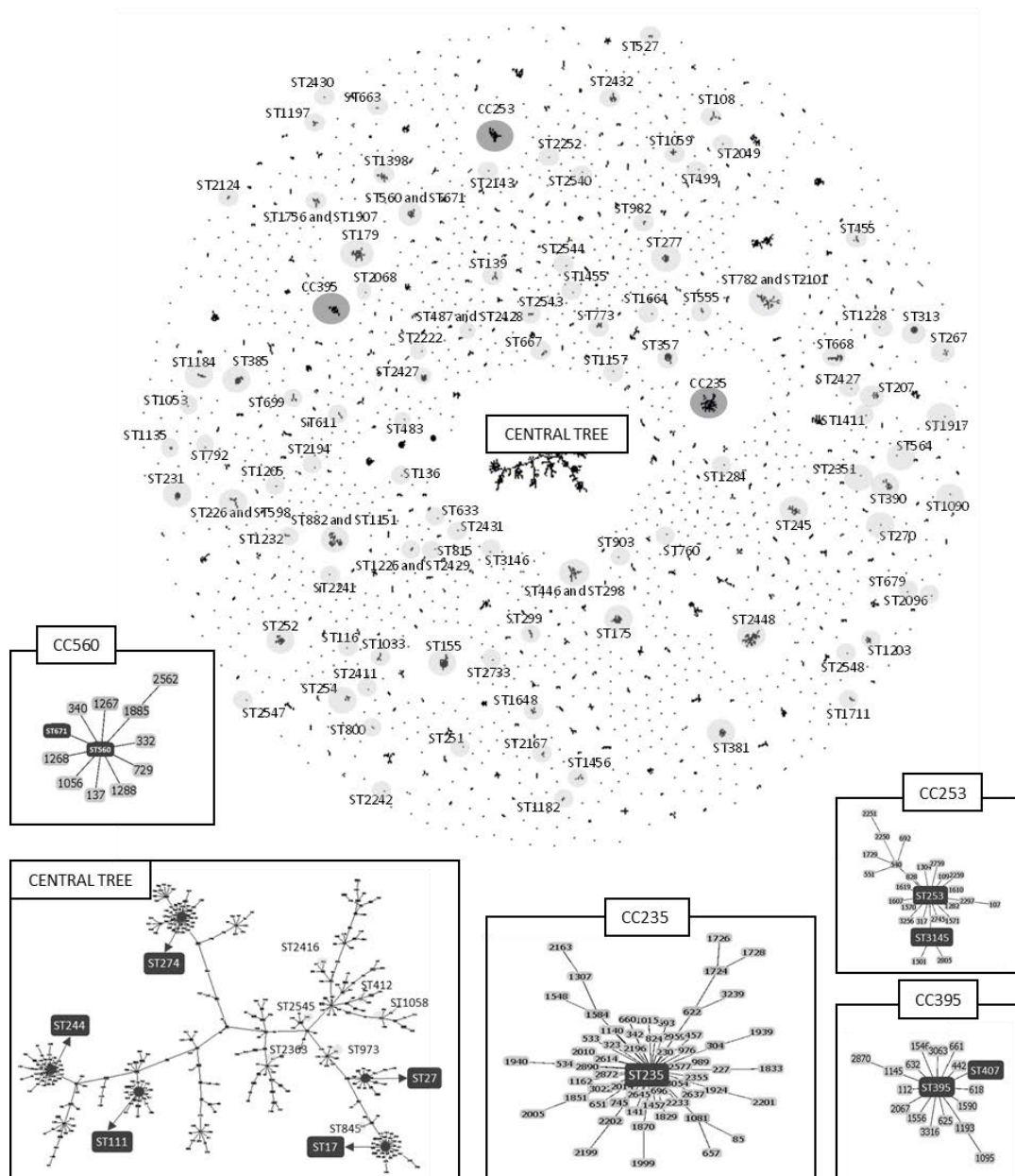


Figura 69. Representación de la nube de STs de *P. aeruginosa* en la que aparecen señaladas todas las STs encontradas en nuestro estudio. En los cuadros inferiores se destacan los complejos clonales previamente descritos. Las cepas sombreadas en gris claro son las encontradas en este estudio y en gris oscuro aquellas que pertenecen a complejos clonales.

1.2.3 PFGE

La relación clonal de las cepas de *P. aeruginosa* de este trabajo se analizó por PFGE. Se estudió el patrón de PFGE (pulsotipo) en las 187 cepas pertenecientes a STs que agrupaban más de una cepa; mientras que se consideró un pulsotipo diferente para todas aquellas cepas únicas con diferentes STs (88 cepas). De este modo, las 275 cepas del estudio se clasificaron en 245 pulsotipos diferentes, detectándose 221 pulsotipos

únicos (detectados en una única cepa) y 24 pulsotipos compartidos por más de una cepa (que agruparon un total de 54 cepas).

Se encontraron 121 pulsotipos entre las cepas clínicas, y 125 pulsotipos entre las cepas no clínicas, de los cuales 9 pulsotipos clínicos agrupaban 19 cepas (14.5%) y 16 pulsotipos no clínicos agrupaban 35 cepas (24.3%). Se detectó sólo un pulsotipo que agrupó a cepas de orígenes diferentes: dos cepas no clínicas G127 y G129 (medioambientales) y una clínica G158 (sangre) compartían el patrón P124.

En la Figura 70 se representan los pulsotipos de las 187 cepas pertenecientes a STs que agrupaban más de una cepa. Se observa que la mayoría de las cepas pertenecientes a un mismo ST aparecen agrupadas, destacando el ST274 y el ST17 por ser clados monofiléticos. El Anexo 3, incluye además el pulsotipo asignado a cada una de las cepas.

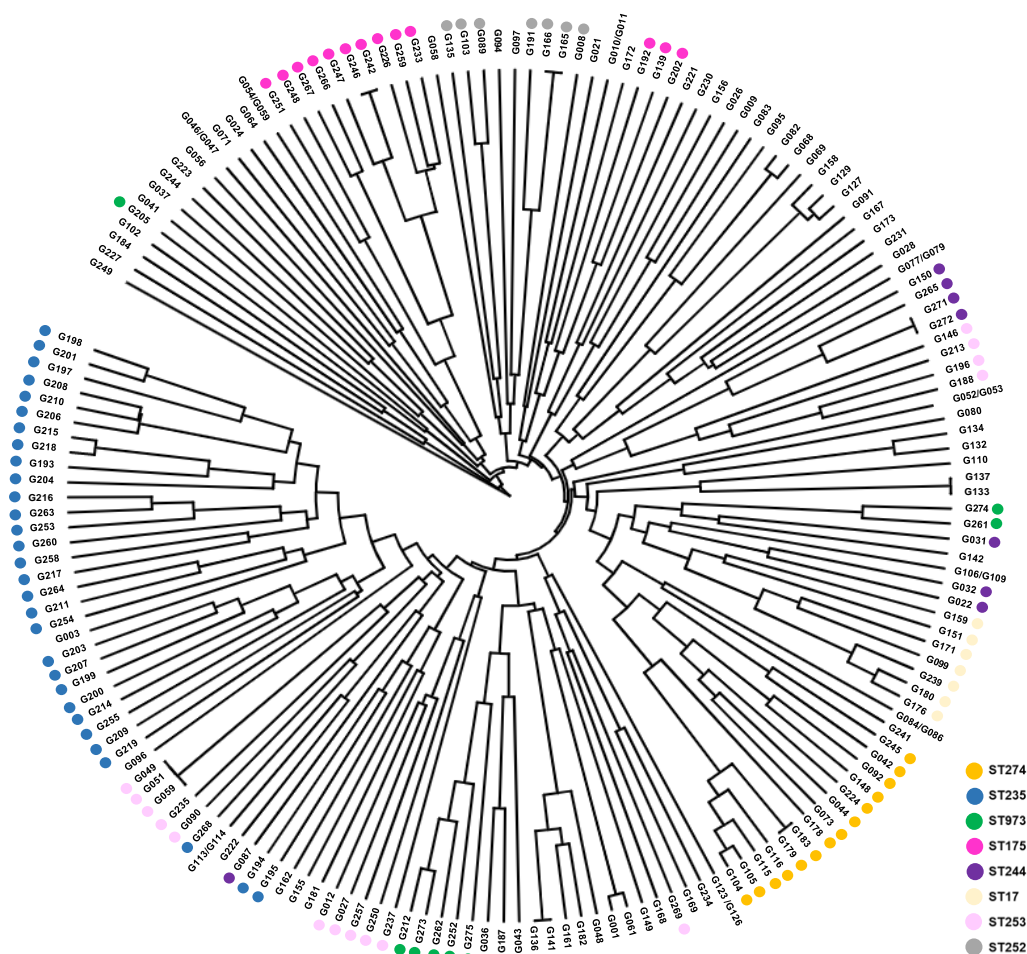


Figura 70. Árbol filogenético construido a partir de los datos de los diferentes pulsotipos de PFGE analizados por GelJ. En la Figura se destacan con círculos en diferentes colores los STs con más de 7 cepas: ST274 (naranja), ST235 (azul), ST973 (verde), ST175 (rosa oscuro), ST244 (morado), ST17 (amarillo), ST253 (rosa claro) y ST252 (gris).

1.3 Estudio de factores de virulencia

En las 275 cepas de *P. aeruginosa* de este trabajo, se ha analizado la presencia de 14 genes implicados en virulencia y *quorum sensing* de esta especie bacteriana: elastasas, proteasas, rhamnosiltransferasas, exotoxinas y exolisinas (*lasA*, *lasB*, *aprA*, *rhlAB*, *exoA*, *exlA*), genes codificantes de efectores del sistema T3SS (*exoU*, *exoS*, *exoY*, *exoT*) y genes del sistema *quorum sensing* (*lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*).

En función de la presencia/ausencia de estos genes, se obtuvieron dieciséis patrones de virulencia (virulotipos) diferentes (V1 a V16) (Tabla 16).

El virulotipo más frecuente fue el V1 (que incluye todos los genes de virulencia analizados, excepto el gen *exoU* y *exlA*) detectado en el 51,6% de las cepas analizadas, seguido del V8 que se detectó en un 20,4%.

Si tenemos en cuenta los orígenes, se han detectado 8 virulotipos diferentes en cepas clínicas y 15 entre las cepas no clínicas. Cabe destacar que el virulotipo V12 se detectó únicamente en una cepa clínica (procedente de un hemocultivo) y los virulotipos V3, V4, V7, V11, V13, V14, V15 y V16 fueron encontrados sólo en cepas de origen no clínico (Tabla 17).

Tabla 16. Virulotipos detectados en las 275 cepas *P. aeruginosa* analizadas en este trabajo.

VIRULOTIPO	<i>exoU</i>	<i>exoS</i>	<i>exoY</i>	<i>exoT</i>	<i>exoA</i>	<i>lasA</i>	<i>lasB</i>	<i>aprA</i>	<i>rhIAB</i>	<i>rhII</i>	<i>rhIR</i>	<i>lasI</i>	<i>lasR</i>	<i>exlA</i>
V1	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
V2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
V3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
V4	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
V5	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
V6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
V7	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
V8	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
V9	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
V10	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
V11	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
V12	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
V13	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
V14	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V15	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Virulotipos definidos en función de la presencia/ausencia de cada uno de los 14 genes. En fondo blanco si el gen estaba presente, gris cuando estaba ausente y en fondo naranja aquellos que tienen alguna peculiaridad que se describe a continuación:

^aG132, G140 y G083 tienen el gen *lasR* truncado por la inserción de *IS1411*, G088 con *ISPst7*, G031 con *ISPpu17*, G166 con *ISPpu21*, G230 y G245 con *ISPsp7*, G228 con *ISPre2*, G046, G047 y G096 con el inicio del gen *lasR* truncado, mostraron un amplicón de menor tamaño del esperado (900bp).

^bG027 tienen *lasR* truncado con *IS1394*, G250 con *ISPa104*, G257 con *ISPsp7* (96%).

^cG075 *lasR* truncado por *ISPre2*.

^dG157 tiene truncado con *ISPa104* los genes *lasR* y *rhIR*.

Tabla 17. Distribución de los diferentes virulotipos detectados en función del origen de las cepas.

Virulotipos*	No clínicas				Clínicas				Total cepas (nº)
	Individuos sanos	Animales	Alimentos	Medioambientales	Sangre	Respiratorio	Orina	Otros	
V1	28	3	28	25	38	18	2	-	142
V2	3	-	3	2	1	3	-	-	12
V3	-	-	2	-	-	-	-	-	2
V4	1	-	2	-	-	-	-	-	3
V5	-	-	-	1	1	8	3	-	13
V6	-	-	-	3	1	3	3	1	11
V7	-	-	3	-	-	-	-	-	3
V8	9	-	2	4	6	29	2	4	56
V9	1	-	-	-	1	1	-	-	3
V1-	7	-	-	3	2	2	-	1	15
V11	-	-	1	-	-	-	-	-	1
V12	-	-	-	-	1	-	-	-	1
V13	-	-	1	-	-	-	-	-	1
V14	-	4	-	1	-	-	-	-	5
V15	-	2	-	2	-	-	-	-	4
V16	2	-	-	1	-	-	-	-	3

*Los virulotipos están definidos en la Tabla 16. El guion indica que no existen cepas con ese virulotipo.

Evaluando la correlación entre virulotipo y fenotipo de resistencia a antibióticos, se observó que la mayoría de las cepas del virulotipo V1 eran cepas sensibles, mientras que algunos virulotipos, como el V5, V11 o V12 sólo se encontraron en cepas resistentes. Es importante destacar también aquellos virulotipos que solo se han detectado en cepas sensibles, como el V4, V13 y V16 (Figura 71).

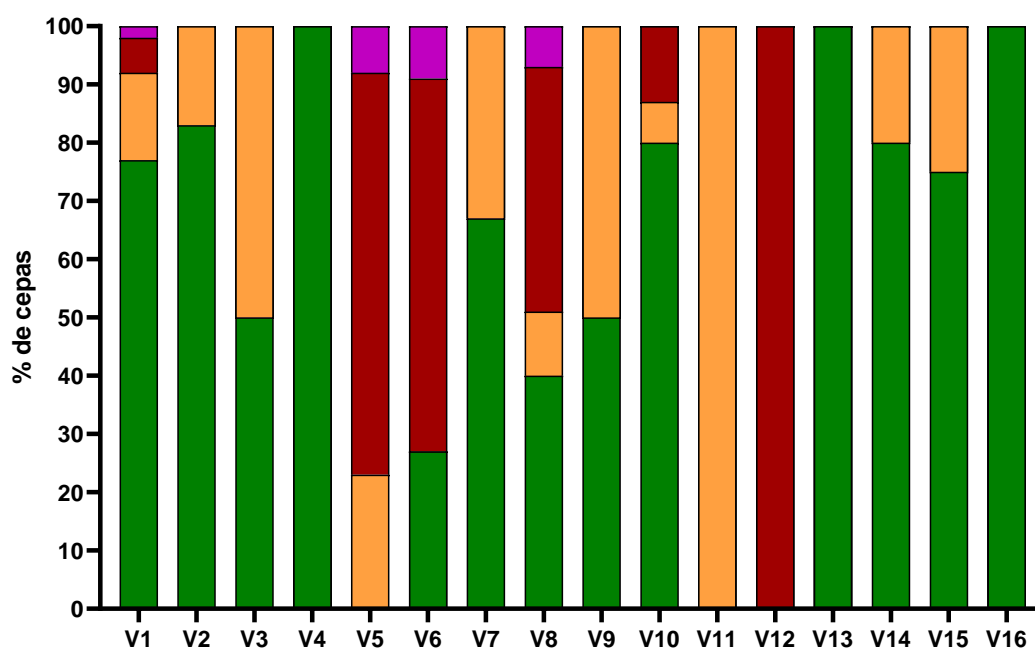


Figura 71: Asociación entre los fenotipos de resistencia a antibióticos y los virulotipos encontrados en las 275 cepas estudiadas. Verde: multiS, naranja: ModR, rojo: MDR, morado: XDR. Los virulotipos están definidos en la Tabla 16.

La prevalencia de detección de genes *exoS* y *exoU* fue la siguiente (% cepas clínicas y no clínicas, respectivamente): *exoS*⁺/*exoU*⁻ 63% y 71%; *exoS*⁻/*exoU*⁺ 37% y 19%; *exoS*⁺/*exoU*⁺ 0% y 2%; *exoS*⁻/*exoU*⁻ 0% y 8%. El gen *exoY* se detectó en el 89% y *exoT* en el 97% de todas las cepas estudiadas. Además, 3 cepas de origen no clínico, aisladas en muestras de individuos sanos y de agua, amplificaron ambos genes, *exoS* y *exoU* (virulotipo V16). Estos resultados se confirmaron por secuenciación.

El gen *exIA* se detectó en 9 cepas de *P. aeruginosa* que carecían del T3SS (G052, G053, G054, G056, G058, G059, G123, G126 y G131), eran cepas no clínicas aisladas de animales sanos (6) y medioambiente (3) y pertenecientes a los virulotipos V14 y V15. Otras dos cepas, aisladas de alimentos, carecían de los genes *exoS*, *exoU* y *exIAB*, pero poseían los genes *exoY* y *exoT* del T3SS.

Todas las 275 *P. aeruginosa* analizadas amplificaron los genes *lasA*, *lasB* y *aprA*. Con respecto a los genes relacionados con el *quorum sensing*, la mayoría de las cepas estudiadas amplificaron los genes *lasR*, *lasI*, *rhIR* y *rhII* (248 cepas, 90,2%). Sin embargo, en algunas de ellas el gen *lasR* o ambos genes, *lasR* y *rhIR* mostraban tamaños mayores (>2000 pb) o menores (<1000 pb) de lo esperado por la presencia de secuencias de inserción o la delección de nucleótidos. Así, 17 cepas tenían afectado el gen *lasR* (7 de origen clínico y 10 no clínico) por deleciones o por la inserción de las secuencias IS1411, ISPst7, ISPpu17, ISPpu21, ISPsp7, ISPre2, IS1394, o ISPa104 (Figura 72). Una cepa clínica procedente de un hemocultivo (G157) tenía truncados ambos genes *lasR* y *rhIR* con la misma IS (ISPa104). Por otro lado, resulta destacable que las 13 cepas que no amplificaron los genes *rhII*, *rhIR* y *rhIAB* (virulotipo V5) pertenecían al ST175. El gen *lasR* no amplificó en las tres cepas ambientales multisensibles del clon ST217 ni en las 8 cepas clínicas XDR del clon ST973. Ambos genes *lasI* y *lasR* no amplificaron en tres cepas (G068, G082 y G095) de origen alimentario, pertenecientes al ST155.

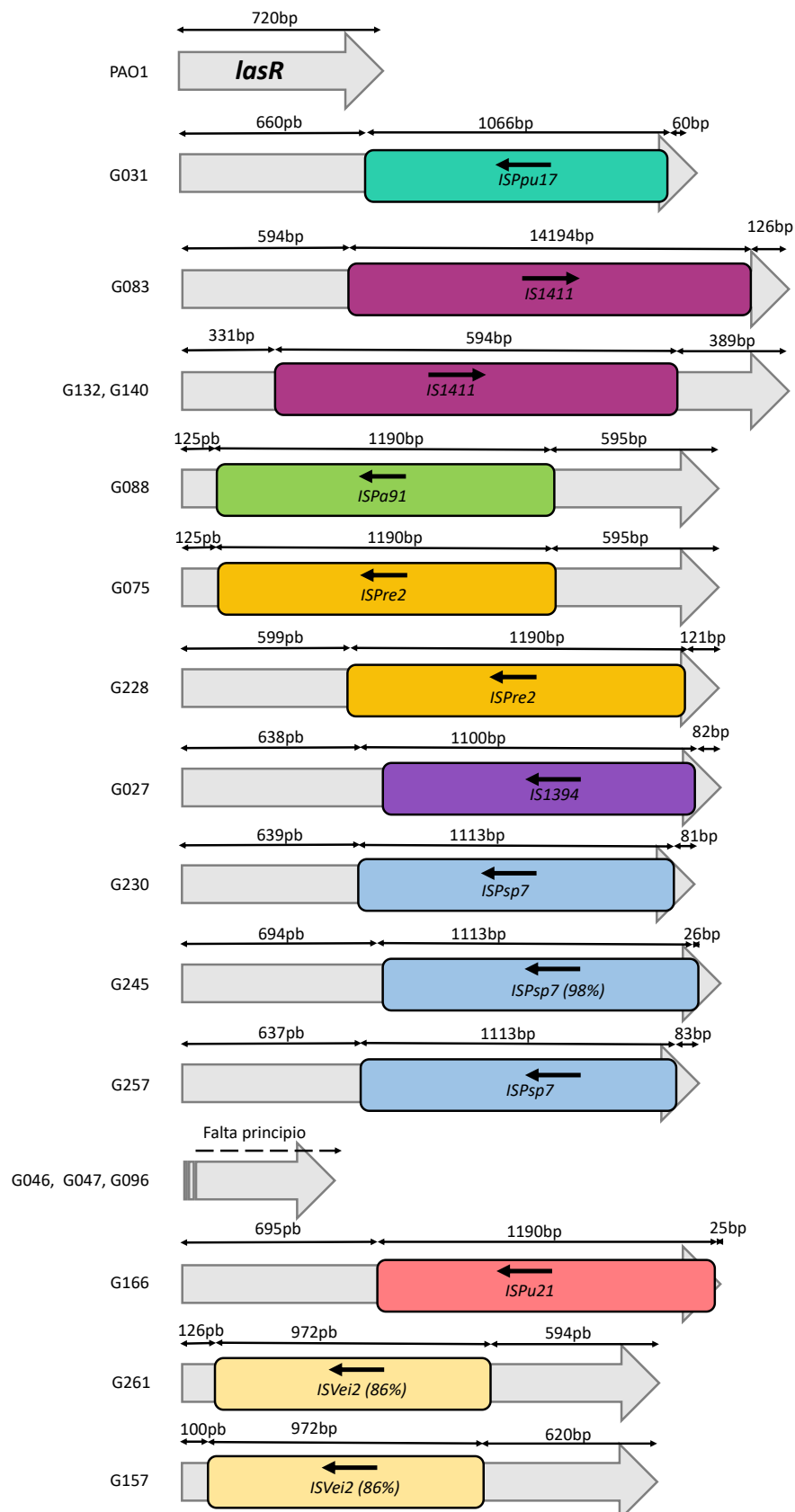


Figura 72: Diferentes estructuras del gen *lasR* encontradas en las cepas de *P. aeruginosa* analizadas en este estudio, en comparación con el gen *lasR* completo de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 (número de acceso de GenBank GCF_000006765.1). Las medidas de las flechas e IS son proporcionales.

1.4 Formación de biofilm

Se cuantificó la producción de biomasa total de biofilm mediante cristal violeta (CV) y la actividad metabólica dentro del biofilm mediante diacetato de fluoresceína (FDA) en las 275 cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico y no clínico, tal y como se explicó en Material y Métodos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 73 y en el Anexo 3, representando el porcentaje de producción comparado con la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 (considerada 100%). Así los rangos de producción de biomasa de biofilm resultaron entre 10,9% y 1120,8%, siendo mayor que la cepa de referencia en 159 cepas (58%), de las cuales 63 fueron clínicas (48%) y 96 no clínicas (67%). Al analizar la actividad metabólica de las bacterias dentro del biofilm se observó un rango de producción entre 2,7% y 1214,1%, siendo mayor que PAO1 en 127 cepas (46%) (60 clínicas (46%) y 67 no clínicas (46%)).

La producción de biomasa del biofilm fue significativamente mayor en las cepas no clínicas que en las clínicas. Además, los resultados obtenidos por ambos métodos muestran correlación (según el estadístico de Pearson) (Figura 73).

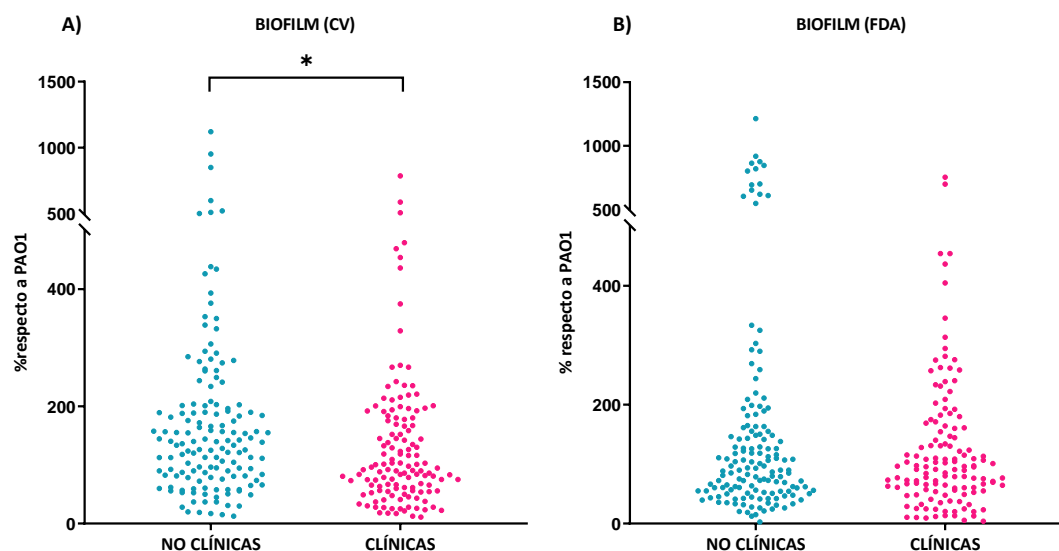


Figura 73: Análisis de la producción de biofilm en cepas clínicas y no clínicas. A) Biomasa de biofilm (método CV): $p=0,0167$; **B)** Actividad metabólica dentro del biofilm (método FDA).

Además, las 275 cepas de esta tesis se clasificaron en base a una escala de producción de biofilm baja, media, alta y muy alta, atendiendo a los siguientes criterios:

i) producción baja, cuando el porcentaje de producción es inferior al 100% de PAO1 ($\leq 100\%$); ii) producción media, incluye la franja entre el 100% de PAO1 y la media de la producción de las 275 cepas más la desviación típica ; es decir, un 303% para la biomasa de biofilm ($>100-303\%$) y 324% para la actividad metabólica dentro del biofilm ($>100-324\%$); iii) producción alta, cuando los valores se encuentran entre los rangos $>303-500\%$ y $>324-500\%$ para la biomasa de biofilm y la actividad metabólica dentro del biofilm, respectivamente; iv) producción muy alta, cuando el porcentaje de producción es $>500\%$ en ambos análisis (Figura 74).

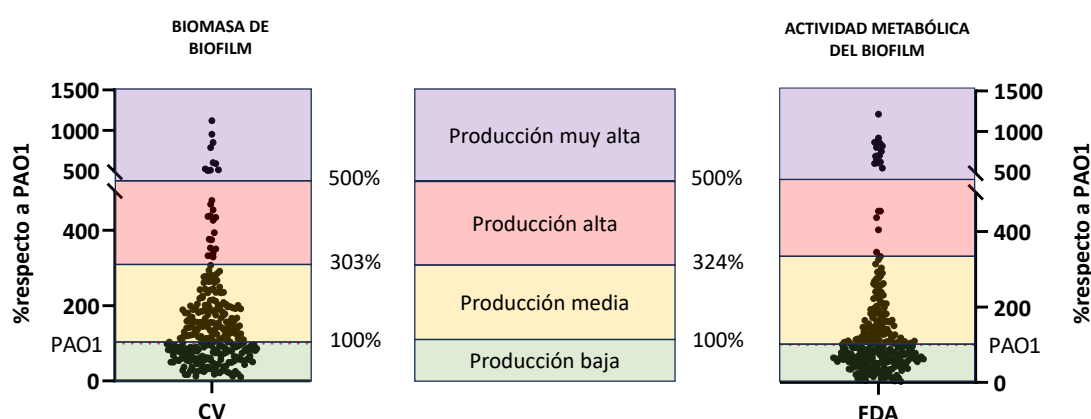


Figura 74: Escala de categorización de la producción de biofilm analizando la biomasa del biofilm (método CV) y la actividad metabólica dentro del biofilm (método FDA). Se establece el código de colores producción baja (verde), producción media (naranja), producción alta (rojo) y producción muy alta (morado).

Las cepas con mayor producción de biomasa y actividad metabólica dentro del biofilm fueron G134 (1121%) y G132 (1214%), respectivamente. Ambas cepas se aislaron de la misma muestra ambiental, eran multisensibles, con serotipo O:2 y pertenecían al ST2068; aunque no presentaban ni el mismo patrón de PFGE ni el mismo virulotipo (virulotipo V1 y V2, respectivamente).

Al analizar la producción de biofilm en función de los orígenes específicos de cada cepa, observamos unas distribuciones bastante semejantes por origen (Figura 75 y la Tabla 18).

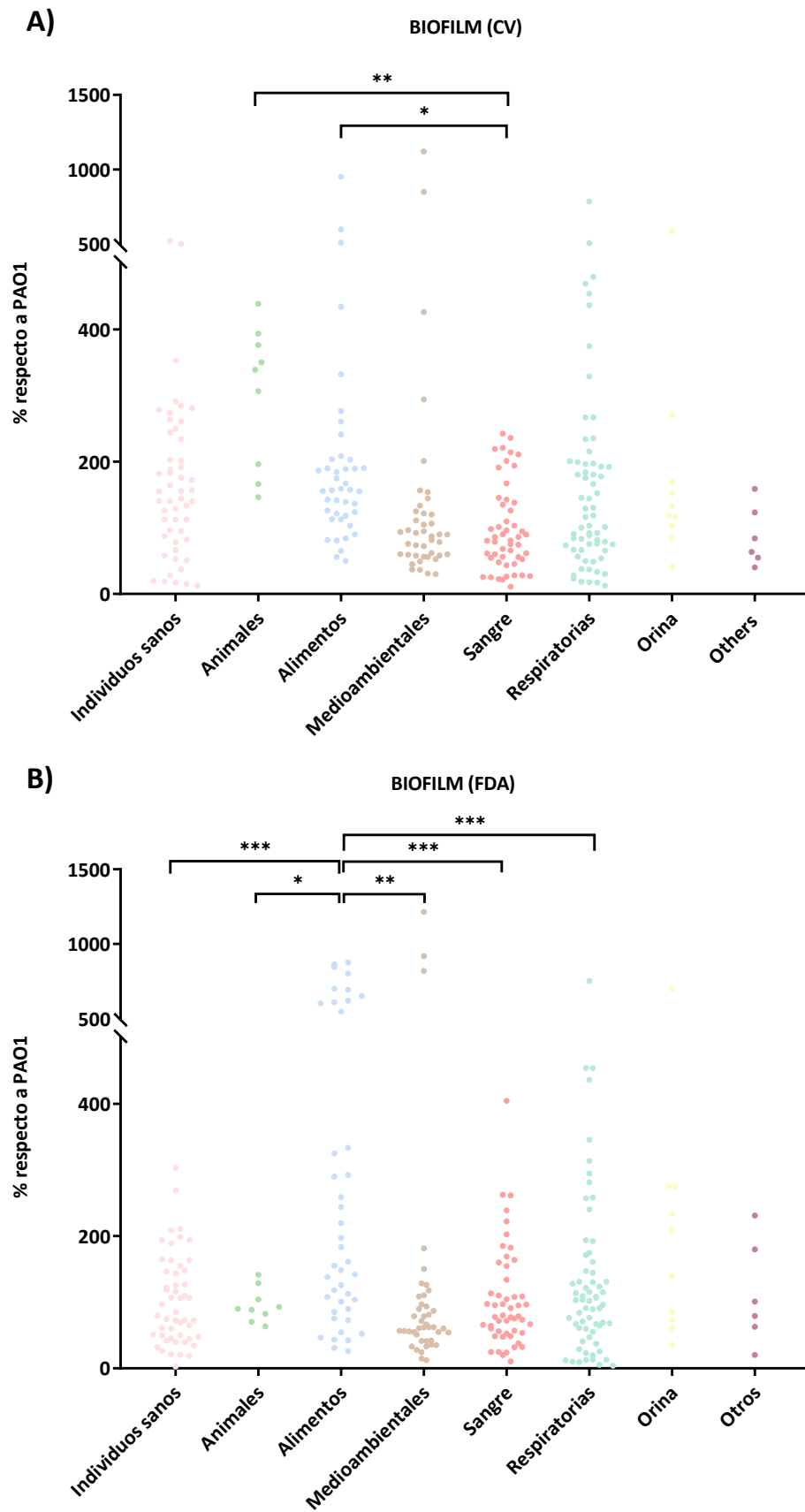


Figura 75: Análisis de la producción de biofilm comparando los diferentes orígenes. A) Biomasa del biofilm (método CV); B) Actividad metabólica dentro del biofilm (método FDA). * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, * $p < 0,001$.**

Entre los resultados destaca el alto porcentaje de biomasa del biofilm (CV) y viabilidad bacteriana dentro del biofilm (FDA) producida por las cepas procedentes de animales y de alimentos, respectivamente. Por otro lado, se observa, dentro de las cepas clínicas, que las procedentes de orina son las que tienen una mayor producción de biofilm (Tabla 18).

Tabla 18. Producción de biofilm detectado según el origen de la cepa.

Origen		Producción (% respecto a PAO1) de:			
		Biomasa de biofilm		Actividad metabólica dentro del biofilm	
		Rango CV	CV50 ^a	Rango FDA	FDA50 ^a
Clínicas	Respiratorio	13 – 788	116,1	4 - 753	103,1
	Sangre	11 – 242	80,9	10 – 405	78,7
	Orina	41 - 588	132,8	35 - 700	209,0
	Otros	40 - 159	83,9	20 - 231	101,0
	Total	11 - 788	94,6	4 - 753	95,3
No clínicas	Individuos sanos	13 – 521	155,5	3 – 303	84,9
	Alimentos	50 – 952	157,6	26 - 876	161,4
	Medioambientales	30 - 1121	89,8	12 - 1214	62,2
	Animales	146 - 439	338,8	64 - 142	90,0
	Total	30 - 1121	140,5	3 - 1214	93,0

^a Porcentaje de producción observado en el 50% de las cepas de cada origen.

Analizando las cepas en función de la producción de biofilm y sus diferentes fenotipos de resistencia a antibióticos (Figura 76), se observó que las cepas más sensibles eran más productoras y al aumentar el nivel de resistencia disminuían los porcentajes de la producción de biofilm, hasta observarse que las cepas XDR eran las menores productoras de biofilm por CV y FDA.

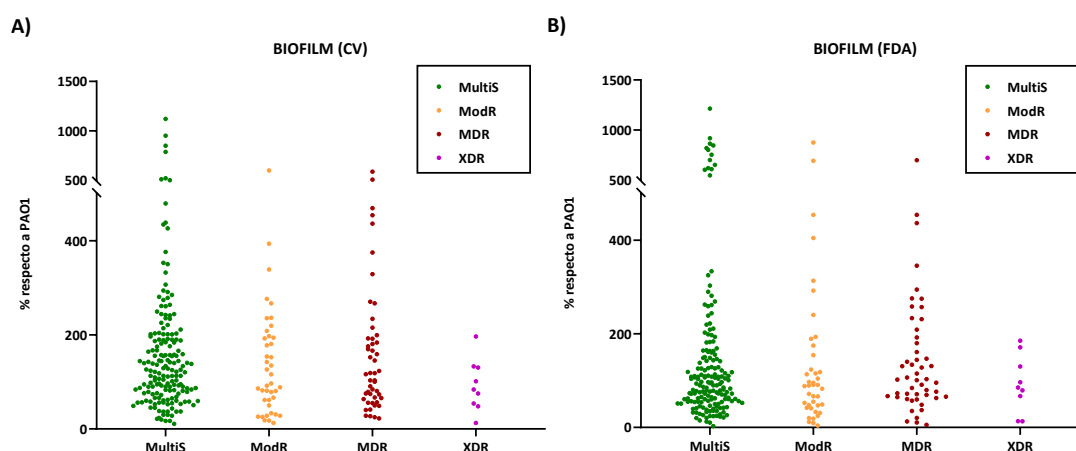


Figura 76. Distribución de las 275 cepas en función de la producción de biofilm (CV y FDA) y los fenotipos de resistencia a antibióticos.

Como LasR y RhIR están implicados en la regulación de la formación de biofilm en *P. aeruginosa*, se analizó la producción de biofilm en relación con la presencia/ausencia de los genes *lasR* y/o *rhIR* en las 275 *P. aeruginosa* estudiadas. Se consideraron QS-negativas las cepas que no amplificaron *lasR* y/o *rhIR* o los tenían alterados por la presencia de deleciones o por inserciones; es decir, las 45 cepas incluidas en los virulotipos V2, V5, V6, V7, V9, V11 y V12. Se han encontrado diferencias significativas al analizar la actividad metabólica dentro del biofilm (FDA), como se muestra en la Figura 77, donde se observa que la producción de biofilm de las cepas QS-negativas era superior a las de las QS-positivas.

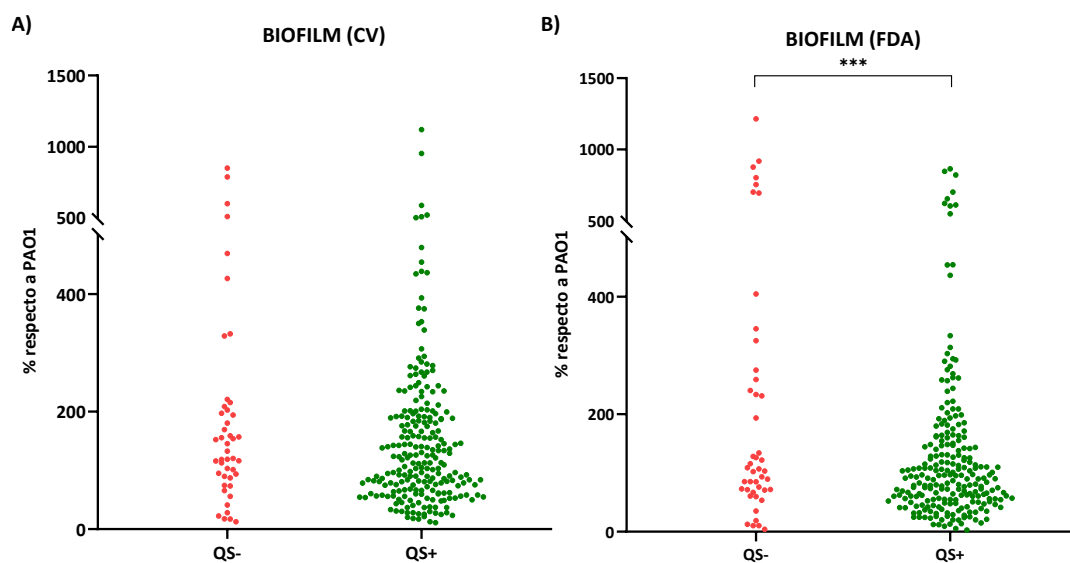


Figura 77. Producción de biofilm (CV y FDA) en las cepas QS-positivas y QS-negativas. Se consideraron cepas QS-negativas las pertenecientes a los virulotipos V2, V5, V6, V7, V9, V11 y V12.

1.5 Análisis de la producción de pigmentos.

Se determinó la producción de los pigmentos pirocianina y piorrubina en las 275 cepas de *P. aeruginosa* de diferentes orígenes, mediante los ensayos detallados en Material y Métodos. Los resultados se muestran en la Figura 78 y en el Anexo 3, representando en porcentajes la producción de pigmentos comparados con los de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 (considerada 100%). Cabe destacar, que las cepas no clínicas produjeron significativamente más pirocianina que las cepas clínicas, mientras que la producción de piorrubina es similar en ambos orígenes.

Un total de 135 cepas (49%), 47 clínicas (36%) y 88 no clínicas (61%), mostraron una producción de piocianina mayor que la cepa de referencia PAO1, con un porcentaje de producción de entre 100,86 y 7.013,92 %. En cuanto a la piorrubina, 172 cepas (62%), produjeron mayor cantidad de pigmento que la cepa *P. aeruginosa* PAO1, con un porcentaje de producción de entre 100 y 6.880%, siendo 71 cepas clínicas (54%) y 91 no clínicas (63%).

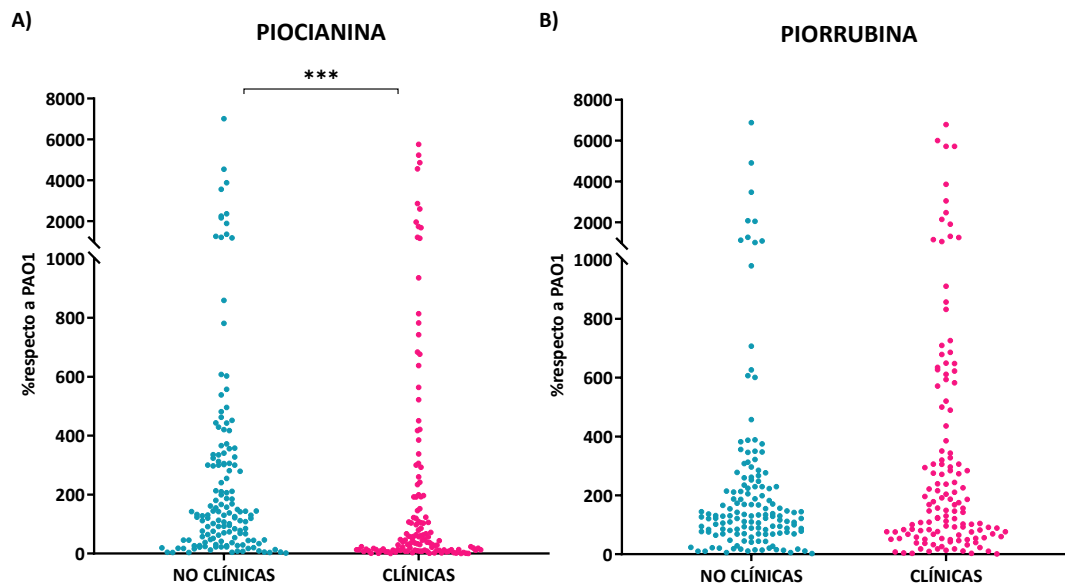


Figura 78: Análisis de la producción de pigmentos en cepas clínicas (magenta) y no clínicas (azul). A) Piocianina, $p < 0,0001$; B) Piorrubina.

Se clasificaron las 275 *P. aeruginosa* según una producción de pigmentos baja, media, alta y muy alta, atendiendo a los siguientes criterios: i) producción baja, cuando el porcentaje de producción es inferior al 100% de PAO1 ($\leq 100\%$); ii) producción media, incluye la franja entre el 100% de PAO1 y la media de la producción de las 275 cepas más la desviación típica; es decir, un 1.288 % para la producción de piocianina ($>100-1.288\%$) y 1.383% para piorrubina ($>100-1.383\%$); iii) producción alta, cuando los valores se encuentran entre los rangos $>1.288-2000\%$ y $>1.383-2000\%$ para piocianina y piorrubina, respectivamente; iv) producción muy alta, cuando el porcentaje de producción es $>2000\%$ para ambas fenacinas (Figura 79).

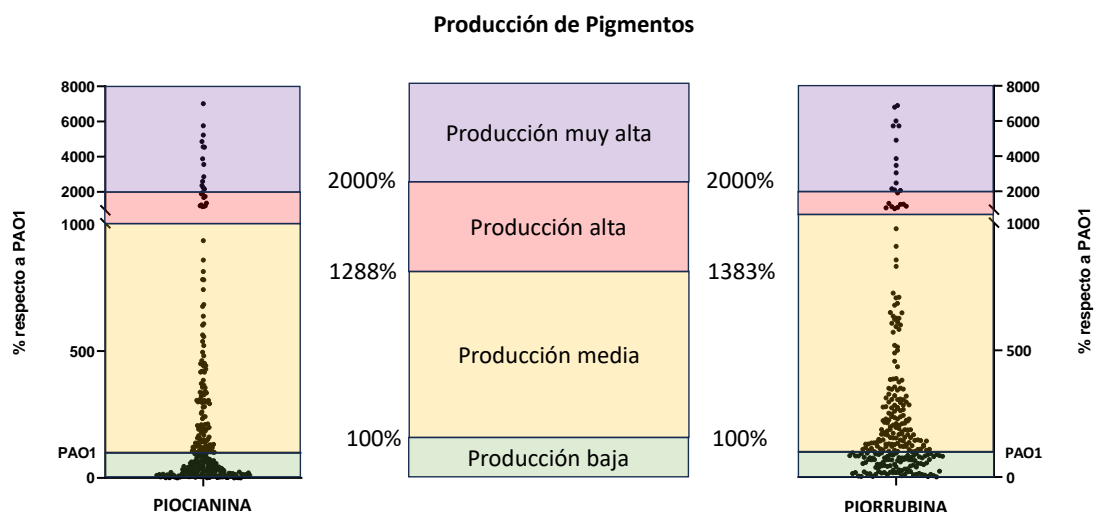


Figura 79: Escala de categorización de la producción de pigmentos. Se establece el código de colores producción baja (verde), producción media (naranja), producción alta (rojo) y producción muy alta (morado).

Cinco cepas no clínicas (G083, G085, G088, G102, G142) y 4 clínicas (G154, G156, G235, G237) fueron productoras muy altas de ambas fenacinas (>2.000%), destacando la excepcionalmente elevada producción (7.014% para piocianina y 4.902% para piorrubina) de la cepa multisensible G085 procedente de una muestra de alimentos (calabacín). Por otra parte, se detectaron porcentajes <1% de producción de piocianina en seis cepas (G204, G215, G218, G251, G251, G260), todas ellas de origen clínico, no-multisensibles, pertenecientes a los ST175, ST235 y ST253, y con producción baja (<33%) de piorrubina.

Si tenemos en cuenta los diferentes orígenes, los rangos de producción de pigmentos se resumen en la Tabla 19. En la Figura 80 se observa que únicamente existen diferencias significativas en la producción de piorrubina entre las cepas de individuos sanos y las respiratorias.

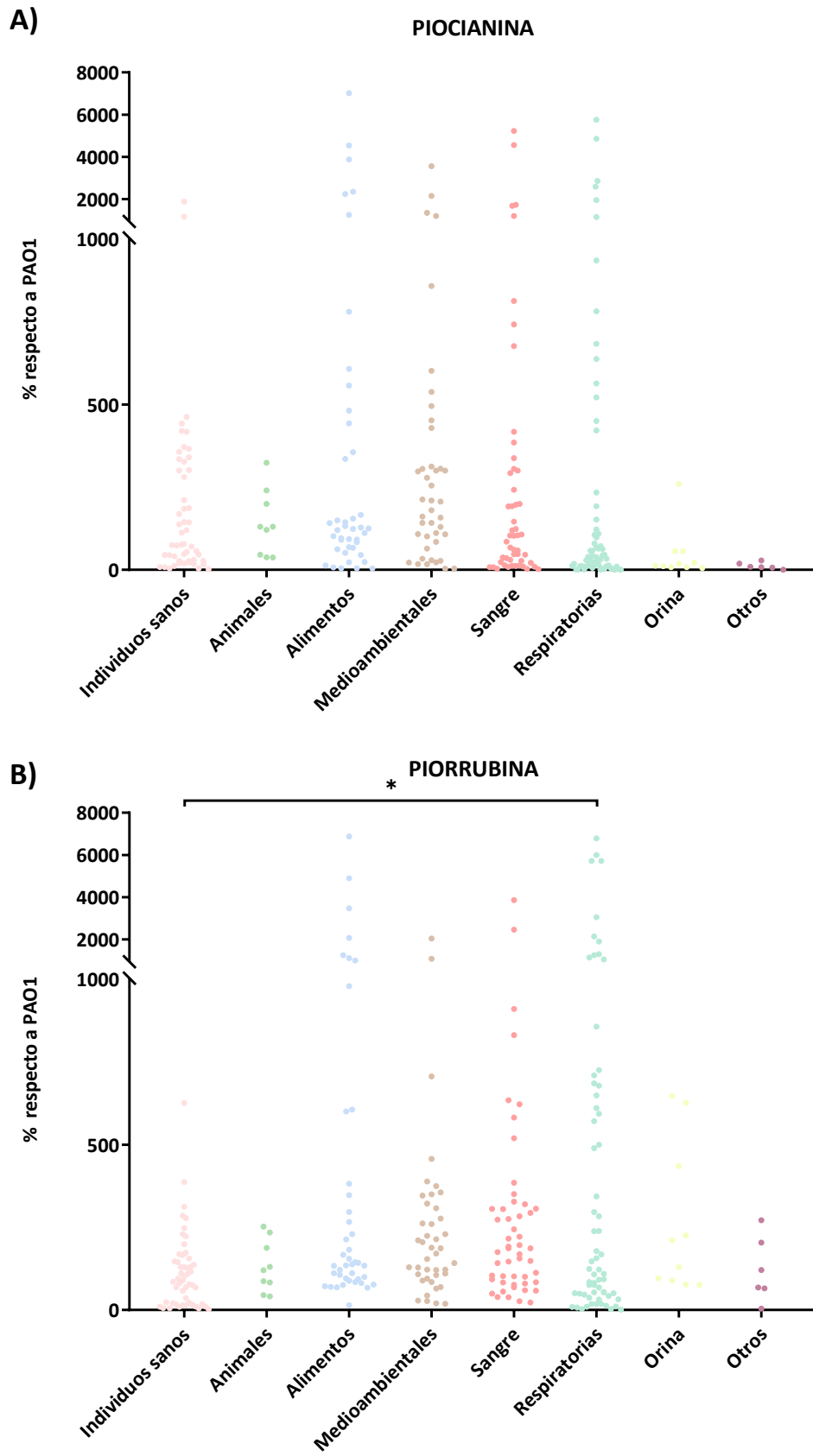


Figura 80: Análisis de la producción de pigmentos comparando los diferentes orígenes. A) Picrocyanina. B) Picrorubina (* $p=0,019$).

Tabla 19. Producción de pigmentos según el origen de la cepa.

Origen		Producción (% respecto a PAO1) de:			
		Piocianina		Piorrubina	
		Rango PCIA	PCIA50 ^a	Rango PRUB	PRUB50 ^a
Clínicas	Respiratorio	0 – 5.757	39,5	1 – 6.786	123,8
	Sangre	2 – 5.230	102,9	23 – 3.857	186,6
	Orina	5 – 260	18,7	76 – 648	210,7
	Otros	0 – 28	9,4	4 – 271	120,6
	Total	0 – 5.757	43,6	1 – 6.786	156,1
No clínicas	Individuos sanos	2 – 1885	101,2	2 – 626	89,4
	Alimentos	4 – 7.014	125,4	14 – 6.880	142,6
	Medioambientales	3 – 3.559	206,5	19 – 2.043	186,4
	Animales	37 – 324	130,2	45 – 253	120,5
	Total	2 – 7.014	130,2	2 – 6.880	130,2

^a Porcentaje de producción observado en el 50% de las cepas de cada origen.

Entre el gran número de cepas no clínicas con producción alta de piocianina y piorrubina, destacan especialmente las cepas de origen ambiental. Por otra parte, resulta destacable que el 50% de cepas aisladas de respiratorio, orina u otros producían menos de un 40% de piocianina, pero más de 121% de piorrubina (Tabla 19).

En relación con el fenotipo de resistencia (Figura 81), se observa que la producción de piocianina, como ocurría con la producción de biofilm, parece inversamente proporcional al nivel de resistencia. En el caso de la piorrubina, no se observa esta relación, sino que observamos un gran rango de producción similar para todos los fenotipos de resistencia.

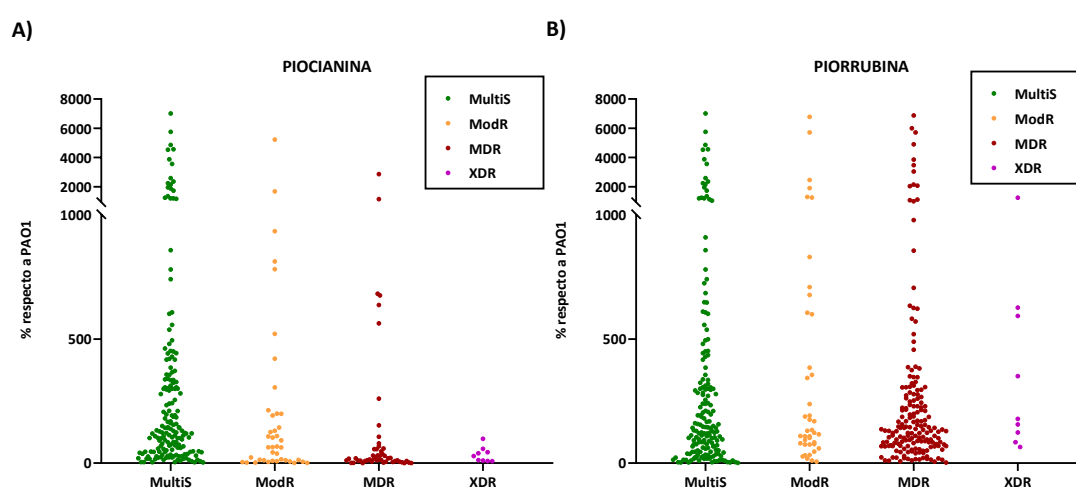


Figura 81: Distribución de la producción de pigmentos (piocianina y piorrubina) y los fenotipos de resistencia a antibióticos.

Los genes de *quorum sensing* están implicados en la producción de pigmentos en *P. aeruginosa* por lo que se analizó la producción de piocianina y piorrubina en las 45 cepas QS-negativas (pertenecientes a los virulotipos V2, V5, V6, V7, V9, V11 y V12) en comparación con el resto de cepas QS-positivas. La Figura 82 muestra que la producción de piocianina fue mayor en las cepas QS-positivas, pero sólo se observaron diferencias significativas en la producción de piorrubina que fue menor en las cepas QS-positivas. Resulta destacable que en las 13 cepas del virulotipo V5 y pertenecientes al clon ST175; así como en las 11 cepas del virulotipo V6 y pertenecientes a los clones ST973 y ST217, los valores de producción de piocianina fueron muy inferiores al de PAO1 (rangos 1-67% y 2-17%, respectivamente).

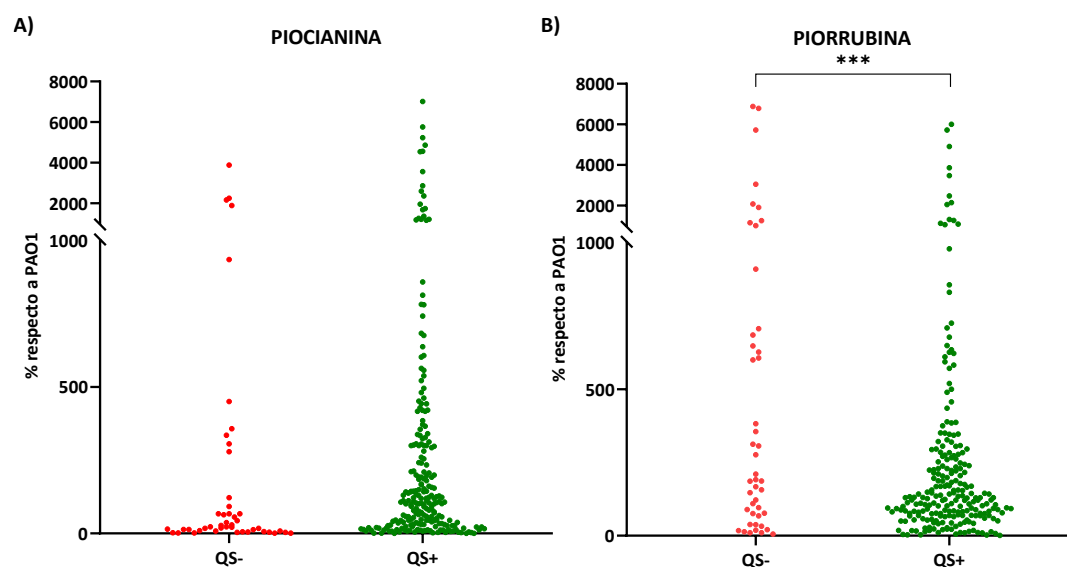


Figura 82. Producción de pigmentos (piocianina y piorrubina) entre las cepas QS-positivas y QS-negativas. Se consideraron cepas QS-negativas las pertenecientes a los virulotipos V2, V5, V6, V7, V9, V11 y V12.

1.6 Análisis de la actividad elastasa.

El estudio de la actividad enzimática elastasa se llevó a cabo en las 275 cepas de *P. aeruginosa*, usando la elastina Congo red como sustrato, tal y como se describe en el Apartado 15 de material y métodos.

La Figura 83 muestra el porcentaje de producción de elastasa de todas las cepas en comparación con la producida por la cepa de referencia PAO1 (considerada 100% de producción). Un total de 120 cepas (43,6%) mostraron más actividad elastasa que la

cepa control *P. aeruginosa* PAO1, siendo 36 clínicas (27,5%) y 84 no clínicas (58%). Las cepas no clínicas mostraron una actividad elastasa significativamente mayor que las cepas clínicas.

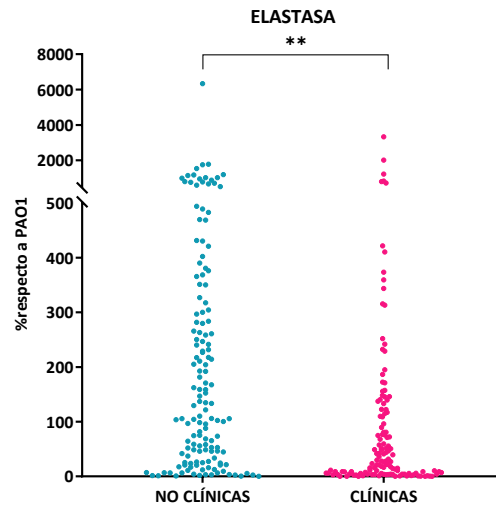


Figura 83: Análisis de la producción elastasa comparando cepas clínicas (magenta) y no clínicas (azul). $p=0,0077$.

Se clasificaron las 275 cepas según una escala de actividad elastasa baja, media, alta y muy alta, atendiendo a los siguientes criterios: i) producción baja, cuando el porcentaje de producción es inferior al 100% de PAO1 ($\leq 100\%$); ii) producción media, incluye la franja entre el 100% de PAO1 y 733% que es la media de la producción de elastasa de las 275 cepas más la desviación típica ($>100-733\%$); iii) producción alta, cuando los valores se encuentran entre >733 y 2000% ; iv) producción muy alta, cuando el porcentaje de producción es $>2000\%$ (Figura 84).

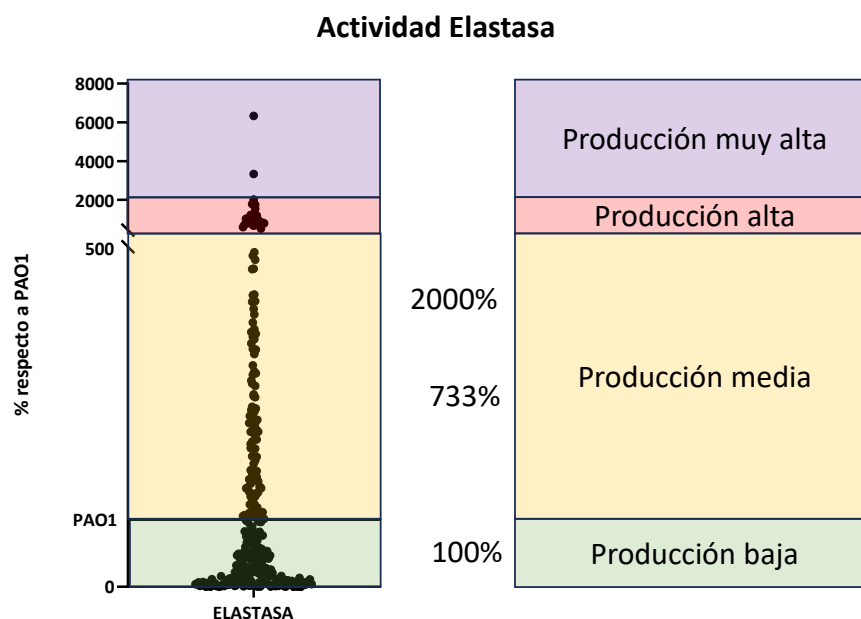


Figura 84: Escala de categorización de la producción de elastasa. Se establece el código de colores producción baja (verde), producción media (naranja), producción alta (rojo) y producción muy alta (morado).

Entre las 20 cepas con producción alta/muy alta de elastasa (9 medioambientales, 6 alimentos, 4 hemocultivos y una de respiratorio), la cepa con mayor producción fue la cepa multisensible G085 aislada de la muestra de calabacín (6.331%), caracterizada por su excepcionalmente alta producción de pigmentos, como se indicó en el apartado anterior. Destacan también las cepas clínicas G154 y G156, ambas procedentes de hemocultivos, con una producción muy alta de elastasa; que también presentaron una muy elevada producción de piocianina y piorrubina.

El análisis de los resultados obtenidos para la actividad elastasa, comparando las cepas estudiadas en función de su origen, reveló diferencias significativas al comparar individuos sanos vs. alimentos ($p=0,005$) y alimentos vs. respiratorio ($p=0,001$) (Figura 85).

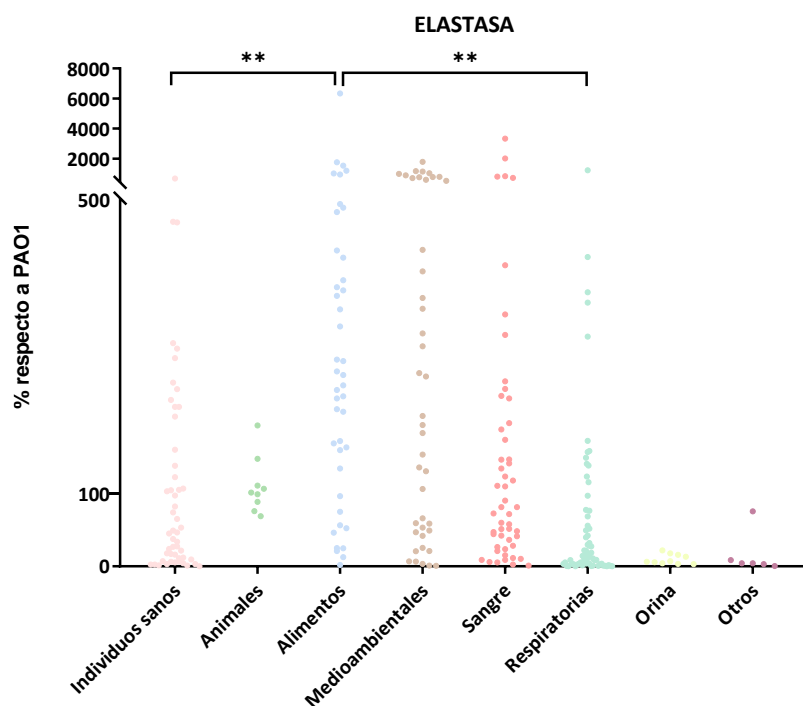


Figura 85: Análisis de la producción elastasa comparando los diferentes orígenes. $p < 0,001$.

Tabla 20. Actividad elastasa en las cepas de este trabajo, según el origen de la cepa.

Origen		Producción (% respecto a PAO1) de:	
		Elastasa	
		Rango	ELA50 ^a
Clínicas	Respiratorio	0 - 1.223	14,14
	Sangre	1 - 3.330	80,64
	Orina	3 - 22	7,15
	Otros	0 - 75	4,19
	Total	0-3.330	27,17
No clínicas	Individuos sanos	0 - 671	64,5
	Alimentos	2 - 6.331	260,90
	Medioambientales	1 - 1.782	205,02
	Animales	68 - 192	100,48
	Total	0-6.331	134,7

^a Porcentaje de producción observado en el 50% de las cepas de cada origen.

Analizando los resultados obtenidos en la Tabla 20, se observa un amplio rango de variabilidad en la mayoría de los grupos, destacando las cepas de alimentos y de

medioambiente como las más productoras de elastasa y las de orina y otros orígenes clínicos como las menos productoras.

Si observamos los niveles de actividad elastasa en función del fenotipo de resistencia, como se observa en la Figura 86, podemos destacar la mayor actividad elastasa encontrada en las cepas multiS, y la detección de una relación inversa al aumento de resistencia. De hecho, 19 de las 20 cepas con producción alta/muy alta de elastasa, mostraron un fenotipo multiS a los antibióticos.

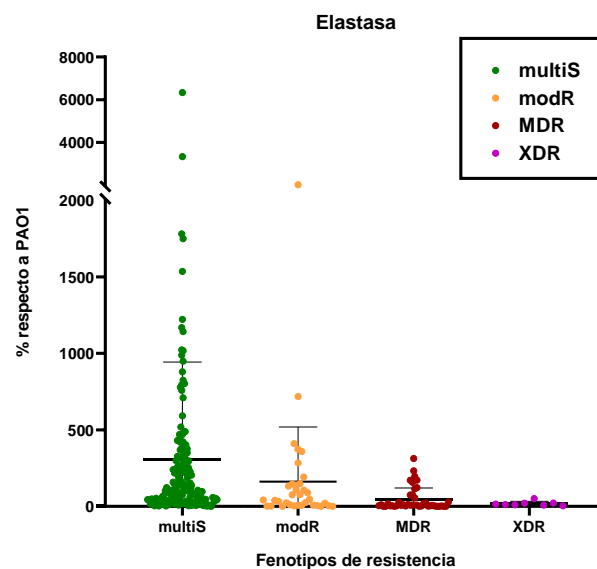


Figura 86. Producción de actividad elastasa encontrada en las cepas de *P. aeruginosa* analizadas en función de su fenotipo de resistencia.

Ciertas elastasas en *P. aeruginosa* están bajo el control transcripcional del *quorum sensing*, por lo que se estudió la producción de elastasa comparando cepas QS-positivas y QS-negativas en función de la presencia o ausencia de los genes *lasR* y *rhIR*. Sin observarse diferencias significativas, las cepas QS-negativas producían menos elastasa que las QS-positivas (Figura 87). Los rangos de producción en las cepas del virulotipo V6, pertenecientes a los ST973 y ST217, fueron muy bajos, entre 0,2 y 16%; al igual que en las 13 cepas del virulotipo V5, pertenecientes al ST175, cuyo rango fue de 0,3 a 55%.

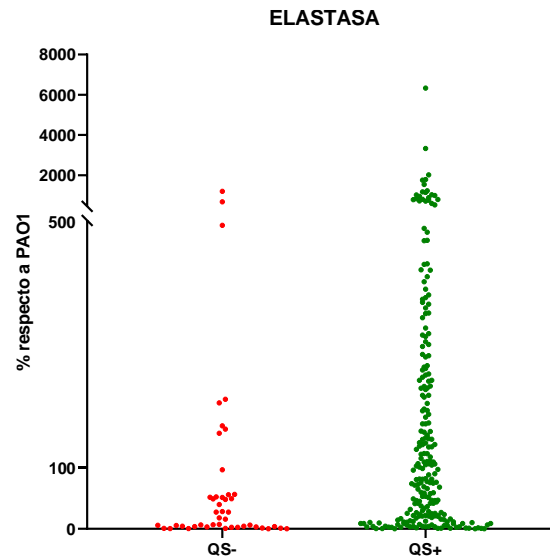


Figura 87: Producción de elastasa entre las cepas QS-positivas y QS-negativas. Se consideraron QS-negativas las cepas con virulotipos V2, V5, V6, V7, V9, V11 y V12.

1.7 Análisis de la motilidad

El análisis de la motilidad por swimming y swarming de las 275 *P. aeruginosa* de este trabajo se realizó según el protocolo descrito en Material y Métodos. Se cuantificó empleando el análisis manual y el programa MotilityJ. Los resultados obtenidos se muestran en el Anexo 3 y Figura 88.

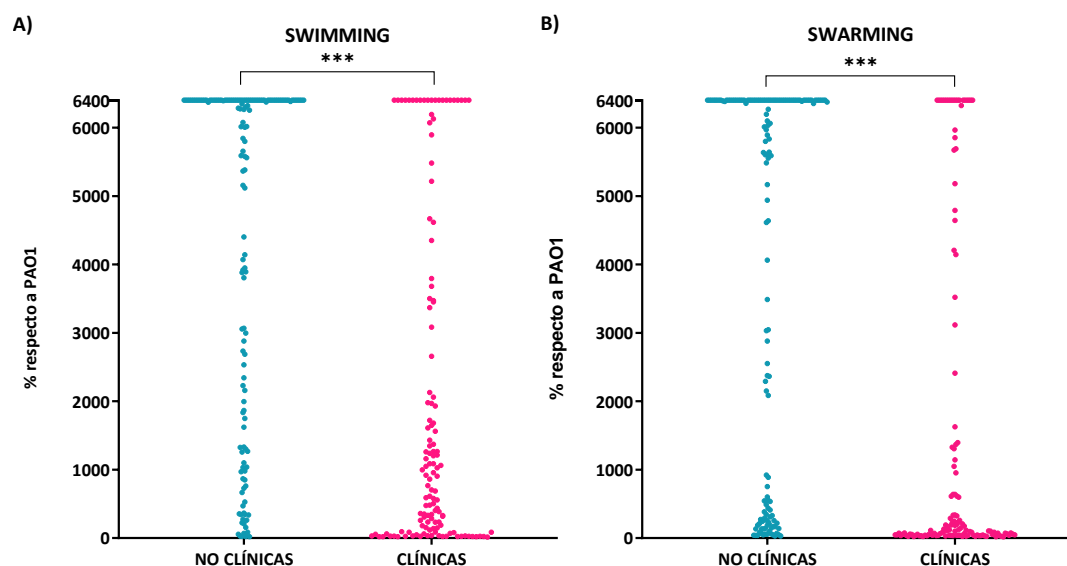


Figura 88: Análisis de la motilidad comparando cepas clínicas y no clínicas. A) Swimming, $p < 0,0001$; B) Swarming, $p < 0,0001$.

El 21% de las 275 cepas ocuparon completamente la placa ($>6400 \text{ mm}^2$), siendo el 75% de ellas de origen no clínico. Tal y como muestra la Figura 88, las cepas no clínicas fueron significativamente más motiles tanto en swimming como en swarming que las cepas clínicas.

Las 275 cepas se clasificaron con motilidad muy alta (rango de área de 5.117 a 6.400 mm^2); es decir, ocupando la totalidad o casi la totalidad de la placa Petri, alta (rango de área de 3.834 a 5.117 mm^2), media (rango de área de 2.551 a 3.834 mm^2), baja (rango de área de 60 a 2.551 mm^2) e inmóvil ($< 60 \text{ mm}^2$) (Figura 89).

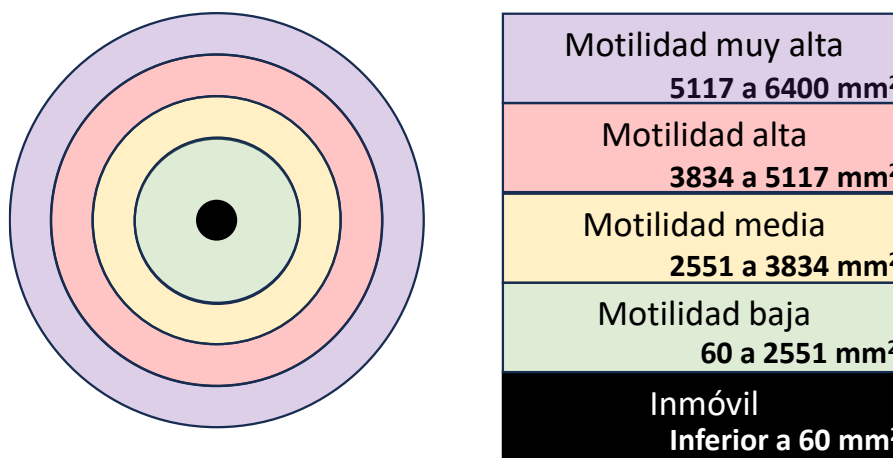


Figura 89: Representación esquemática de la categorización de la motilidad. La motilidad se definió como muy alta (rango de área de 5.117 a 6.400 mm^2) en color morado; alta (rango de área de 3.834 a 5.117 mm^2) en color rojo; media (rango de área de 2.551 a 3.834 mm^2) en color naranja; baja (rango de área de 60 a 2.551 mm^2) en color verde e inmóvil ($< 60 \text{ mm}^2$), en color negro.

Los valores de motilidad muy alta en swimming y en swarming se observaron en un 42% (116 cepas) y un 39% (108 cepas) de las 275 cepas de *P. aeruginosa*, respectivamente; correspondiendo al 62% y 58% de las cepas no clínicas y 21% y 18% de las clínicas, respectivamente. Por el contrario, se clasificaron como inmóviles en el análisis de swimming un 11% de las cepas (30 cepas, 19% de las clínicas y 3,5% de las no clínicas) y en el análisis de swarming un 20% de las cepas (56 cepas, 35% y 7% de las clínicas y no clínicas, respectivamente).

Cuando comparamos los valores de motilidad obtenidos en las diferentes cepas de *P. aeruginosa* en función de sus orígenes específicos se obtuvieron diferencias significativas, como se muestra en Figura 90 y en la Tabla 21.

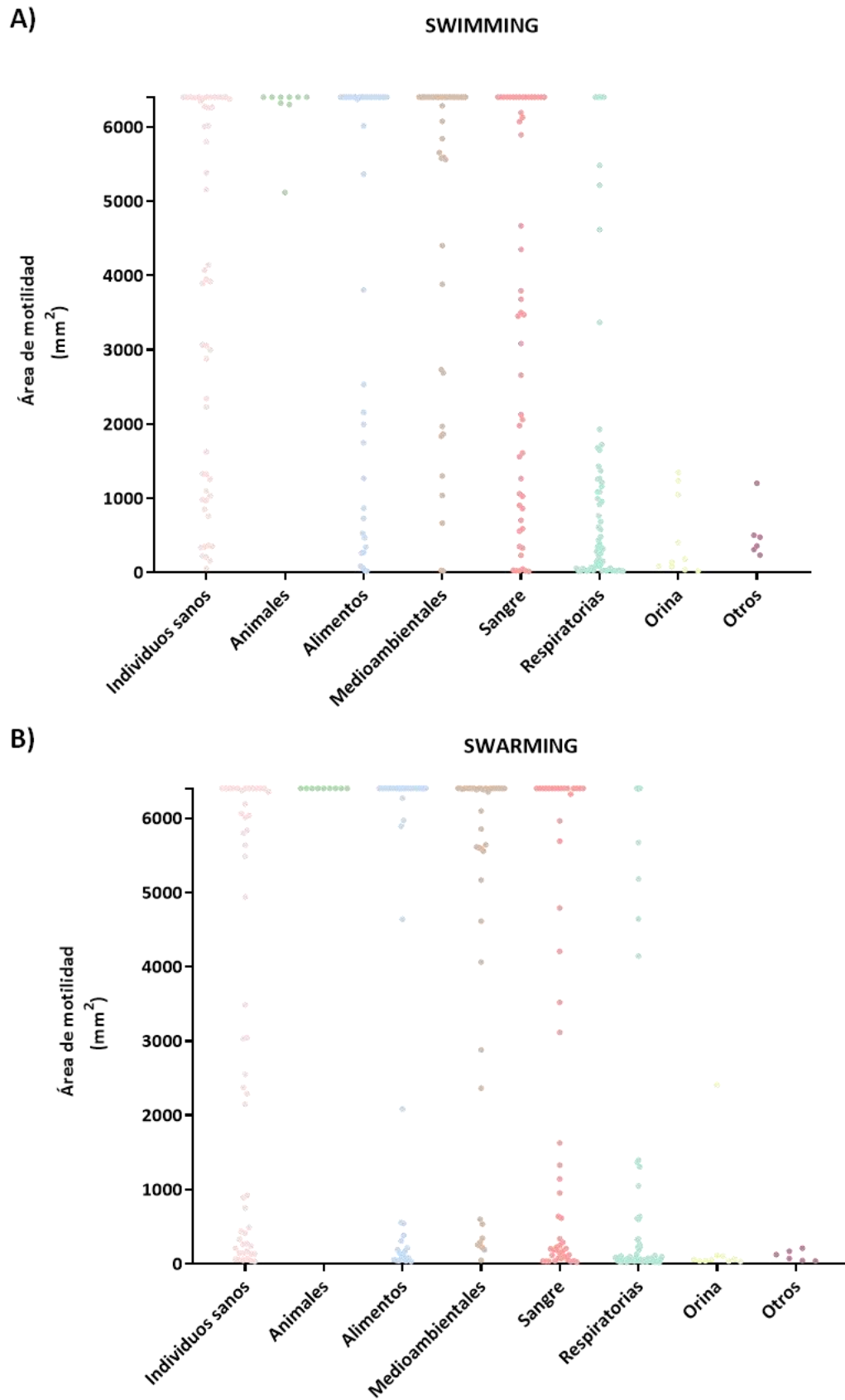


Figura 90: Análisis de la motilidad comparando los orígenes específicos. A) Swimming, B) Swarming. Se han encontrado diferencias significativas entre varios grupos (ver Tabla 21)

Tabla 21: Resumen de las diferencias significativas en la motilidad entre los orígenes específicos.

	<i>Swimming</i>	<i>Swarming</i>
Individuo sano vs animales		p=0,010
Individuo sano vs respiratorio	p=0,000	p=0,000
Individuo sano vs orina	p=0,002	p=0,030
Individuo sano vs otros	p=0,042	
Animales vs otros	p=0,000	p=0,000
Animales vs sangre	p=0,024	
Animales vs respiratorio	p=0,000	
Animales vs orina	p=0,000	
Alimentos vs respiratoria	p=0,000	p=0,000
Alimentos vs orina	p= 0,000	p=0,003
Alimentos vs otros	p=0,007	p=0,029
Ambiental vs sangre	p=0,036	p=0,006
Ambiental vs respiratorio	p=0,000	p=0,000
Ambiental vs orina	p=0,000	p=0,000
Ambiental vs otros	p=0,000	p=0,001
Sangre vs respiratorio	p=0,000	p =0,000
Sangre vs otros	p=0,005	

Cabe destacar las elevadas diferencias observadas entre los distintos orígenes, principalmente entre las cepas clínicas y no clínicas (Tabla 22). El 50% de las cepas de los distintos orígenes clínicos mostraban una motilidad baja o eran inmóviles, salvo las aisladas de hemocultivos que en swimming tenían motilidad media. En cambio, el 50% de todas las cepas de los distintos orígenes no clínicos mostraron motilidad alta o muy alta, salvo las cepas de individuos sanos que en swarming eran de motilidad media.

Tabla 22. Motilidad detectada según el origen de la cepa.

Origen	Swimming		Swarming		
	Rango SWIM	SWI50 ^a	Rango SWAR	SWAR50 ^a	
Clínicas	Respiratorio	21,2 – 6.400	346,9	17,6 – 6.400	69,9
	Sangre	15,5 – 6.400	3.471,4	24 – 6.400	953,4
	Orina	21,6 - 1348,3	179,2	32,2 - 2.409,6	55,7
	Otros	233,7 - 1202,5	475,3	39,5 - 211,2	123,4
	Total	15,5 – 6.400	904,1	17,6 – 6.400	114,3
No clínicas	Individuos sanos	55,7 – 6.400	4.071,9	31,1 – 6.400	3.032,7
	Alimentos	21,6 – 6.400	6.400	30,1 – 6.400	6.267,8
	Medioambientales	22,8 – 6.400	6.400	46,3 – 6.400	6.352,4
	Animales	5117,6 – 6.400	6.400	6.400	6.400
	Total	21,6 – 6.400	6.273,4	30,1 – 6.400	6.011,2

^a motilidad observado en el 50% de las cepas de cada origen.

Por otra parte, al analizar la motilidad en función del fenotipo de resistencia a antibióticos, se observó una reducción de la motilidad en relación con el incremento de resistencia, destacando que la motilidad muy alta tanto en swimming como swarming sólo se detectó en tres cepas MDR (dos aisladas de hemocultivos y una de individuos sanos) y en 10 cepas modR (4 no clínicas y 6 clínicas), frente a las 69 cepas multiS (59 no clínicas y 10 clínicas) (Figura 91).

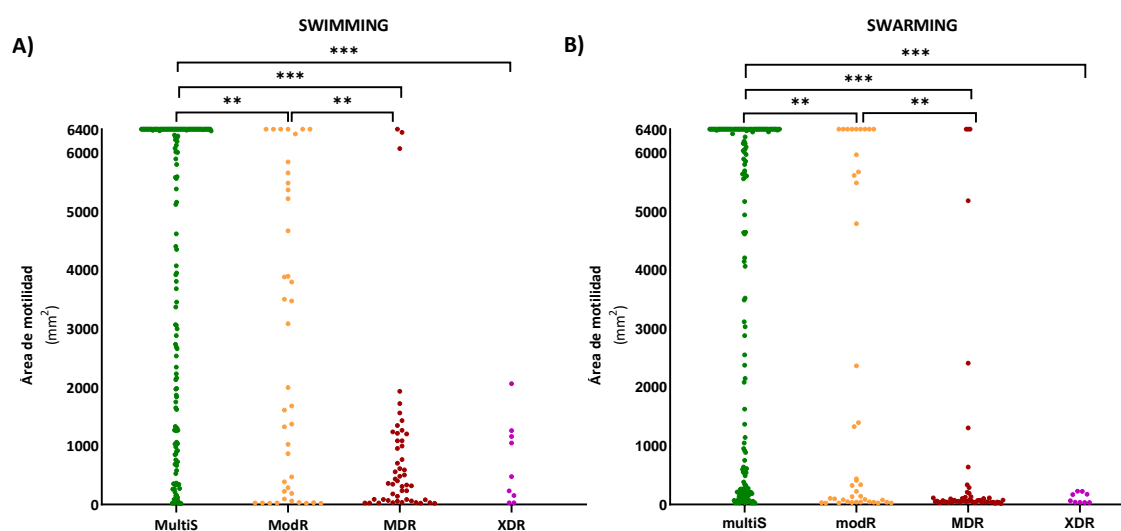


Figura 91. Análisis de la motilidad mediante swimming y swarming en las cepas de *P. aeruginosa* analizadas en función de su fenotipo de resistencia. ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$.

El *quorum sensing* controla la motilidad superficial de *P. aeruginosa* por lo que se estudió la motilidad en relación con la presencia/ ausencia de los genes *lasR* y/o *rhlR*; es decir, se comparó el comportamiento de las 45 cepas con virulotipos V2, V5, V6, V7, V9, V11 y V12 con el resto de las cepas QS-positivas. Se observaron diferencias significativas en swimming y en swarming, dado que las cepas QS-negativas eran menos motiles que las QS-positivas (Figura 92). Todas las cepas pertenecientes a los ST175 y ST973 mostraron una motilidad baja o eran inmóviles, salvo la cepa del clon ST175 aislada de una muestra medioambiental (G139) que tanto en swimming como en swarming era altamente motil ($>5.600 \text{ mm}^2$).

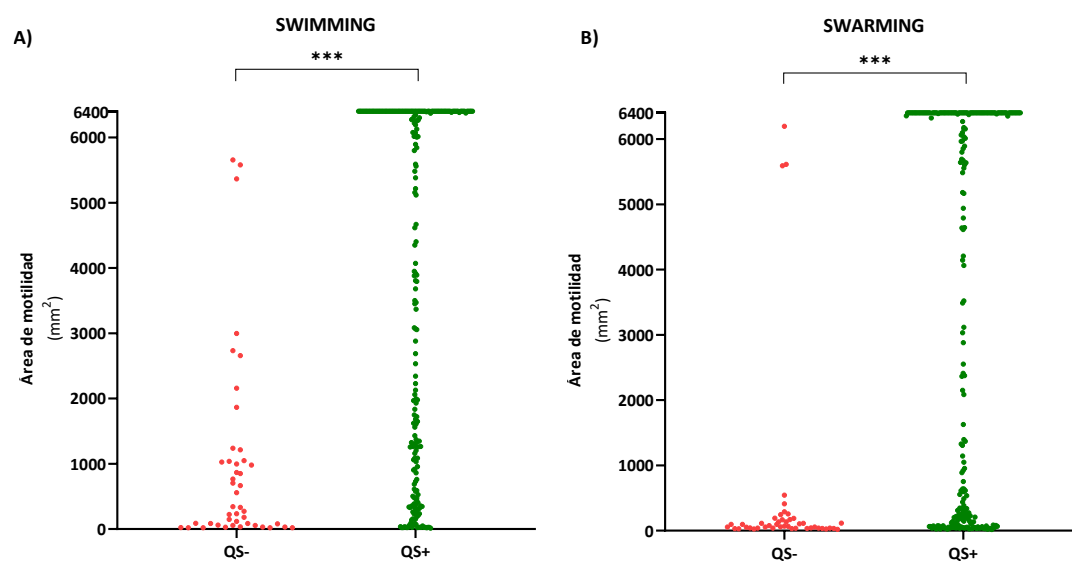


Figura 92: Motilidad entre las cepas QS-positivas y QS-negativas. Se consideraron QS-negativas las cepas con virulotipos V2, V5, V6, V7, V9, V11 y V12. *** $p < 0,0001$.

Además, según la morfología obtenida, identificamos seis patrones de motilidad diferentes (Figura 93 y 94).

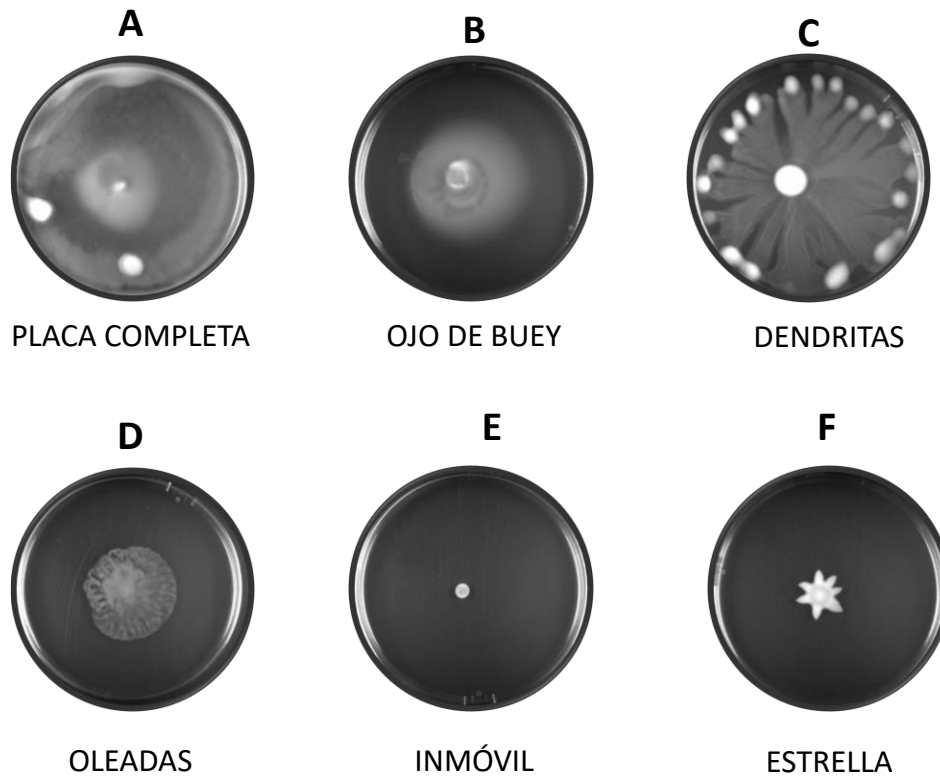


Figura 93: Patrones de motilidad identificados en *P. aeruginosa*. (Imágenes propias).

Al clasificar las cepas según el patrón de motilidad (Figura 93), podemos ver que, el patrón B (107 cepas, 38.9%) y el patrón A (70 cepas, 25.5%) fueron los más frecuentes en *swimming*; mientras que en *swarming* destacaron los patrones C, D y E con 93 (33.8%), 78 (28.4%) y 75 (27.3%) cepas, respectivamente (Figura 94).

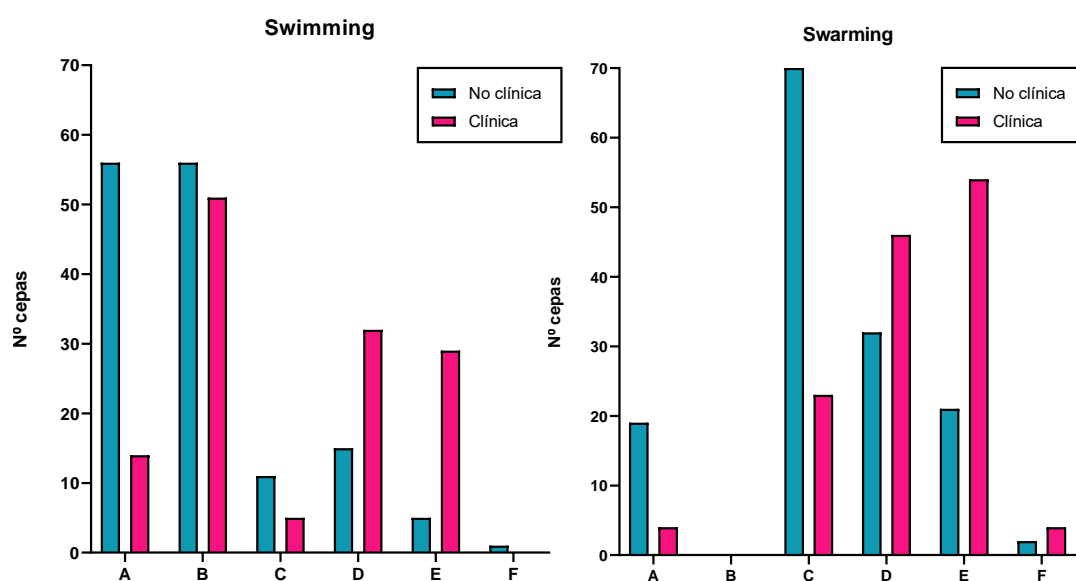


Figura 94: Número de cepas clasificadas en los patrones de motilidad identificados en *P. aeruginosa*.

1.8 Análisis de los principales clones encontrados en este estudio.

El análisis de las características principales de las cepas de este trabajo pertenecientes a los clones de alto riesgo (ST235, ST111, ST175, ST244, ST357, ST277 y ST298); así como a clones internacionales o locales frecuentes en esta tesis (ST17, ST253, ST252, ST274 y ST973) se recoge en la Tabla 23.

El ST235 se encontró en 30 cepas, todas de origen clínico, principalmente respiratorio (24), también una cepa procedente de sangre, una de orina y cuatro de otros orígenes como exudados de heridas. Estas cepas presentaban serotipo no tipable en la mayoría de los casos (14 cepas), así como serotipo O:11 (10 cepas), O:9 (3 cepas), O:12 (2 cepas) y O:4 (1 cepa). Además, estas cepas eran no sensibles a los antibióticos, incluyendo 21 cepas MDR y 4 XDR. Las 30 cepas eran *exoU*⁺ positivas pertenecientes mayoritariamente al virulotipo V8 (*exoU*⁺/*exoS*/*exoY*⁺). La producción de biofilm y pigmentos fue media-baja y la producción de elastasa baja. La motilidad fue baja, no superando los 2.000 mm² de dispersión en swimming.

La única cepa del ST111 procedía de orina, se clasificó como MDR, con serotipo no tipable y virulotipo V1 (*exoU*⁻/*exoS*⁺/*exoY*⁺). Esta cepa presentó producción de biofilm muy alta, actividad elastasa y producción de piocianina baja y producción de piorrubina media. La motilidad fue muy baja en ambos análisis, no superando los 140 mm² de dispersión.

Lo mismo ocurre con el ST357, del que solo se analizó una cepa aislada de un exudado de herida quirúrgica, resultó MDR, con serotipo O:15 y virulotipo V10 (*exoU*⁺/*exoS*/*exoY*⁻). Esta cepa (G270) tuvo una producción baja para todos los parámetros biológicos analizados (biofilm, pigmentos, actividad elastasa y motilidad).

Del ST277 se han analizado dos cepas de origen no clínico (una de alimentos y una de individuos sanos), ambas multiS, con serotipo O:5 y V1 (*exoU*⁻/*exoS*⁺/*exoY*⁺). Ambas cepas presentaban una producción media de biofilm, elastasa y pigmentos, mientras que la motilidad fue alta para la cepa aislada de alimentos y baja para la obtenida de una persona sana.

La única cepa del ST298 procedía de hemocultivo, era multiS, con serotipo O:11 y virulotipo V8 (*exoU*⁺/*exoS*⁻/*exoY*⁺). Esta cepa presentaba una producción baja de biofilm, pigmentos y actividad elastasa, pero una motilidad muy alta (>6.400 mm²).

Las 8 cepas del ST244 provenían tanto de origen clínico (dos respiratorias, una de sangre y una de orina) como de origen no clínico (tres de individuos sanos y una de alimentos). La resistencia a antibióticos y el serotipo de estas 8 cepas era variada: se encontraron tres cepas multiS, no clínicas, con serotipo O:5; dos cepas modR (una clínica y una no clínica), con serotipo O:16 y tres cepas MDR (clínicas), con serotipo no tipable. El virulotipo de todas las cepas fue el V1 (*exoU*⁻/*exoS*⁺/*exoY*⁺), salvo en la cepa modR no clínica en la que el gen *lasR* estaba truncado (virulotipo V2). Estas cepas presentaban una producción baja/media de biofilm, de elastasa y de pigmentos. La motilidad era variable, observándose en swarming cinco cepas inmóviles, una con motilidad media y dos con motilidad muy alta; mientras que en swimming una cepa se clasificó como inmóvil, cinco con motilidad media, una con motilidad alta y otra muy alta.

Respecto al clon ST175, se encontraron un total de 13 cepas, siendo 12 de origen clínico (8 respiratorias, tres de orina, una de sangre) y una no clínica (medioambiental). La cepa medioambiental y dos de las de origen respiratorio presentaron un fenotipo de resistencia modR; las aisladas de orina y sangre fueron MDR y la restante de origen respiratorio se clasificó como XDR. El serotipo fue no tipable en 7 cepas y O:4 en las 6 restantes. Todas las 13 cepas mostraron virulotipo V5 (*exoU*⁻/*exoS*⁺/*exoY*⁺/*rhIAB*⁻/*rhIR*⁻) que fue detectado únicamente en este ST. La producción de biofilm y piorrubina fue media/baja, así como la actividad elastasa y la producción de piocianina que fueron bajas. Todas las cepas fueron inmóviles o mostraron una motilidad baja, salvo la cepa medioambiental que mostró una motilidad alta tanto en swimming como en swarming.

El ST17 se detectó en seis cepas clínicas y en una aislada de alimentos, todas ellas con serotipo O:1 y virulotipo V1 (*exoU*⁻/*exoS*⁺/*exoY*⁺). Se observó fenotipo multiS en cuatro cepas y modR en las tres restantes. Todas las cepas clínicas tuvieron baja producción de biofilm, actividad media de elastasa, producción media de pigmentos y una motilidad alta/muy alta excepto una cepa con motilidad baja/inmóvil. La cepa de alimentos mostró producción media de biofilm, pero baja de elastasa y pigmentos; mientras que su motilidad fue media/alta.

El ST253 se detectó en 9 cepas clínicas y seis no clínicas, caracterizadas por ser multiS en su mayoría (10 cepas), así como 4 modR y una MDR. Los serotipos observados en estas 15 cepas fueron: no tipable (10 cepas), O:10 (4) y O:16 (1). Todas las cepas fueron *exoU*⁺ agrupadas en los virulotipos V8 (*exoU*⁺/*exoS*/*exoY*⁺) (8 cepas), V10 (*exoU*⁺/*exoS*/*exoY*⁺) (4 cepas) ó V9 (*exoU*⁺/*exoS*/*exoY*⁺/*lasR* truncado) (3 cepas). Los parámetros biológicos analizados eran muy variables. En la mayoría de las cepas, la producción de biofilm, elastasa y pigmentos fue media/baja y la motilidad muy variable.

El ST252 se detectó en cuatro cepas clínicas y tres no clínicas, con fenotipos de resistencia multiS (5 cepas) y modR (2). Todas las cepas poseían el serotipo O:1 y el virulotipo V1 (*exoU*⁻/*exoS*⁺/*exoY*⁺), salvo una cepa que portaba el gen *lasR* truncado (virulotipo V2). Todas las cepas mostraron una producción de biofilm, elastasa y pigmentos clasificadas como medio/bajo, mientras que la motilidad fue alta/muy alta salvo en una cepa de medioambiente y la cepa clínica con virulotipo V2 que fueron clasificadas como inmóviles o con baja motilidad.

El ST274, se detectó en 14 cepas, 8 de ellas de origen no clínico y 6 clínico, encontrando entre ellas una alta diversidad de fenotipos de resistencia (11 cepas multiS, una modR, una MDR y una XDR). Mayoritariamente presentaron serotipo no tipable (9 cepas), pero también se encontraron cepas con serotipo O:3 (5 cepas). El virulotipo característico de este ST fue V1 (*exoU*⁻/*exoS*⁺/*exoY*⁺), excepto una cepa (G245) que poseía el gen *lasR* truncado por una secuencia de inserción (virulotipo V2). De forma general, presentaron una producción baja de biofilm, media de elastasa y pigmentos y una motilidad muy alta, de 6.400 mm² en la mayoría de las cepas.

Se analizaron 8 cepas del ST973, todas ellas de origen clínico, 7 de las cuales eran MDR y una XDR. El serotipo no tipable se detectó en 5 de ellas y el O:15 en las tres restantes. Todas las cepas eran *exoS*⁺/*exoU*⁺ y no amplificaron el gen *lasR* (virulotipo V6). En todas las cepas la actividad elastasa y la producción de piocianina fue muy baja y la de pirrubina media/baja. La mayoría de las cepas ST973 mostraron una producción media de biofilm, fueron inmóviles en swarming y con una motilidad baja en swimming.

Las características de estos clones de alto riesgo, internacionales y locales más frecuentemente representados en nuestro estudio se resumen en la Tabla 24.

Tabla 23: Resumen de las características principales encontradas en las cepas de nuestro estudio pertenecientes a clones de alto riesgo.

MLST (nº)	Origen (nº)	Fenotipo de resistencia (nº) ^a	Serotipo (nº)	Virulotipo (nº)	CV ^b	FDA ^b	Elastasa ^b	Piocianina ^b	Piorrubina ^b	Swimming (mm ²)	Swarming (mm ²)
ST235 (30)	No clínico (0) y Clínico (30)	ModR (5) MDR (21) XDR (4)	No tipable (14) O:11(10) O:9 (3) O:12 (2) O:4 (1)	V8 (28) V10 (2)	123,31	130,32	8,59	17,99	130,06	387,05	70,75
ST111 (1)	No clínico (0) y Clínico (1)	MDR (1)	No tipable	V1	587,85	699,76	21,68	56,62	435,61	139,74	100,62
ST357 (1)	No clínico (0) y Clínico (1)	MDR (1)	O:15	V10	40,3	20,19	3	6,8	120,63	1.202,46	71,5
ST277 (2)	No clínico (2) y Clínico (0)	multiS	O:5	V1	140,21/ 103,1	106,22/ 197,24	217,42/ 390,05	462,49/ 443,39	147,13/ 154,66	2.342,63/ 6.400	753,2/ 4.637,67
ST298 (1)	No clínico (0) y Clínico (1)	multiS	O:11	V8	65,78	37,98	50,74	9,67	58,26	6.400	6.400
ST244 (8)	No clínico (4) y Clínico (4)	multiS (3) modR (2) MDR (3)	No tipable (3) O:5 (3) O:16 (2)	V1 (7) V2 (1)	84,14	106,46	23,31	30,95	92,86	353,25	57,87
ST175 (13)	No clínico (1) y Clínico (12)	modR (3) MDR (9) XDR (1)	No tipable (7) O:4 (6)	V5	116,14	72,92	6,74	21,17	210,73	86	55,73

*nº: nº de cepas. Se establece el código de colores para producción baja (verde), producción media (naranja), producción alta (rojo) y producción muy alta (morado). CV: análisis de la biomasa de biofilm mediante cristal violeta, FDA: análisis de la actividad metabólica del biofilm.

^a: El fenotipo de resistencia se categoriza en multiS, modR, MDR, XDR. ^b: Promedio de todas las cepas de cada MLST representado en % respecto a PAO1

Tabla 24: Resumen de las características principales encontradas en los clones más frecuentes en nuestro estudio (no pertenecientes a los CAR ya analizados).

MLST (nº)	Origen (nº)	Fenotipo de resistencia (nº)	Serotipo (nº)	Virulotipo (nº)	CV ^b	FDA ^b	Elastasa ^b	Piocianina ^b	Piorrubina ^b	Swimming (mm ²)	Swarming (mm ²)
ST274	No clínico (8) y Clínico (6)	multiS (11) modR (1) MDR (1) XDR (1)	No tipable (9) O:3 (5)	V1 (13) V2 (1)	78,28	68	117,02	149,48	146,43	6.400	6.400
ST17	No clínico (1) y Clínico (6)	multiS (4) modR (3)	O:1	V1	59,9	60,4	228,96	103,84	196,03	6.400	4.790,1
ST253	No clínico (6) y Clínico (9)	multiS (10) modR (4) MDR (1)	No tipable (10) O:10 (4) O16 (1)	V8 (8) V10 (4) V9 (3)	194,06	109,23	80,08	101,28	104,46	3.368,2	1.368,7
ST252	No clínico (4) y Clínico (3)	multiS (5) modR (2)	O:1	V1 (6) V2 (1)	126,29	60,45	134,7	132,31	105,64	5.591,48	5.964,83
ST973	Clínico (8)	MDR (7) XDR (1)	No tipable (5) O:15 (3)	V6	158,74	231,22	4,14	9,42	95,83	233,7	38,78

*nº: nº de cepas. Se establece el código de colores producción baja (verde), producción media (naranja), producción alta (rojo) y producción muy alta (morado). La motilidad sigue la misma escala de color y el gris representa el fenotipo inmóvil. CV: análisis de la biomasa de biofilm mediante cristal violeta, FDA: análisis de la actividad metabólica del biofilm.

^a: El fenotipo de resistencia se clasifica en multiS, modR, MDR, XDR. ^b: Promedio de todas las cepas de cada MLST representado en % respecto a PAO1

2. Análisis de la resistencia a fluoroquinolonas: papel del gen *crpP* y los elementos integrativos y conjugativos móviles (ICEs)

Durante el desarrollo de esta tesis, Chávez-Jacobo *et al.*, 2018 describieron por primera vez **CrpP**, una nueva enzima modificadora de ciprofloxacina, codificada por un gen (*crpP*) ubicado en el plásmido pUM505 en un aislado clínico de *P. aeruginosa*. En los meses siguientes, aparecieron numerosas variantes y genes homólogos a *crpP*, tanto en *P. aeruginosa* como en enterobacterias. Además, el gen *crpP* se localizó en el cromosoma de *P. aeruginosa* incluido en ICEs. Estas ICEs pueden además contener diferentes genes de resistencia y factores de virulencia que pueden transferirse horizontalmente entre diferentes bacterias.

La mayoría de los estudios sobre *crpP* se centraban en cepas clínicas de *P. aeruginosa*, por lo que en esta tesis se decidió estudiar la resistencia a fluoroquinolonas; así como la presencia y localización de *crpP* en cepas de diferentes orígenes de nuestra colección.

Con este objetivo, se seleccionaron 56 cepas de *P. aeruginosa* de orígenes clínicos y no clínicos y con diferentes fenotipos de resistencia a ciprofloxacina (35 cepas sensibles, dos con resistencia intermedia y 19 resistentes). Se analizó el fenotipo de resistencia a las fluoroquinolonas y los mecanismos genéticos implicados en dicha resistencia, incluyendo la presencia de *crpP* y el análisis de sus entornos genéticos (Figura 95). Además, en este estudio se incluyeron las cepas de referencia *P. aeruginosa* PAO1, PA7 y PA14.

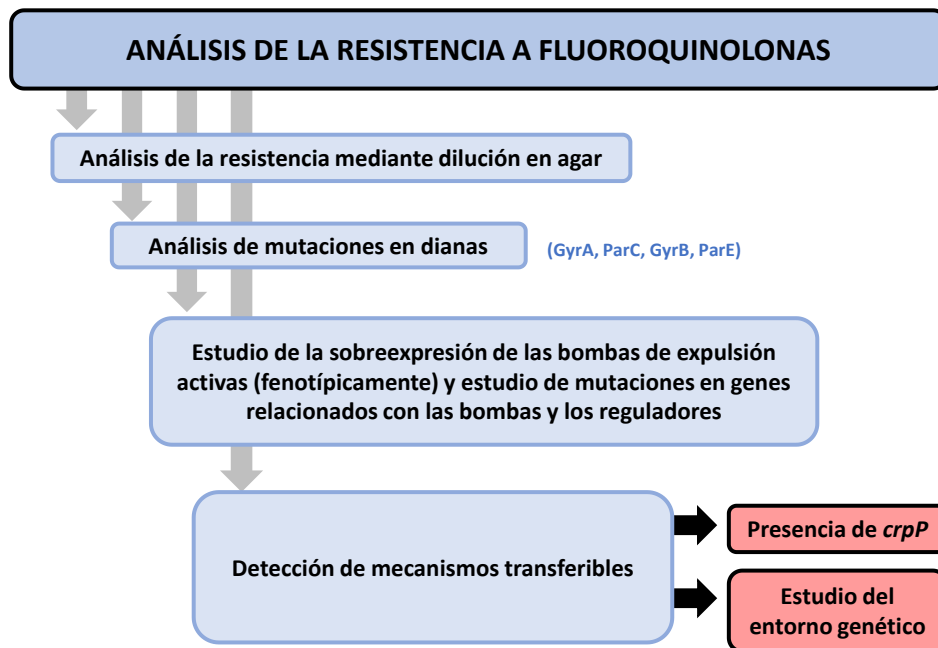


Figura 95: Esquema de resultados de la resistencia a fluoroquinolonas.

Las características de las 56 cepas de *P. aeruginosa* seleccionadas para este estudio se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25 Características de las cepas de *P. aeruginosa* seleccionadas para el estudio del análisis de la resistencia a fluoroquinolonas: papel del *crpP* y los elementos integrativos y conjugativos móviles (ICEs)

Cepa	Origen	Tipado		Fenotipo de resistencia ^b	<i>exoU</i>	
		Serotipo ^a	MLST			
G022	No clínica	Individuos sanos	O:5	ST244	Sensible	-
G031	No clínica	Individuos sanos	O:16	ST244	ATM, CAZ, FEP	-
G032	No clínica	Individuos sanos	O:5	ST244	Sensible	-
G033	No clínica	Individuos sanos	O:4	ST2143	Sensible	+
G035	No clínica	Individuos sanos	O:4	ST2222	Sensible	+
G042	No clínica	Individuos sanos	O:3	ST274	Sensible	-
G044	No clínica	Individuos sanos	NT	ST274	CAZ, IMP	-
G053	No clínica	Animales	O:3	ST2096	MEM, ATM	-
G054	No clínica	Animales	O:3	ST1711	Sensible	-
G056	No clínica	Animales	O:3	ST1711	Sensible	-
G058	No clínica	Animales	O:3	ST1711	Sensible	-
G068	No clínica	Alimentos	O:6	ST155	Sensible	-
G073	No clínica	Alimentos	O:3	ST274	Sensible	-
G082	No clínica	Alimentos	NT	ST155	IMP	-
G083	No clínica	Alimentos	O:6	ST155	Sensible	-
G087	No clínica	Alimentos	O:5	ST244	Sensible	-
G092	No clínica	Alimentos	O:3	ST274	Sensible	-
G094	No clínica	Alimentos	NT	ST2416	IMP	-
G095	No clínica	Alimentos	NT	ST155	Sensible	-
G097	No clínica	Alimentos	NT	ST2416	Sensible	-
G0105	No clínica	Ambientales	O:3	ST274	Sensible	-
G110	No clínica	Ambientales	O:2	ST217	Sensible	-
G115	No clínica	Ambientales	O:3	ST274	Sensible	-
G123	No clínica	Ambientales	O:3	ST679	Sensible	-
G130	No clínica	Ambientales	O:4	ST2547	Sensible	+
G131	No clínica	Ambientales	O:3	ST2548	Sensible	-
G133	No clínica	Ambientales	O:2	ST217	Sensible	-
G139	No clínica	Ambientales	O:4	ST175	GEN, TOB, CIP	-
G148	Clínica	Sangre	O:3	ST274	Sensible	-

Cepa	Origen		Tipado		Fenotipo de resistencia ^b	exoU
			Serotipo ^a	MLST		
G150	Clínica	Sangre	O:16	ST244	CIP	-
G157	Clínica	Sangre	NT	ST3145	IMP, MEM DOR, PIP, PTZ, CAZ, FEP, ATM, CIP	+
G167	Clínica	Sangre	O:6	ST395	IMP, MEM DOR, CAZ, FEP, GEN, TOB, NET	-
G178	Clínica	Sangre	NT	ST274	Sensible	-
G179	Clínica	Sangre	NT	ST274	IMP, MEM DOR, PIP, PTZ, CAZ, FEP, ATM,	-
G192	Clínica	Sangre	NT	ST175	IMP, MEM DOR, FEP, GEN, TOB, CIP	-
G205	Clínica	Respiratorio	NT	ST973	IMP, MEM DOR, CAZ, FEP, GEN, TOB, NET, CIP	-
G212	Clínica	Respiratorio	NT	ST973	IMP, DOR, FEP, GEN, TOB, NET, CIP	-
G221	Clínica	Respiratorio	NT	ST155	CIP	-
G224	Clínica	Respiratorio	O:3	ST274	Sensible	-
G244	Clínica	Respiratorio	NT	ST412	IMP, MEM DOR, PTZ, ATM, CAZ, FEP, GEN, AMK	-
G245	Clínica	Respiratorio	NT	ST274	Sensible	-
G249	Clínica	Respiratorio	NT	ST412	Sensible	-
G252	Clínica	Sangre	NT	ST973	IMP, MER, DOR, CAZ, FEP, GEN, TOB, AMK	-
G261	Clínica	Orina	NT	ST973	IMP, MER, DOR, GEN, TOB, AMK, CIP	-
G262	Clínica	Orina	NT	ST973	IMP, MER, DOR, PTZ, ATM, CAZ, GEN, TOB, AMK, CIP	-
G265	Clínica	Orina	NT	ST244	IMP, MER, DOR, TOB, NET, CIP	-
G266	Clínica	Orina	O:4	ST175	IMP, MER, DOR, GEN, TOB, CIP	-
G267	Clínica	Orina	O:4	ST175	IMP, MER, DOR, GEN, TOB, CIP	-
G268	Clínica	Orina	NT	ST235	IMP, MER, DOR, GEN, TOB, AMK, NET, CIP	+
G269	Clínica	Orina	NT	ST253	IMP, MEM, DOR, ATM, TOB, NET, CIP	+
G270	Clínica	Otros	O:15	ST357	IMP, MEM, DOR, ATM, GEN, TOB, AMK, NET, CIP	+
G271	Clínica	Respiratorio	NT	ST244	IMP, MEM, DOR, ATM, GEN, TOB, AMK, NET, CIP	-
G272	Clínica	Respiratorio	NT	ST244	IMP, MEM, DOR, ATM, GEN, TOB, AMK, NET, CIP	-
G273	Clínica	Respiratorio	O:15	ST973	IMP, MEM, DOR, FEP, GEN, TOB, NET, CIP	-
G274	Clínica	Orina	O:15	ST973	IMP, MEM, DOR, GEN, TOB, NET, CIP	-
G275	Clínica	Otros	O:15	ST973	IMP, MEM, DOR, ATM, CAZ, FEP, PTZ, PIP, GEN, TOB, AMK, NET	-

^aNT: no-tipable: incluye cepas autoaglutinantes, poliaglutinantes o no aglutinantes.

^bSensible: sensible a todos los antipseudomónicos testados. IMP, imipenem; MEM, meropenem; DOR, doripenem; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; PIP, piperacilina; PTZ, piperacilina-tazobactam; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; AMK, amikacina; NET, netilmicina; CIP, ciprofloxacina.

Como se puede ver en la Tabla 25, de las 56 cepas seleccionadas para este estudio, 28 eran de origen no clínico (alimentos, personas sanas, animales o ambientales) y 28 de origen clínico (hemocultivos, orina, respiratorio u otros). Las cepas seleccionadas para el estudio pertenecían a 20 STs diferentes, siendo el 41% de ellas no-tipables. Además, 27 cepas eran sensibles a todos los antibióticos testados y el resto presentaron diferentes fenotipos de resistencia, incluyendo 8 cepas modR, 19 cepas con fenotipo MDR y 2 XDR.

2.1 Resistencia a fluoroquinolonas

Se estudió la resistencia a las fluoroquinolonas ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina, y ofloxacina mediante dilución en agar en las 56 cepas seleccionadas para este estudio, y en las 3 cepas control. Los resultados obtenidos mostraron que 33 cepas (55.9%) eran sensibles a todas las fluoroquinolonas testadas, incluyendo las cepas control PAO1 y PA14 y destacando que el 78.8% de estas 33 cepas eran de origen no clínico. Por otro lado, 13 cepas fueron resistentes a todas las fluoroquinolonas testadas, incluyendo la cepa control PA7, siendo todas ellas de origen clínico, excepto la cepa G139 aislada de agua de río (Figura 96).

En función de la CMI obtenida, las cepas se clasificaron en sensibles, intermedias, resistentes (hasta 32 μ g/ml), altamente resistentes (desde 32 y hasta 128 μ g/ml) y extremadamente resistentes (>128 μ g/ml) a las diferentes fluoroquinolonas, según criterios del CLSI 2020 (Figura 96).

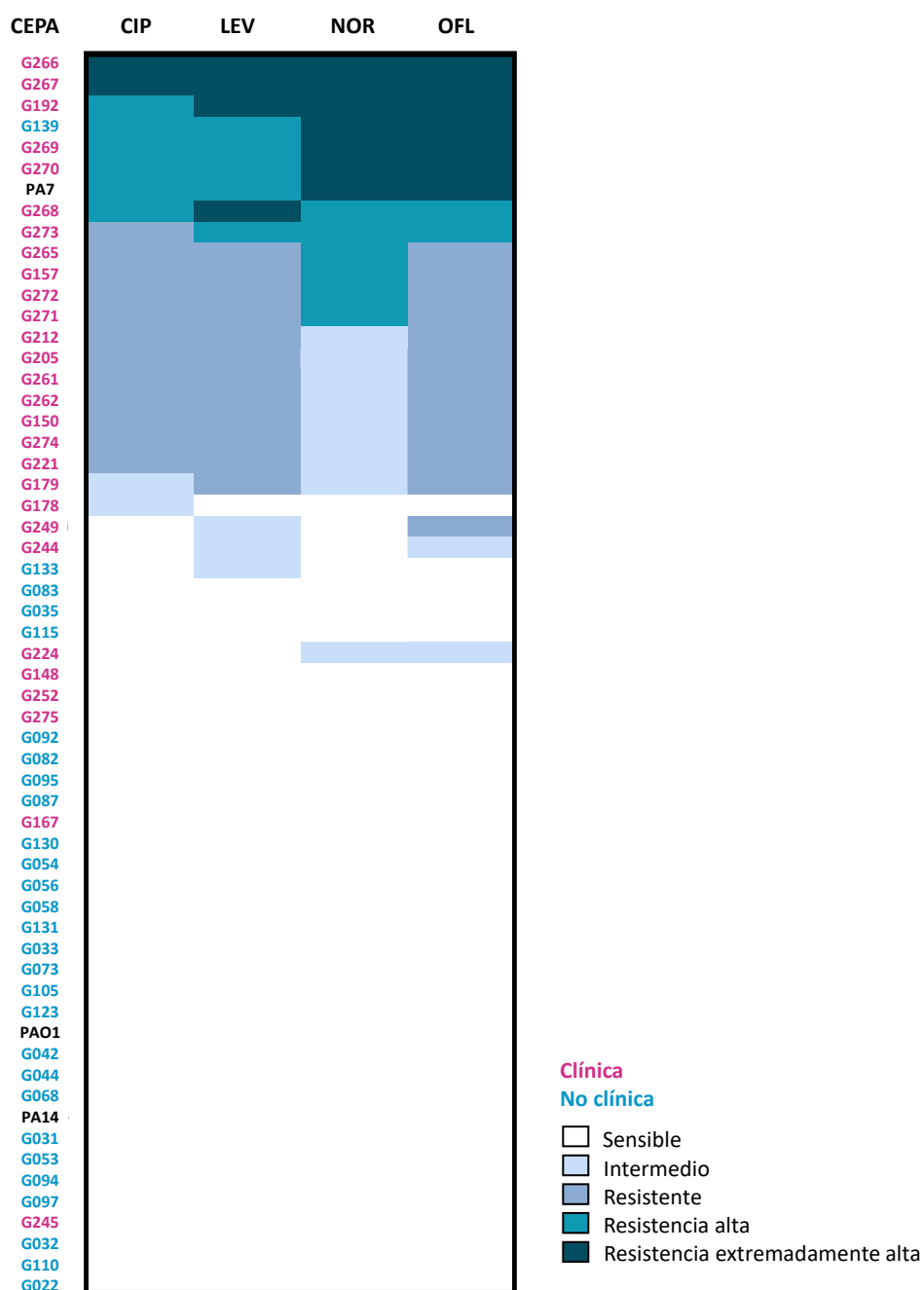


Figura 96: Heatmap que representa el fenotipo de resistencia a las diferentes fluoroquinolonas. CIP: ciprofloxacina, LEV: levofloxacina, NOR: norfloxacina, OFL: ofloxacina.

2.2 Mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas

En las 56 cepas de nuestra colección y las tres cepas de referencia se analizaron los principales mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas:

- Mutaciones cromosómicas en dianas relacionadas con la resistencia a fluoroquinolonas (GyrA, ParC, GyrB, ParE).

- Alteraciones en la actividad o la permeabilidad de las bombas de expulsión activas.
- Adquisición de mecanismos transferibles de resistencia a quinolonas (TMQR) como son *qnr*, *aac(6')Ib-cr* o *qepA*, entre otros.

El resistoma mutacional se determinó analizando la presencia de mutaciones en 23 genes cromosómicos que están implicados en la resistencia a las fluoroquinolonas y en la expresión de bombas de expulsión, que se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26: Función e información de los 23 genes implicados en la resistencia a fluoroquinolonas seleccionados para analizar el resistoma mutacional en *P. aeruginosa*.

	Etiqueta ^a	Gen	Producto/Función
Diana de las quinolonas	PA0004	<i>gyrB</i>	Subunidad B de ADN girasa
	PA3168	<i>gyrA</i>	Subunidad A de la ADN girasa
	PA4964	<i>parC</i>	Subunidad A de la topoisomerasa IV
	PA4967	<i>parE</i>	Subunidad B de la topoisomerasa IV
MexAB-OprM y reguladores	PA0425	<i>mexA</i>	Precursor de la proteína de fusión de membrana de expulsión de múltiples fármacos de resistencia-nodulación-división celular (RND) MexA
	PA0426	<i>mexB</i>	Transportador de expulsión de múltiples fármacos de resistencia-nodulación-división celular (RND) MexB
	PA0427	<i>oprM</i>	Principal proteína de membrana externa de expulsión de resistencia intrínseca a múltiples antibióticos Precursor OprM
	PA0424	<i>mexR</i>	Represor del operón de resistencia a múltiples fármacos MexR
	PA3721	<i>nalC</i>	Represor NalC de MexAB-OprM
	PA3574	<i>nalD</i>	Represor NalD de MexAB-OprM
	MexXY-OprM y reguladores	PA2018	<i>mexY</i>
PA2019		<i>mexX</i>	Precursor de MexX de la proteína de fusión de membrana de expulsión de múltiples fármacos de resistencia-nodulación-división celular (RND)
PA2020		<i>mexZ</i>	Regulador transcripcional MexZ
MexCD-OprJ y reguladores	PA4598	<i>mexD</i>	Transportador de eflujo multifármaco de resistencia-nodulación-división celular (RND) MexD
	PA4599	<i>mexC</i>	Precursor de la proteína de fusión de membrana de expulsión de múltiples fármacos de resistencia-nodulación-división celular (RND) MexC
	PA4597	<i>oprJ</i>	Precursor de OprJ de la proteína de membrana externa de expulsión de múltiples fármacos
	PA4600	<i>nfxB</i>	Regulador transcripcional NfxB
MexEF-OprN y reguladores	PA2493	<i>mexE</i>	Precursor de la proteína de fusión de membrana de expulsión de múltiples fármacos de resistencia-nodulación-división celular (RND) MexE
	PA2494	<i>mexF</i>	Transportador de expulsión de múltiples fármacos de resistencia-nodulación-división celular (RND) MexF
	PA2495	<i>oprN</i>	Precursor de OprN de la proteína de membrana externa de expulsión de múltiples fármacos
	PA2491	<i>mexS</i>	<i>mexS</i>
	PA2492	<i>mexT^b</i>	Regulador transcripcional MexT
	PA4315	<i>mvaT</i>	Regulador transcripcional MvaT, subunidad P16

^a Etiqueta genómica de PA01

^b En el caso del gen *mexT* la comparación se realizó frente al gen de la cepa PA14

2.2.1 Mutaciones cromosómicas en dianas relacionadas con la resistencia a fluoroquinolonas

Los cambios aminoacídicos detectados en la región determinante de la resistencia a quinolonas (QRDR) de las proteínas GyrA, ParC, GyrB y ParE, se muestran en la Tabla 27 y en la Figura 97. Se identificaron dos sustituciones diferentes en GyrA (S83I y D87N), y en ParE (H461D y A473V), y se observaron tres cambios diferentes en GyrB (S466A, S466F e I529V) y ParC (S87W, S87L y L95Q). El cambio L95Q en ParC se detectó por primera vez en este trabajo, encontrándose en una cepa clínica resistente a fluoroquinolonas (G273). Los cambios en GyrB y ParE se detectaron tanto en cepas resistentes a fluoroquinolonas como en cepas sensibles, sin embargo, los cambios en GyrA y ParC se encontraron sólo en cepas resistentes, destacando que no se detectaron cambios en ParC sin llevar asociados cambios en GyrA.

Resulta relevante destacar que todas las cepas pertenecientes al clon de alto riesgo ST175 mostraron los valores más altos de CMI de fluoroquinolonas y las mismas sustituciones en GyrA (T83I+D87N) y en ParC (S87W+L168Q).

Se observó correlación entre el número de cambios en las proteínas GyrA y ParC y el nivel de resistencia a fluoroquinolonas. De esta forma, no se encontraron cambios en QRDR de GyrA o ParC en ninguna de las *P. aeruginosa* sensibles a las fluoroquinolonas de nuestro estudio. Un solo cambio aminoacídico en la proteína GyrA se asoció con una baja resistencia a ciprofloxacina (CMI 2-4 mg/L), dos sustituciones (una en GyrA y otra en ParC) con un nivel moderado o alto de resistencia a ciprofloxacina (CMI 8–128 mg/L), y tres sustituciones (dos en GyrA y una en ParC) se asociaron con las CMIs a ciprofloxacina más altas (128-256 mg/L) (Figura 97). Sin embargo, hubo cepas que no siguieron este patrón de correlación, tales como las tres cepas resistentes a ciprofloxacina que no presentaron mutaciones ni en GyrA ni en ParC (G150, G261, G262) o las 9 cepas (PA7, G157, G265, G268, G269, G270, G271, G272, G273) que mostraron rangos muy amplios de resistencia a ciprofloxacina (CMI 8-128 mg/L) aun cuando poseían las mismas sustituciones aminoacídicas (T83I en GyrA y S83L, S83W o L95Q en ParC).

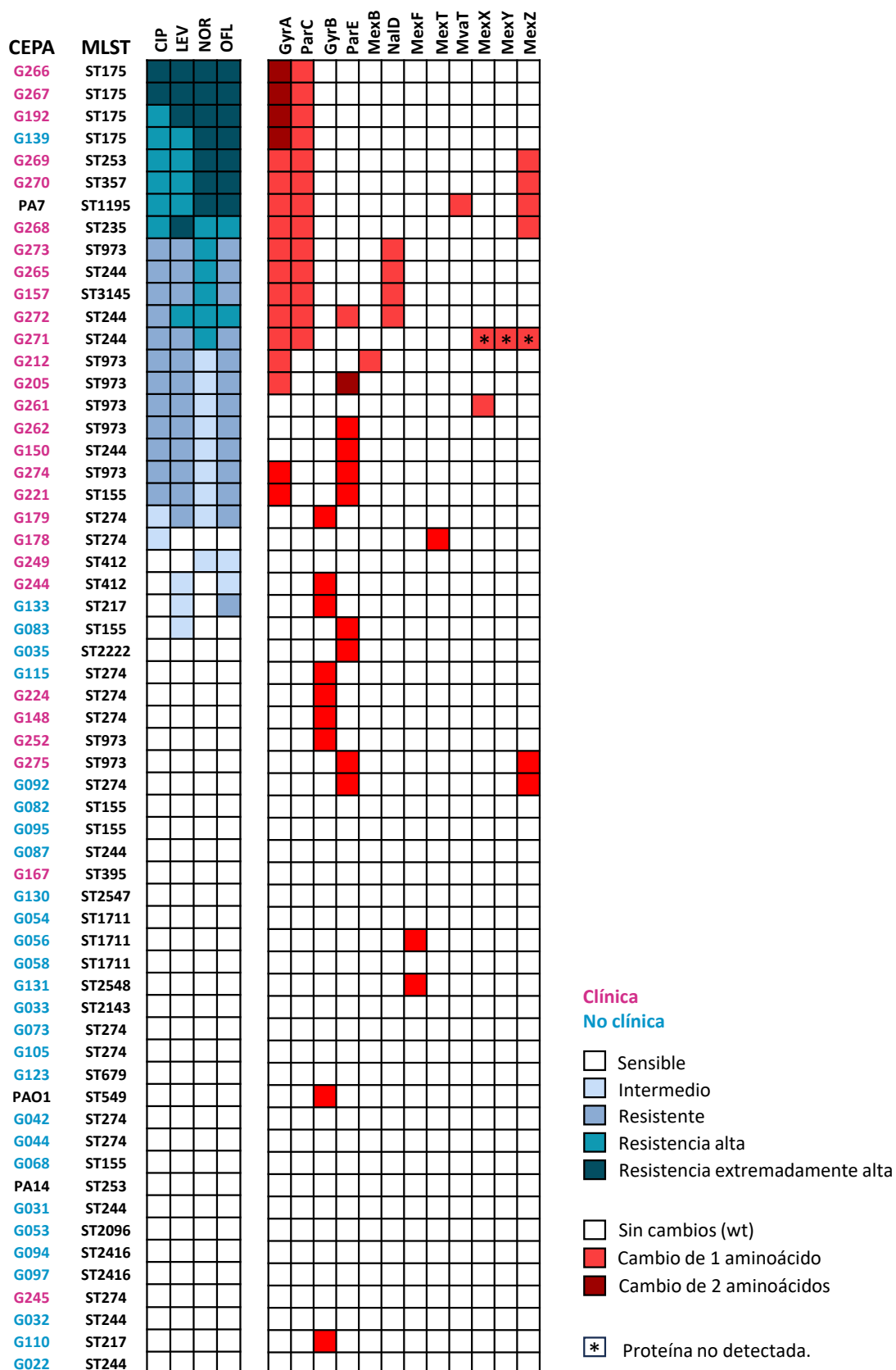


Figura 97: Heatmap representando los fenotipos de resistencia a fluoroquinolonas y los cambios aminoacídicos relevantes en dicha resistencia detectados en 12 proteínas cromosómicas (QRDR de las proteínas diana de fluoroquinolonas y proteínas relacionadas con bombas de expulsión y sus reguladores) de las 56 cepas de nuestra colección y las tres cepas de referencia. Se incluyen sólo aquellos cambios no sinónimos.

Tabla 27. Cambios aminoacídicos detectados en la región determinante de la resistencia a quinolonas (QRDR) de las proteínas GyrA, ParC, GyrB y ParE y el rango de CMI encontrado en las cepas analizadas.

Proteínas diana ^a				CMI (mg/L) ^b				Nº de cepas
GyrA	ParC	GyrB	ParE	CIP	LEV	NOR	OFL	
T83I, D87N	S87W , L168Q	-	-	[128-256]	[128-256]	[256-512]	[256-512]	4
T83I , ΔE911, ΔS912	S87W	-	-	128	128	512	256	1
T83I , ΔS912, ΔE913	S87W	-	D533E	16	16	128	32	1
T83I	S87L	-	D533E	64	256	128	128	1
T83I	S87L , P751T	-	-	128	128	512	256	1
T83I	S87L	T235S, E239Q, L268I, I529V , S578A, A627V, T640S	S147T, K157R	128	128	256	256	1
T83I	S87L	-	-	[8-16]	[8-16]	64	[16-32]	3
T83I	L95Q	-	A473V	16	128	64	128	1
T83I	-	-	H461D, A473V	4	4	8	8	1
T83I	-	-	A473V	2	[8-16]	8	16	2
T83I	-	-	-	2	4	8	8	1
-	-	-	A473V	[0,25-2]	[1-16]	[0,5-8]	[2-16]	4
-	-	H148N; E713D	-	[0,25-0,5]	0,5	[1-8]	[1-4]	3
-	-	H148N, S466F , E713D	-	1	16	8	16	1
-	-	H148N	-	[0,125-1]	[0,5-1]	[0,5-1]	[0,5-2]	9
-	V646L	S466A	D533E	0,5	2	[2-4]	[4-8]	2
A908T	-	-	A473V , D533E	[0,06-0,5]	[0,25-2]	[0,5-2]	1	2
ΔE911, ΔS912	-	-	-	[0,25-0,5]	0,5	[0,5-1]	[1-2]	2
ΔS912, ΔE913	-	-	D533E	0,125	0,25	0,5	1	1
ΔS912, ΔE913	I459T	-	D533E	0,25	0,5	1	1	1
ΔE911, ΔS912	S331T, I388V, A528T	T235S, E239Q, L268I, I529V , A627V	D533E	[0,125-0,25]	[0,5-1]	[1-2]	[1-2]	6
-	-	-	-	[0,06-2]	[0,125-8]	[0,25-8]	[0,5-16]	11

^aLos cambios aminoacídicos relevantes en la resistencia a fluoroquinolonas se marcan en rojo. ^bCIP: ciprofloxacina, LEV: levofloxacina, NOR: norfloxacina, OFL: ofloxacina.

2.2.2 Sobreexpresión de las bombas de expulsión activas

Se consideraron cepas portadoras de bombas de expulsión sobreexpresadas, aquellas cepas que redujeron su CMI de fluoroquinolonas >2 veces en presencia de 40 mg/L del inhibidor de bombas de expulsión PA β N. Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28: Valores de la CMI de ciprofloxacina (CIP) en ausencia y presencia de PA β N (40 mg/L). Los valores $CMI_{CIP}/CMI_{CIP+PA\beta N} >2$ se resaltan en naranja y se asocian con la sobreexpresión de bombas de expulsión activa.

	CIP	CIP+PABN	$CMI_{CIP}/CMI_{CIP+PA\beta N}$		CIP	CIP+PABN	$CMI_{CIP}/CMI_{CIP+PA\beta N}$
G266	256	32	8	G252	0,25	0,125	2
G267	256	32	8	G275	0,25	0,125	2
G192	128	16	8	G092	0,25	<0,06	>4
G139	128	32	4	G082	0,25	0,125	2
G269	128	16	8	G095	0,25	0,125	2
G270	128	16	8	G087	0,25	<0,06	>4
PA7	128	8	16	G167	0,25	<0,06	>4
G268	64	8	8	G130	0,25	0,06	4
G273	16	2	8	G054	0,25	0,06	4
G265	16	4	4	G056	0,25	0,125	2
G157	16	<0,06	>267	G058	0,25	0,125	2
G272	16	4	4	G131	0,25	0,06	4
G271	8	4	2	G033	0,25	<0,06	>4
G212	4	1	4	G073	0,25	<0,06	>4
G205	2	<0,06	>33	G105	0,25	<0,06	>4
G261	2	1	2	G123	0,25	0,125	2
G262	2	0,5	4	PA01	0,25	<0,06	>4
G150	2	1	2	G042	0,125	<0,06	>2
G274	2	0,5	4	G044	0,125	0,06	2
G221	2	0,5	4	G068	0,125	0,125	1
G179	1	0,5	2	PA14	0,125	0,06	2
G178	1	0,125	8	G031	0,125	<0,06	>2
G249	0,5	<0,06	>8	G053	0,125	0,125	1
G244	0,5	<0,06	>8	G094	0,125	0,125	1
G133	0,5	0,06	8	G097	0,125	0,125	1
G083	0,5	0,125	4	G245	0,06	<0,06	>1
G035	0,5	<0,06	>8	G032	0,06	<0,06	>1
G115	0,5	<0,06	>8	G110	0,06	<0,06	>1
G224	0,25	<0,06	>4	G022	0,06	<0,06	>1
G148	0,25	0,06	4				

Un total de 38 cepas redujeron la CMI de ciprofloxacina en más de dos diluciones en presencia de PA β N, lo cual indica que estas cepas presentaban bombas de expulsión sobreexpresadas. Este efecto de sobreexpresión fue especialmente notable en cepas con una sola sustitución de GyrA así como en la cepa G157, porque al añadir el inhibidor, el fenotipo de estas cepas pasó de resistente a sensible a ciprofloxacina.

Además, las nueve cepas previamente destacadas (PA7, G157, G265, G268, G269, G270, G271, G272, G273) con dos cambios aminoacídicos en las QRDR de las proteínas dianas (T83I en GyrA y S83L/S83W/L95Q en ParC), redujeron su elevado nivel de resistencia a ciprofloxacina en presencia de PA β N (CMI pasó de 8-128 a <0,06-16 mg/L), indicando la presencia de bombas de expulsión sobreexpresadas.

El resistoma mutacional de los genes implicados en los cuatro sistemas de bombas de expulsión de las fluoroquinolonas (MexA-MexB-OprM, MexC-MexD-OprJ, MexE-MexF-OprN, y MexX-MexY-OprM) de *P. aeruginosa* y sus reguladores y activadores se analizó en las 59 cepas de nuestro estudio (Anexo 4).

Se observaron mutaciones no sinónimas, deleciones o inserciones en todos los genes estudiados. Estas alteraciones se detectaron con mayor frecuencia en los genes *mexD*, *mexX*, *mexY* y *nalC* (cambios en el 98, 98, 95 y 85% de las cepas, respectivamente), y con menor frecuencia en los genes *mvaT*, *mexT* y *mexA* (cambios en el 2, 8 y 10% de las cepas, respectivamente). Sin embargo, muchas de estas variaciones se clasificaron como polimorfismos o ya habían sido previamente descritas como no relacionadas o sin ningún efecto sobre la expresión de las bombas de expulsión y, por tanto, no relacionadas con la resistencia a fluoroquinolonas, como los cambios V126E en MexR o G71E y S209R en NalC. No se encontraron mutaciones previamente descritas que implicaran una actividad deficiente de NfxB o MexS o sobreexpresión de las bombas MexCD-OprJ y MexEF-OprN y relacionadas con altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas.

De esta forma, en la Figura 97 se muestran las alteraciones (codones de finalización prematuros, cambios aminoacídicos, frameshift, deleciones o inserciones) previamente reportados como relevantes para la resistencia a las fluoroquinolonas, que se encontraron en las 59 cepas analizadas.

Entre las 9 cepas con un cambio aminoacídico en GyrA y otro en ParC (PA7, G157, G265, G268, G269, G270, G271, G272, G273) previamente mencionadas por presentar sobreexpresión en sus bombas de expulsión, destacan las cuatro cepas G268, G269, G270 y PA7 por mostrar codones de terminación prematuros o deleciones en *mexZ* (codificante del represor de MexXY-OprM). Las cinco cepas restantes excepto G157 poseían codones de terminación prematuros o deleciones en el gen *nalD* (codificante del represor de MexAB-OprM). Todas estas mutaciones detectadas conducen a proteínas defectuosas que podrían no actuar como represores en las bombas MexXY-OprM y MexAB-OprM, respectivamente, dando lugar a la sobreexpresión de las mismas y la consecuente pérdida de sensibilidad a fluoroquinolonas. Por otro lado, es interesante resaltar la cepa G157 perteneciente al ST3145, con virulotipo V12 (*exoU*⁺/*exoS*/*exoY*⁻ y truncados ambos genes *lasR* y *rhIR* con *ISPa104*) y caracterizada por la reducción de >233 veces la CMI de ciprofloxacina en presencia de PAβN. Dicha cepa carecía de los genes *mexX*, *mexY* y *mexZ* como se puede observar en la Figura 98. En esta cepa se ha detectado que la región genética desde el gen *bacA* hasta *vqsM* (que incluye los genes *mexX*, *mexY* y *mexZ*, así como el gen *exoY*), se ha sustituido por material genético perteneciente a fagos, la secuencia de inserción *ISPa42* (familia Tn3) formada por 16 secuencias de lectura abierta (*orf*) y un tamaño de 16.941 pb, y otras integrasas y transposasas. Además, se confirmó que dicha cepa no presentaba el gen *exoY*.

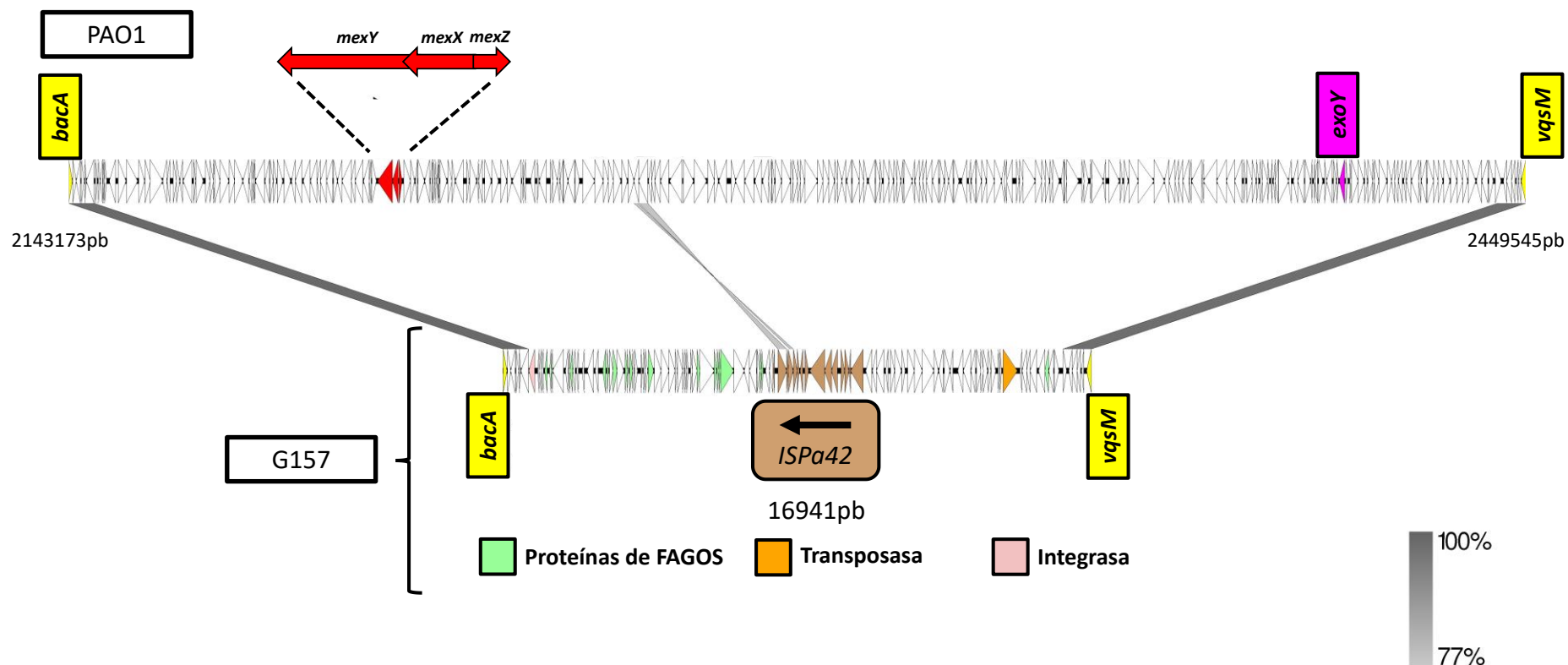


Figura 98. Representación del alineamiento de PAO1 con la cepa G157 realizado mediante easyfig v2.5.5 en el que se puede apreciar que la cepa G157 carece de los genes *mexX*, *mexY* y *mexZ* (representados en rojo). En su lugar encontramos material genético perteneciente a fagos (verde), la secuencia de inserción *ISPa42* (marrón), otras integrasas (rosa claro) y transposasas (naranja). En morado el gen *exoY* que tampoco se encuentra en esta cepa. En amarillo los genes flanqueantes de la sección estudiada: *bacA* y *vqsM*.

2.2.3 Mecanismos transferibles de resistencia a las quinolonas.

Presencia de *crpP*

De las 59 cepas que se incluyeron en este estudio, 43 presentaban el gen *crpP* (72,9%), siendo 24 de ellas cepas clínicas, 17 no clínicas y las cepas de referencia PA7 y PA14 que también tienen origen clínico. Ninguna de las cepas del estudio presentaba otro mecanismo de resistencia a quinolonas transferible. Veintiuna de las 43 cepas *crpP*-positivas fueron sensibles a todas las fluoroquinolonas testadas (49%).

Al comparar las secuencias de aminoácidos del CrpP de las 43 cepas de este trabajo con la secuencia de la primera descripción de CrpP (CrpP-1; Secuencia de referencia NCBI: WP_033179079.1) se encontraron siete variantes agrupadas en tres clados (Figura 99).

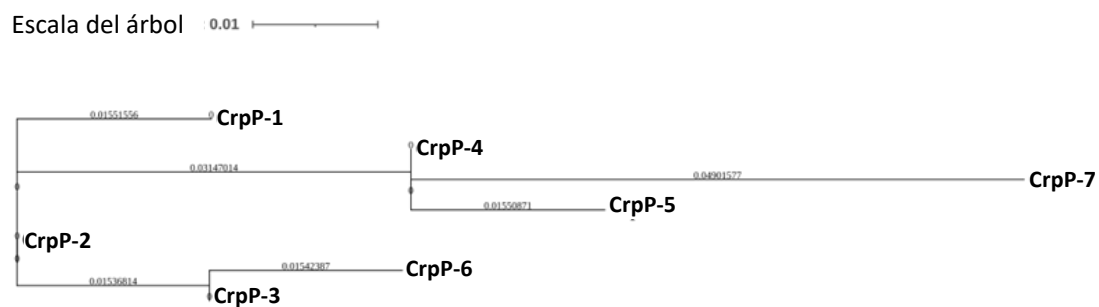


Figura 99: Árbol filogenético de máxima verosimilitud generado por el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las variantes de CrpP encontradas en este estudio. La alineación y el árbol fueron generados con MEGA11. CrpP1 corresponde a la secuencia considerada WT, la primera descrita (WP_033179079.1).

El denominado CrpP-1 es la proteína tipo y las otras seis variantes presentan cambios aminoacídicos al menos en las posiciones Gly7 y/o Ile26. Todas estas variantes habían sido previamente descritas, excepto la variante CrpP-7, que ha sido descrita por primera vez en este estudio. Esta variante CrpP-7 mostró 5 cambios con respecto a CrpP-1 (92% de identidad), y se detectó en tres *P. aeruginosa* sensibles a las fluoroquinolonas aisladas de muestras de heces de jabalí (Tabla 29).

Tabla 29. Sustituciones de aminoácidos de cada variante de CrpP detectadas en este estudio en comparación con la primera CrpP descrita en el plásmido pUM505 (CrpP-1).

Variantes del CrpP	Sustituciones aminoacídicas en las posiciones del CrpP								Numero de cepas
	V1	S2	K3	K4	G7	F16	I26	Q26	
CrpP-1	-	-	-	-	-	-	-	-	11
CrpP-2		-	-	-	D	-	-	-	10
CrpP-3		-	-	R	D	-	-	-	8
CrpP-4		-	-	-	H	-	L	-	2
CrpP-5		-	-	-	H	Y	L	-	7
CrpP-6	-	-	-	R	D	-	-	K	2
CrpP-7*	M	L	L	-	H	-	L	-	3

* CrpP-7 es una nueva variante que se encuentra solo en nuestro estudio.

CrpP-1 fue la variante predominante (11 cepas, 26%), seguida de CrpP-2 (10 cepas, 23%), CrpP-3 (8 cepas, 19%) y CrpP-5 (7 cepas, 16%). Aunque en general no hay diferencias significativas entre la variante de CrpP y los ST de cada cepa, cabe destacar que las variantes CrpP-4, CrpP-6 y CrpP-7 se detectaron únicamente en cepas pertenecientes a ST274, ST217 y ST1711, respectivamente, y las cuatro cepas pertenecientes al clon de alto riesgo ST175 albergaban la variante CrpP-2.

El análisis de la localización genética de *crpP* en el genoma de nuestras cepas de *P. aeruginosa* reveló que el gen estaba ubicado en ICEs cromosómicos en todas las cepas positivas para *crpP*. Todas las ICEs de *crpP* eran de un tamaño entre 80 y 165 Kb, con un contenido en GC de 59-60% y llevaban asociada una relaxasa MOBH2. Estas ICEs se insertaron en todos los casos adyacentes a un tRNA-Lys. Además, estaban flanqueadas por unas repeticiones directas de 45 pb muy conservadas (*attL* y *attR*) y en ambos extremos de la ICE se encontraban los genes *xerD* y *parA*, que codifican una integrasa de la familia de tirosina recombinasa y la proteína de partición de plásmidos A, respectivamente.

Se encontraron 23 ICEs diferentes y al analizar exhaustivamente la secuencia de estas ICEs, se determinó que tenían una composición variable, aunque se podía observar una organización similar de genes conservados. Todas las secuencias nucleotídicas de las ICEs encontradas se apilaron y con este alineamiento se construyó un árbol filogenético basado en los SNPs y usando la secuencia de pUM505 como referencia (Figura 100).

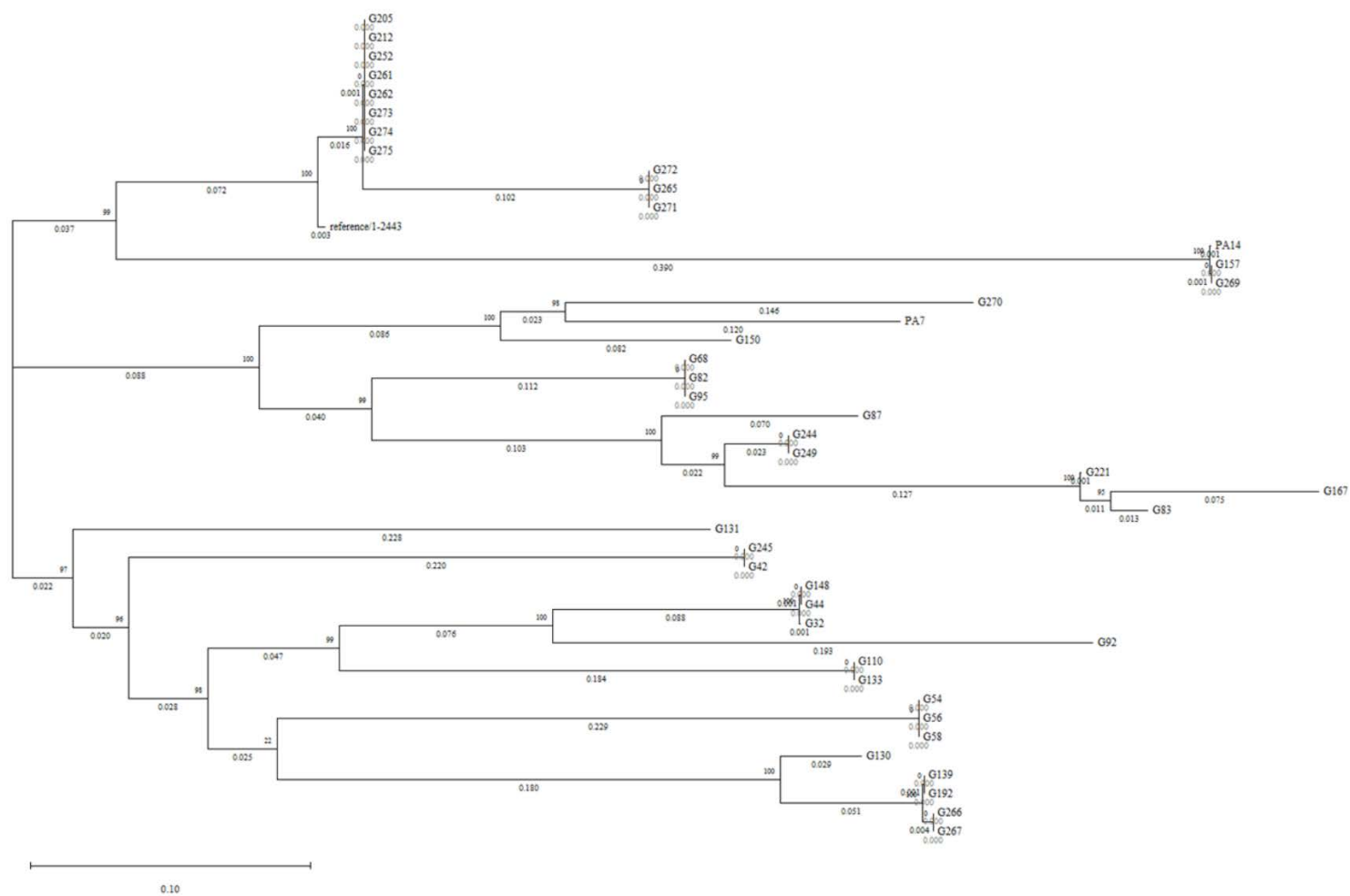


Figura 100: Árbol filogenético de los *crpP*-ICEs detectados en las 43 *P. aeruginosa crpP*-positivas usando el plásmido pUM505 como referencia (referencia 1-2443). Se ha construido basándose en la alineación concatenada de los SNP de alta calidad, utilizando MEGA-11.

Estas 23 ICEs diferentes se agrupaban en 3 clados. Además, se ha observado una asociación entre el tipo de *crpP*-ICE y el ST al que pertenece cada cepa de *P. aeruginosa* analizada, destacando que todas las *P. aeruginosa* ST973 (G205, G212, G252, G261, G262, G273, G274 y G275) mostraron el mismo *crpP*-ICE y que las cepas G157, G269 y PA14 que pertenecían al complejo clonal CC253 portaban *crpP*-ICEs similares (Figura 101). Sin embargo, las cepas pertenecientes a los ST155, ST244 y ST274 tuvieron una gran variedad de *crpP*-ICEs (Figura 101).

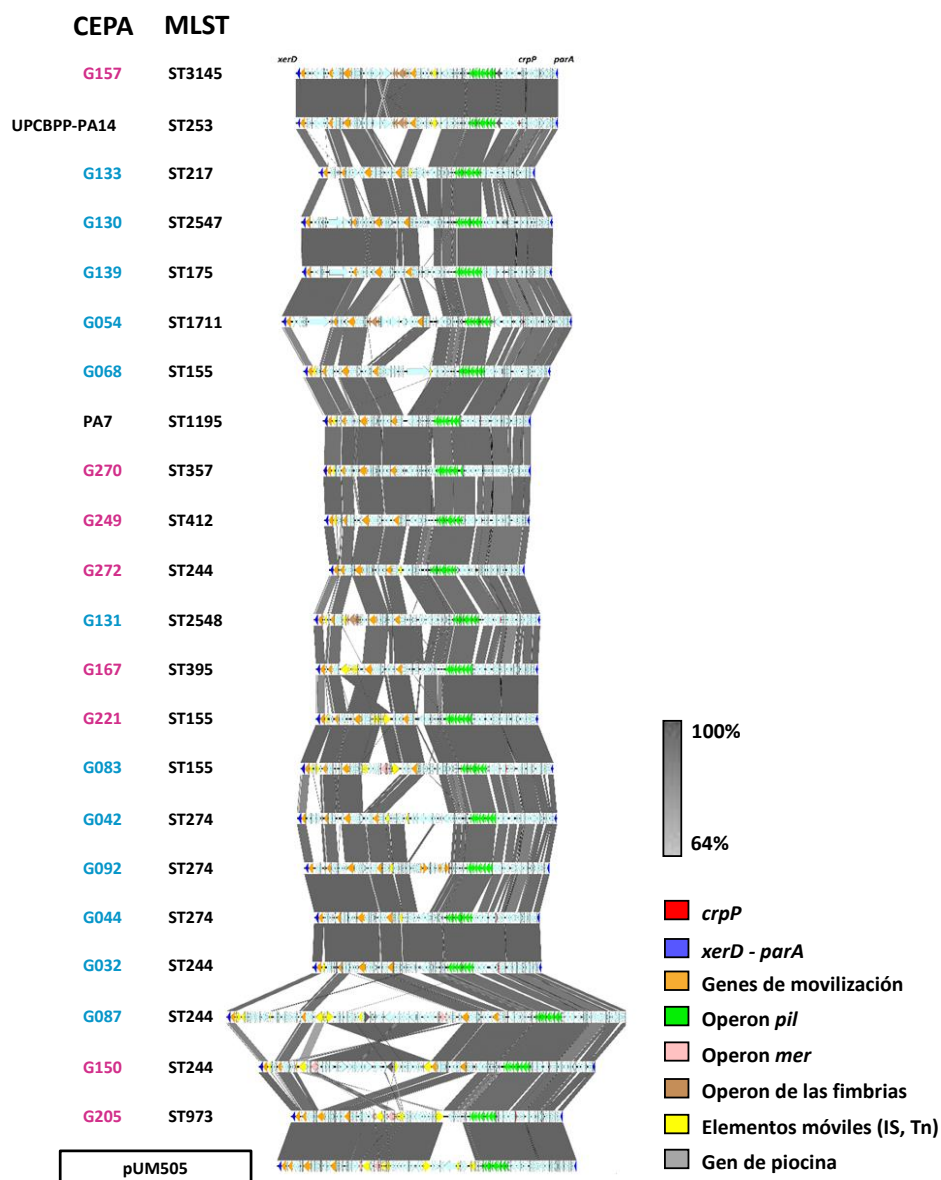


Figura 101: Comparación de los diferentes entornos genéticos del gen *crpP* detectados en *P. aeruginosa* *crpP*-positivas. Las flechas representan genes e indican la orientación. Los genes más relevantes se indican mediante flechas de colores de la siguiente manera: genes *xerD* y *parA* (azul oscuro), genes de movilización (genes *virB*, *virD*, genes *tra* y operón *trb*) (naranja), operón *pil* (verde), operón *mer* (rosa), operón de las fimbrias (marrón), elementos móviles (IS y Tn) (amarillo), gen de piocina (gris oscuro) y gen *crpP* (rojo).

Las estructuras de los 23 *crpP*-ICE diferentes se compararon, y se observó que todas mostraron una región conservada y otra variable, como se presenta en la Figura 101.

La región conservada, delimitada entre el gen codificante para la metiltransferasa de clase I SAM-dependiente y el gen *paraA*, era la región que incluía el gen *crpP* y el operón de síntesis del pili tipo IV. Por otro lado, la región variable, delimitada entre el gen *xerD* y el gen de la metiltransferasa de clase I SAM-dependiente, presentó una gran variedad de estructuras que incluían diferentes secuencias de inserción (*ISPa32*, *ISPa40*, *ISPa97*, *ISPa121*, *ISPa125*, *TnAs1*, etc.), los operones *cupA*, *cupD* o *cupE* relacionados con las fimbrias, el operón *mer* relacionado con la resistencia a mercurio, los genes que codifican las bacteriocinas piocina S5 y S8, y genes de movilización como *virB*, *virD*, *tra* y *trb*, entre otros. Concretamente, en las cepas G87 y G150 se detectó el gen codificante para la piocina S8, *pys8*, localizado en el entorno genético del transposón Tn6350.

Además, las 23 integrasas XerD identificadas en este estudio tenían una homología de aminoácidos entre 59,8 y 99,8%. Se construyó un árbol filogenético alineando las proteínas XerD y se identificaron cuatro ramas diferentes (Figura 102).

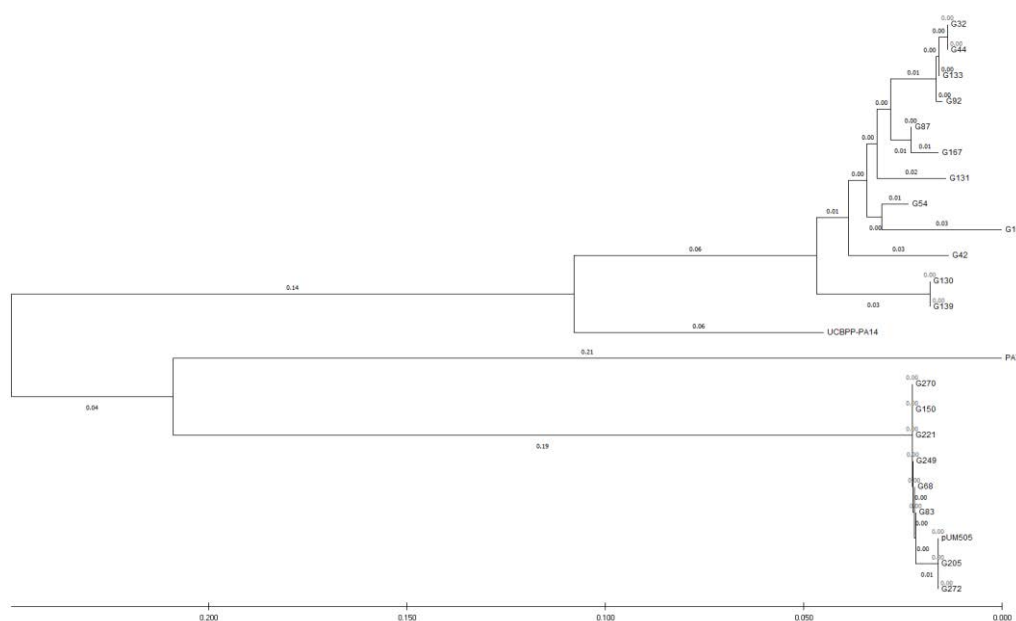


Figura 102: Árbol filogenético comparativo de las 23 proteínas XerD que codifican para las integrasas de las ICEs que albergan *crpP* en *P. aeruginosa* y el plásmido de referencia pUM505 (HM560971.1). Se construyeron basados en la alineación concatenada de los SNP de alta calidad utilizando MEGA-11.

En cuanto a los puntos de inserción de las 43 *crpP*-ICEs en el genoma, se observó su integración en puntos críticos específicos, concretamente, detrás de un tRNA-Lys, en uno de los dos entornos genéticos siguientes:

- *PA4541/PA4542*, el ICE se insertó entre *PA4541 (lepA)* y *PA4542 (clpB)* después de un cluster de tRNAs (tRNA-Asn, tRNA-Pro, tRNA-Lys) (observado en 29 cepas, incluida PA14).
- *PA0976/PA0988*, el ICE se insertó entre *PA0976 (queC)* y *PA0988 (CoAhidrolasa)* después de un único tRNA-Lys (detectado en 14 cepas, incluida PA7).

Estos dos puntos de inserción se consideran regiones de plasticidad genómica o “puntos calientes” del genoma. Curiosamente, las 14 cepas que albergaron el *crpP*-ICE dentro del punto *PA0976/PA0988*, mostraron el “punto caliente” *PA4541/PA4542* vacío. Sin embargo, algunas de las que insertaron la ICE del *crpP* en el punto *PA4541/PA4542* contenían diferentes estructuras en el punto *PA0976/PA0988* (Tabla 30, Figura 103):

- 10 cepas mostraron una estructura *PA0976/PA0988* vacía.
- 4 cepas portaban la isla genómica PAPI-2 incluyendo el gen *exoU (exoU-PAGI)*.
- 6 cepas albergaban una ICE conteniendo el gen *pyoS5 (pyoS5-ICE)*.
- Una cepa presentó una isla genómica similar a PAGI-5 (GenBank: EF611301).
- 8 cepas (todas pertenecientes a ST973) no pudieron resolverse totalmente, por problemas de ensamblaje, y no pudo determinarse completamente esta región.

La estructura genómica asociada a los “puntos calientes” *PA4541/PA4542* y *PA0976/PA0988* también fue analizada en las 16 cepas de *P. aeruginosa* negativas para *crpP* secuenciadas en este estudio (Tabla 30, Figura 103).

El punto de inserción *PA4542/PA4541* estaba vacío en todas las cepas excepto en una. El punto *PA0976/PA0988* estaba vacío en seis cepas, pero incluía el *exoU-PAGI* en dos cepas, una *pyoS5-ICE* en cuatro cepas (incluida la cepa PA01), una isla genómica similar a PAGI-5 en dos cepas y una ICE, cuya inserción eliminó desde *PA0988* hasta *PA0998*, dejando un gen *pqsB* truncado (*PA0997*), en otras dos cepas.

Tabla 30: Elementos móviles insertados en los puntos de inserción PA0976/PA0988 y PA4541/PA4542 de las 59 *P. aeruginosa* analizadas.

Región PA0976 (<i>queC</i>) -tRNA-PA0988 (CoAhydrolase)	Región PA4542 (<i>clpB</i>)-cluster tRNA- - PA4541 (<i>lepA</i>)	Número de cepas
<i>crpP</i> -ICE	Vacía	13
Vacía	<i>crpP</i> -ICE	10
Vacía	Vacía	6
<i>exoU</i> -PAGI	<i>crpP</i> -ICE	4
<i>exoU</i> -PAGI	Vacía	2
<i>crpP</i> -ICE + <i>exoU</i> -PAGI	Vacía	1
<i>pyoS5</i> -PAGI*	<i>crpP</i> -ICE	6
<i>pyoS5</i> -PAGI*	Vacía	3
<i>pyoS5</i> -PAGI*	ICE parcial**	1
Similar a PAGI-5	<i>crpP</i> -ICE	1
Similar a PAGI-5	Vacía	2
ICE***	Vacía	2
Desconocido****	<i>crpP</i> -ICE	8

* El gen *pyoS5* codifica una Pyocina S5

** La ICE no pudo ser completamente reconstruida

*** Una ICE eliminó la región de PA0988 a PA0998, dejando parcial el gen *pqsB*.

**** No fue posible reconstruir totalmente la región entre PA0976 y PA0988 en todas estas cepas (todas ST973)

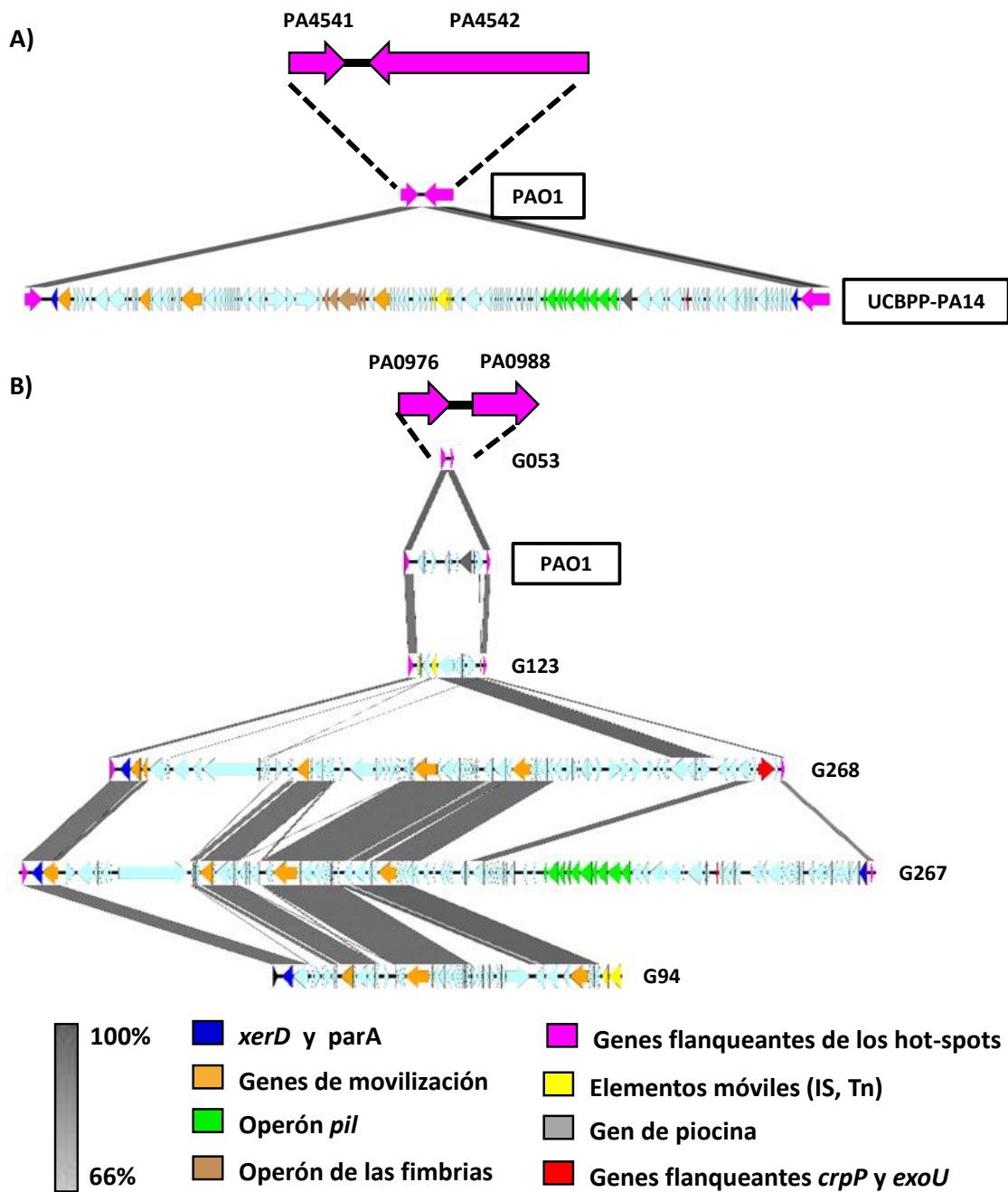


Figura 103: Análisis de “puntos calientes” en las 59 cepas de *P. aeruginosa* de este trabajo: a) región vacía PA4541/PA4542 (*lepA/clpB*) en la cepa PAO1 y *crpP*-ICE insertada en este punto en la cepa PA14. b) Región vacía PA0976/PA0988 (*queC*/CoAhidrolasa) en la cepa G073, *pyoS5*-ICE en la cepa PAO1, ICE similar a PAgI-5 en G123, *exoU*-PAGI en G268, *crpP*-ICE en G267 y la inserción de una ICE que delecionó desde PA0988 a PA0998 en G94.

3. Análisis del clon ST274

Algunos ST de *P. aeruginosa* se han asociado con resistencia a antibióticos, virulencia o características infecciosas determinadas. El clon ST274 de *P. aeruginosa* se considera un clon epidémico internacional asociado al entorno hospitalario, que coloniza pacientes con fibrosis quística en todo el mundo y que junto a ST395, se identificó como un clon endémico en España (López-Causapé *et al.*, 2017). Por ello, otro de los objetivos de esta tesis fue analizar las características biológicas y genómicas de las cepas de *P. aeruginosa* ST274 aisladas de diferentes orígenes, no sólo clínicos, para poder comprender los mecanismos que favorecen su éxito y persistencia en los procesos infecciosos de los pacientes con fibrosis quística (Figura 104).

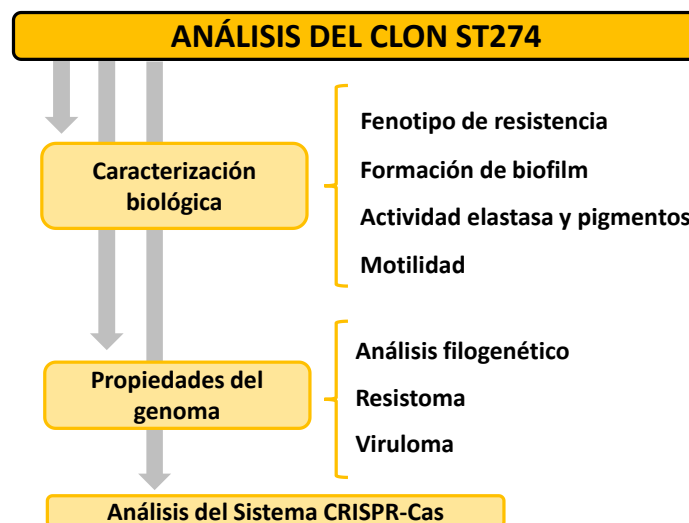


Figura 104: Resumen gráfico del análisis llevado a cabo en cepas pertenecientes al ST274.

De la colección analizada en el capítulo 1 de esta tesis, se seleccionaron once cepas de *P. aeruginosa* pertenecientes al clon ST274 para este estudio. Estas cepas procedían de diferentes orígenes (número de cepas): muestras respiratorias (2) y hemocultivos (3) de pacientes sin fibrosis quística, muestras fecales de voluntarios sanos (2), muestras de alimentos vegetales (2) y muestras de agua de río (2) (Tabla 31, Figura 105).

Tabla 31. Características de las once cepas *P. aeruginosa* ST274 de diferentes orígenes seleccionados para este estudio.

Cepa	Procedencia ^a	Origen	Patrón de PFGE	Serotipo ^b	Fenotipo de resistencia ^c	CMI (mg/L) ^d											Virulotipo ^e	
						PTZ	CAZ	FEP	IMP	MER	DOR	GEN	TOB	CIP	LEV	CT		ATM
G042	NC	Individuos sanos	P2	O:3	multiS	≤8	4	4	2	≤1	≤1	4	≤2	≤0.5	≤1	≤2	8	V1
G044	NC	Individuos sanos	P4	PoliA	modR	≤8	16	4	4	≤1	≤1	4	≤2	≤0.5	≤1	≤2	8	V1
G073	NC	Alimentos (lechuga)	P5	O:3	multiS	≤8	2	4	≤1	≤1	≤1	4	≤2	≤0.5	≤1	≤2	4	V1
G092	NC	Alimentos (acelga)	P6	O:3	multiS	≤8	2	4	≤1	≤1	≤1	4	≤2	≤0.5	≤1	≤2	8	V1
G105	NC	Medioambientales (Agua río)	P9b	O:3	multiS	≤8	2	4	≤1	≤1	≤1	4	≤2	≤0.5	≤1	≤2	8	V1
G115	NC	Medioambientales (Agua río)	P9b	O:3	multiS	≤8	2	4	≤1	≤1	≤1	4	≤2	≤0.5	≤1	≤2	8	V1
G148	C	Sangre	P7	O:3	multiS	≤8	2	4	≤1	≤1	≤1	4	≤2	≤0.5	≤1	≤2	4	V1
G178	C	Sangre	P8	AutoA	multiS	≤8	2	4	≤1	≤1	≤1	4	≤2	≤0.5	≤1	≤2	4	V1
G179^f	C	Sangre	P9a	AutoA	XDR, DTR	>64	>16	>16	>8	8	>4	8	≤2	2	4	≤2	>16	V1
G224	C	Respiratoria	P3	O:3	multiS	16	2	2	≤1	≤1	≤1	4	≤2	≤0.5	≤1	≤2	8	V1
G245^f	C	Respiratoria	P1	PoliA	multiS	≤8	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤2	≤2	≤0.5	≤1	≤2	≤1	V2

^a NC: no clínica; C: clínica

^bPoliA: poliaglutinante; AutoA: autoaglutinante

^cMultiS (sensible a todos los agentes antipseudomónicos probados), ModR (no sensible al menos a un agente en 1 ó 2 categorías), XDR (no sensible a los agentes de todas las categorías excepto 1 ó 2), DTR (resistente-difícil de tratar). ^dCMI (concentración mínima inhibitoria), PTZ (piperacilina-tazobactam), CAZ (ceftazidima), FEP (cefepima), IMP (imipenem), MER (meropenem), DOR (doripenem), GEN (gentamicina), TOB (tobramicina), CIP (ciprofloxacina), LEV (levofloxacina), CT (colistina) y ATM (aztreonam) determinada mediante el sistema de microdilución MicroScan WalkAway®. Los valores de resistencia según los puntos de corte CLSI (2022) están marcados con rojo y los valores de resistencia intermedios se sombrearon en amarillo.

^eVirulotipo V1: las cepas amplificaron los genes *exoS*, *exoY*, *exoT*, *exoA*, *lasA*, *lasB*, *aprA*, *rhIAB*, *rhII*, *rhIR*, *lasI* y *lasR*. Virulotipo V2: virulotipo 1 pero con el gen *lasR* truncado por la secuencia de inserción *ISPsp7* (*lasRΔISPsp7*).

^fCepas hiperproductoras de AmpC.



Figura 105: Esquema de la procedencia de las cepas del estudio de análisis de *P. aeruginosa* ST274.

Las 11 cepas, caracterizadas por presentar serotipo O:3 en siete cepas y no tipable por aglutinación en las cuatro restantes, se agruparon en nueve patrones de PFGE (Figura 106). Se encontró un patrón indistinguible entre las dos cepas de agua de río (G105, G115) y estrechamente relacionado con la cepa G179 de origen clínico (Tabla 31).

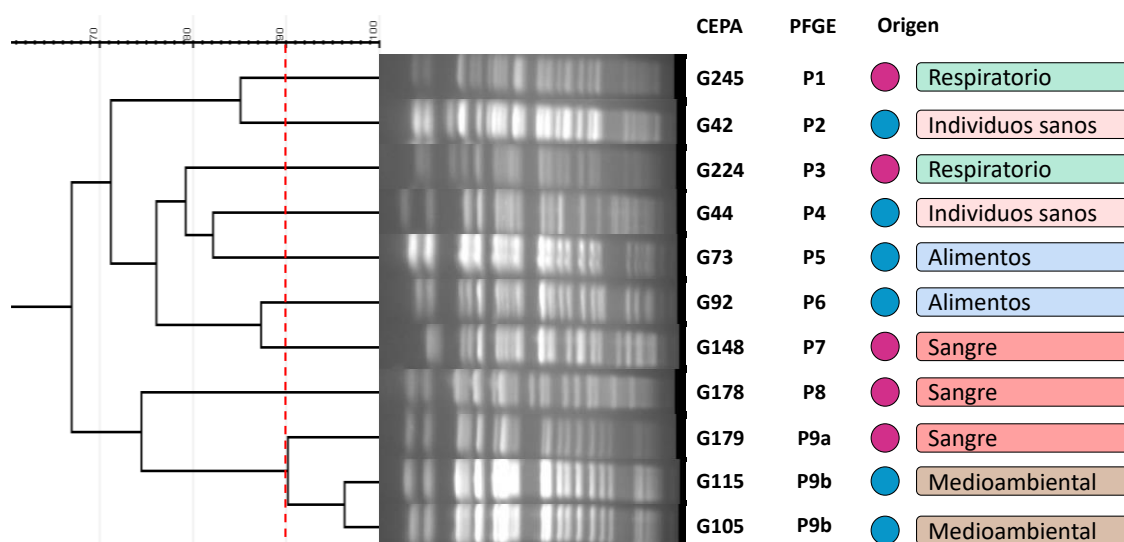


Figura 106: Dendrograma de patrones PFGE en *P. aeruginosa* ST274 de diferentes orígenes. Se indican las cepas, los patrones de PFGE y el origen: no clínicas (azul) o clínicas (magenta). La línea vertical roja indica una similitud del 90% a partir de la cual las cepas se consideran relacionadas clonalmente.

En cuanto al virulotipo, todas las cepas amplificaron los genes *exoS*, *exoY*, *exoT*, *exoA*, *lasA*, *lasB*, *aprA*, *rhlAB*, *rhlI*, *rhlR*, *lasI* y *lasR*, salvo la cepa G245, que tenía el gen *lasR* truncado por el elemento *ISPsp7*, una secuencia de inserción de la familia IS30. No se detectaron los genes *exoU* y *exlA* en ninguna de las cepas ST274 (Tabla 31).

A continuación, se agrupan las características biológicas de las 11 cepas ST274:

3.1 Características biológicas

3.1.1 Fenotipo de resistencia a agentes antipseudomónicos.

Se analizaron 12 agentes antipseudomónicos mediante el sistema de microdilución MicroScan WalkAway® y cefiderocol, ceftazidima-avibactam y ceftolozano-tazobactam mediante difusión en disco. De las 11 cepas incluidas en este estudio, 9 fueron sensibles a todos los agentes testados y fueron clasificadas como multiS. La cepa no clínica G044 mostró resistencia intermedia a ceftazidima e imipenem y se clasificó como modR. La cepa clínica G179 mostró fenotipos no sensibles a piperacilina-tazobactam, ceftazidima, cefepima, imipenem, meropenem, doripenem, gentamicina, ciprofloxacina, levofloxacina y aztreonam, y se clasificó como extremadamente resistente (XDR) y resistente-difícil de tratar (DTR) (Tabla 31). Todas las cepas fueron sensibles a colistina, cefiderocol, ceftazidima-avibactam y ceftolozano-tazobactam. Ninguna de las cepas del estudio mostró fenotipos de carbapenemasas de clase A, β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) o metalo- β -lactamasas (MBL), sin embargo, se observó hiperproducción de AmpC en dos cepas (G179 y G245) (Tabla 31).

3.1.2 Formación de biofilm

La producción de biomasa de biofilm (método CV) y la cuantificación de la actividad metabólica bacteriana dentro del biofilm (método FDA) se midieron en comparación con la cepa de control PAO1, y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 107 y la Tabla 32.

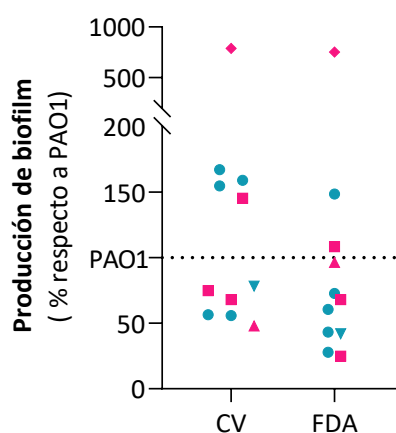


Figura 107: Producción de biofilm de *P. aeruginosa* ST274 respecto a PAO1. Línea de puntos (valor PAO1=100%). Los símbolos azules representan las cepas no clínicas y los símbolos magenta a cepas clínicas. El triángulo magenta corresponde a la cepa XDR/DTR, el triángulo azul a la cepa ModR y el rombo magenta a la cepa con *lasR* truncado.

Seis cepas (55%, tres de ellas clínicas y tres no clínicas) mostraron menos producción de biomasa que la cepa control PAO1 y ocho cepas (73%) menos actividad metabólica bacteriana que PAO1. Tanto la cepa modR como la cepa XDR/DTR mostraron una producción de biofilm baja (78,3% y 47,9% en CV y 41,9% y 96,4% en FDA respectivamente), mientras que la cepa *lasR*-truncada tuvo una producción de biofilm muy alta (787% en CV y 753% en FDA).

3.1.3 Actividad elastasa y producción de pigmentos

Los resultados obtenidos para la actividad elastasa y la producción de pigmentos se resumen en la Figura 108 y la Tabla 32. La actividad elastasa fue superior a la cepa control PAO1 en seis cepas (55%). Todas las cepas no clínicas, mostraron una actividad elastasa mayor del 400%, excepto ambas cepas de voluntarios sanos cuyas producciones fueron inferiores al 7%. Además, la cepa G179 con fenotipo de resistencia XDR/DTR mostró una baja actividad elastasa (11% respecto *P. aeruginosa* PAO1).

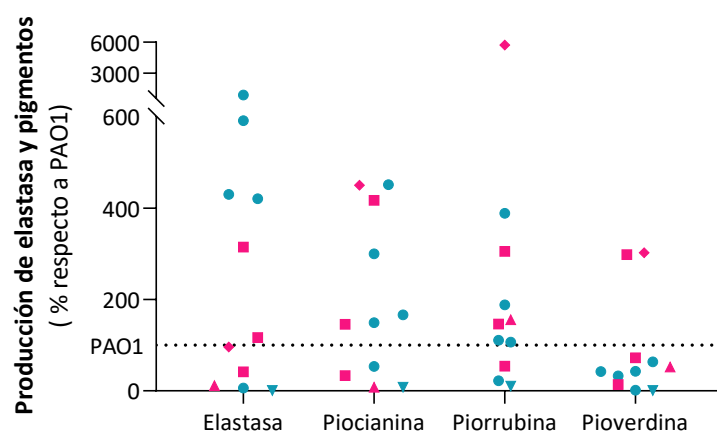


Figura 108: Actividad elastasa y producción de pigmentos de las 11 cepas *P. aeruginosa* ST274 analizadas. Línea de puntos (valor de producción de la cepa de referencia PAO1=100%). Los símbolos azules representan las cepas no clínicas y los símbolos magenta a cepas clínicas. El triángulo magenta corresponde a la cepa XDR/DTR, el triángulo azul a la cepa ModR y el rombo magenta a la cepa con *lasR* truncado.

Siete (64%) y ocho (73%) de las cepas analizadas mostraron una producción de los pigmentos piocianina y piorrubina mayor que la cepa de referencia PAO1 (entre 146-452% y 106-5.714%, respectivamente). Sin embargo, solo dos de las cepas analizadas (18%), ambas de origen clínico y con fenotipo multiS, mostraron mayor producción de

pioverdina que PAO1 (G178 (299%) y G245 (302%)). La cepa XDR/DTR produjo una cantidad de piocianina excepcionalmente baja (8%), y la cepa modR mostró una producción muy baja de todos los pigmentos estudiados. Por otro lado, la cepa *lasR*-truncada mostró una producción excepcionalmente alta de piorrubina (5.714%), piocianina (450%) y pioverdina (302%).

3.1.4 Motilidad

En todas las cepas ST274 se encontró una alta motilidad de swarming (rango de área 5.892 a 6.400 mm²), swimming (rango de 6.264 a 6.400 mm²) y twitching (diámetros de 26-38 mm), excepto en tres cepas. Estas tres cepas mostraron baja motilidad (área ≤2.500 mm² que osciló entre 34 y 2.100 mm²) para swarming y swimming, y un diámetro de twitching inferior a 5 mm; y correspondían a las cepas G044 y G179 (cepas con fenotipo modR y XDR/DTR, respectivamente) y la cepa G245 con *lasR*-truncado (Figura 109 y la Tabla 32). Resultan destacables los altos valores de swimming y swarming (6.400 mm²) de la cepa G178 (aislada de hemocultivo, multiS y autoaglutinante) frente al extraordinariamente bajo valor de twitching (1 mm).

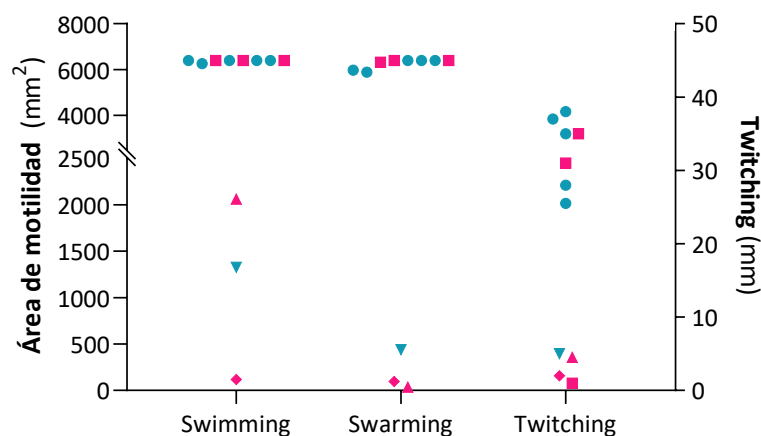


Figura 109: Valores de motilidad encontrados en las cepas de *P. aeruginosa* ST274. Se representan los valores del área encontrada en los experimentos de swimming y swarming (en mm²) y el diámetro en el análisis de twitching (en mm). Los símbolos azules representan las cepas no clínicas y los símbolos magenta a cepas clínicas. El triángulo magenta corresponde a la cepa XDR/DTR, el triángulo azul a la cepa ModR y el rombo magenta a la cepa con *lasR* truncado.

Tabla 32: Características biológicas detectadas en las 11 cepas de *P. aeruginosa* ST274.

	Biofilm (%) ^a		Elastasa (%) ^a	Producción de pigmentos (%) ^a			Motilidad ^b		
	CV	FDA		Piocianina	Piorrubina	Pioverdina	Swimming (mm ²)	Swarming (mm ²)	Twitching (mm)
G042	154,1	72,7	6,3	53,8	22,1	1,6	6.264	6.400	26
G044	78,3	41,9	1,1	7,9	10,5	0,8	1.325	439	5
G073	167,1	43,3	420,9	149,5	106,5	63,9	6.400	5.969	37
G092	159,0	148,6	430,4	166,5	111,1	42,4	6.400	5.892	38
G105	55,8	60,6	879,7	452,1	389,0	32,8	6.400	6.400	35
G115	56,6	27,9	592,1	300,1	188,5	43,2	6.400	6.400	28
G148	145,3	108,5	117,0	145,6	146,4	72,3	6.400	6.323	35
G178	68,1	24,8	315,3	417,4	305,4	298,6	6.400	6.400	1
G179	47,9	96,4	11,3	8,1	156,1	52,1	2.059	34,76	5
G224	74,9	68,0	41,8	33,5	54,3	13,7	6.400	6.400	31
G245	787,5	753,4	96,2	450,3	5714,3	302,4	118	96,85	2

^a: La producción de biomasa de biofilm (CV), la actividad metabólica de las bacterias dentro del biofilm (FDA), la producción de piocianina, piorrubina y pioverdina, y la producción de elastasa se muestran como porcentaje en comparación con los valores de la cepa control *P. aeruginosa* PAO1 y los colores representan una producción baja (verde), producción media (naranja), producción alta (rojo) y producción muy alta (morado). ^bLa motilidad se representa como baja (verde) o muy alta (morado).

3.2 Propiedades del genoma de *P. aeruginosa* ST274 de diferentes orígenes

El genoma de las cepas de este estudio fue secuenciado completamente mediante NGS (Illumina, HiSeq 1500). Las propiedades de los genomas de estas 11 cepas y sus parámetros de ensamblaje se detallan en la Tabla 33. Los tamaños del genoma oscilaron entre 6.241.882 y 6.805.979 bases con un contenido de GC del 66,04 al 66,54%. El número total de contigs fluctuó entre 46 y 109 y el de genes osciló entre 5.734 y 6.267.

Tabla 33: Características generales de los genomas de las 11 *P. aeruginosa* ST274 estudiadas.

Cepa	Lecturas	Parámetros de ensamblaje			Elementos genéticos							
		Nº contigs	Contig de máxima longitud (pb)	Total de bases en contigs > 1 kb	N50 (pb)	Tamaño del genoma (pb)	Contenido GC (%)	CDS	Genes	rRNA	tRNA	tmRNA
G042	5.890.730	87	726.697	6.748.134	353.893	6.757.744	66,04	6.166	6.241	3	71	1
G044	5.143.091	76	739.379	6.550.288	612.825	6.556.612	66,29	6.000	6.076	3	72	1
G073	4.765.846	66	1.027.638	6.349.927	704.215	6.355.219	66,47	5.786	5.861	3	71	1
G092	6.001.411	68	1.029.741	6.402.390	726.878	6.410.342	66,42	5.840	5.913	3	69	1
G105	5.647.144	46	768.785	6.241.289	621.817	6.241.882	66,54	5.659	5.734	3	71	1
G115	5.060.730	62	768.777	6.302.900	621.730	6.309.215	66,43	5.741	5.816	3	71	1
G148	5.581.661	69	931.567	6.423.973	695.550	6.430.217	66,35	5.856	5.934	6	71	1
G178	17.116.583	59	1.439.870	6.404.614	606.103	6.412.019	66,43	5.825	5.901	4	71	1
G179	7.309.267	78	729.747	6.244.365	427.443	6.251.772	66,53	5.662	5.739	3	73	1
G224	5.613.901	61	1.454.566	6.350.601	804.729	6.356.169	66,48	5.821	5.896	3	71	1
G245	11.589.531	109	726.712	6.794.368	409.397	6.805.979	66,07	6.192	6.267	3	71	1

3.2.1 Análisis filogenético

El análisis filogenético se realizó con un total de 27 cepas de *P. aeruginosa*, comparando las 11 *P. aeruginosa* ST274 de este trabajo con 14 genomas de *P. aeruginosa* ST274 de diferentes localizaciones geográficas y orígenes obtenidos de la base de datos del NCBI y, además, se incluyeron los genomas de las cepas de referencia *P. aeruginosa* PAO1 y PA14 (Tabla 34).

Tabla 34: Características de los 14 genomas de *P. aeruginosa* pertenecientes al ST274 y de las cepas de control PAO1 y PA14 descargadas de la base de datos NCBI.

Cepa	Procedencia del aislado	Origen	Fecha de aislamiento	Localización geográfica	Biosample
AUS603	Fibrosis quística	C	2008	Australia	SAMEA103045168
AZPAE14926	Infección del tracto urinario	C	2008	Brasil	SAMN03105624
AZPAE12412	Fibrosis quística	C	2007	EEUU	SAMN03105403
AZPAE14914	Infección del tracto urinario	C	2008	España	SAMN03105612
AZPAE14971	Infección intraabdominal	C	2010	China	SAMN03105668
AZPAE15033	Infección intraabdominal	C	2011	Francia	SAMN03105730
AZPAE15040	Infección intraabdominal	C	2012	Alemania	SAMN03105737
Env138	Suelo del estanque de caballos	NC	2016	EEUU	SAMN07504808
Env193	Abrevadero de caballos	NC	2016	EEUU	SAMN07504824
FQSE100106	Fibrosis quística	C	2006	España	SAMEA103053418
JYH21	Río	NC	-	Japón	SAMN10478512
Pae_CF67,01l	Fibrosis quística	C	2010	Canadá	SAMN03566240
UY1PSABAL2	Lavado broncoalveolar	C	2016	Camerún	SAMN12273497
VET-37	Secreción oído perro	NC	2011	Estonia	SAMN09478120
PAO1	Herida	C	1954	Australia	SAMN02603714
PA14	Herida de quemados	C	-	EEUU	SAMN02603591

El genoma core, calculado con un 90% de homología y un 90% de cobertura, de estas 27 cepas de *P. aeruginosa*, incluyó 4.538 CDS. Al alinear estos genes y analizar los SNPs, se detectó un rango de 1 a 29.065 de SNPs entre las 27 secuencias analizadas, siendo el rango de 1 a 4.204 entre las 25 cepas *P. aeruginosa* pertenecientes al clon

ST274 y de 1 a 3.665 si comparamos únicamente las 11 *P. aeruginosa* ST274 de este trabajo.

La alineación del core-genoma se utilizó para generar un árbol filogenético (Figura 110) que no mostró diferencias entre cepas de diferentes orígenes o áreas geográficas. También es notable observar que las tres cepas relacionadas por PFGE (G105, G115, G179) estaban ubicadas en un mismo clado cercano a G178 y a los genomas de referencia env193, AZPAE14971 y AUS603.

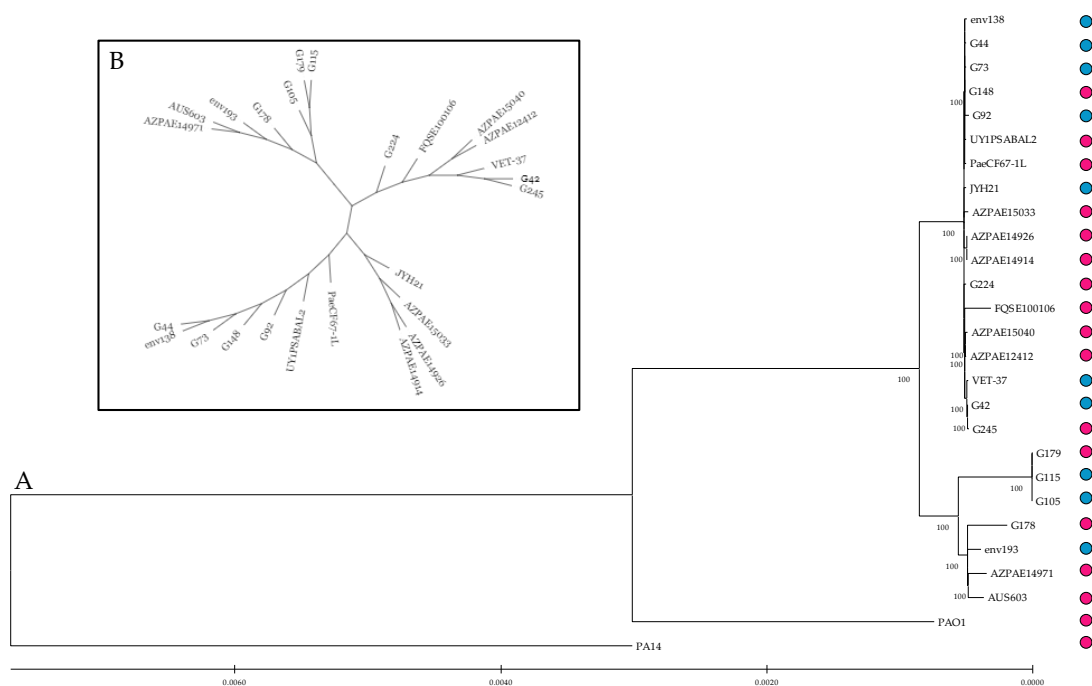


Figura 110: Reconstrucción filogenética del genoma core de *P. aeruginosa*. Relación genética entre las 25 cepas de *P. aeruginosa* pertenecientes al ST274 analizadas y las cepas control PAO1 y PA14. Los puntos magentas y azules representan cepas clínicas y no clínicas, respectivamente. Los números representados en los nodos internos indican los valores de bootstrap, en porcentaje.

El pangenoma se determinó usando Roary para las 25 cepas de *P. aeruginosa* ST274 y las cepas control PAO1 y PA14. Se analizaron un total de 158.151 genes, siendo compartidos entre 5.132 y 5.296 genes core. Se determinó que 2.594 genes eran únicos, es decir, presentes en una sola cepa. Estos genes únicos representaron el 1,6% del número total de genes analizados y se encontraron en un rango de 0 (G105, G179 y env193) a 533 (FQSE100106) (Figura 111 y Tabla 35).

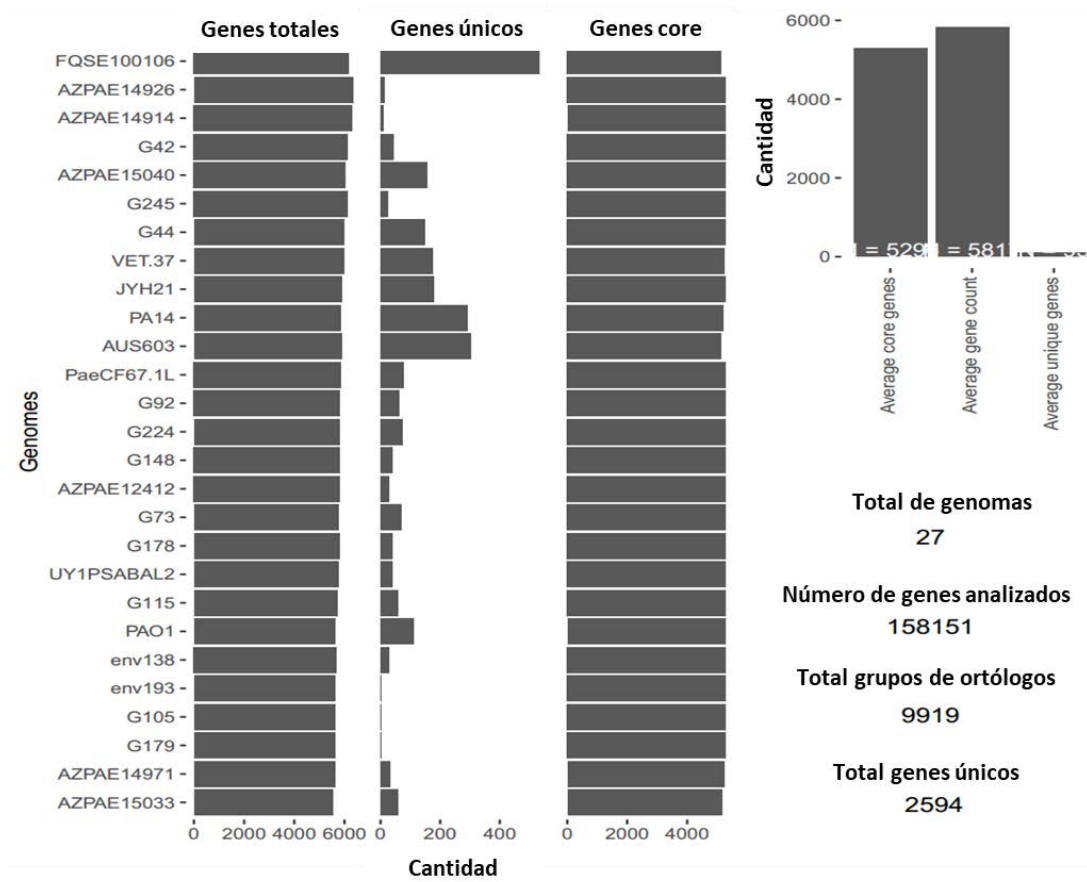


Figura 111: Resultados obtenidos del análisis del pangenoma de las 25 *P. aeruginosa* ST274 y las cepas control PAO1 y PA14. Realizado con Roary.

Tabla 35: Recopilación del número de genes obtenidos al analizar el pangenoma de las 27 cepas incluidas en el análisis, usando Roary.

	Total de genes	Genes únicos	Genes core
G042	6.132	42	5.296
G044	5.968	147	5.296
G073	5.760	70	5.296
G092	5.813	62	5.296
G105	5.632	0	5.296
G115	5.705	60	5.296
G148	5.817	38	5.296
G178	5.789	41	5.295
G179	5.628	0	5.296
G224	5.791	72	5.296
G245	6.137	23	5.295
AUS603	5.888	305	5.132
AZPAE14926	6.327	14	5.283
AZPAE12412	5.821	30	5.282
AZPAE14914	6.307	11	5.273
AZPAE14971	5.622	32	5.233
AZPAE15033	5.533	59	5.156
AZPAE15040	6.036	155	5.279
Env138	5.693	28	5.294
Env193	5.632	0	5.296
FQSE100106	6.176	533	5.145
JYH21	5.893	179	5.296
PaeCF67.1L	5.861	76	5.289
UY1PSABAL2	5.741	39	5.295
VET.37	5.964	176	5.242
PA14	5.855	290	5.211
PAO1	5.630	112	5.274

En este análisis del pangenoma se detectaron 60 ORFs que estaban presentes en las 25 cepas *P. aeruginosa* ST274, pero no en las cepas de control PAO1 y PA14, pudiendo tratarse, por tanto, de genes específicos de este clon. Estas ORFs se clasificaron en 17 categorías COG según el programa Egg-NOGmapper (Tabla 36). Entre estos genes había enzimas como las dehidrogenasas, liasas, reductasas, sintasas; precursores de sideróforos, integrasas, proteínas ribosomales y genes del control de los flagelos, entre otros.

Tabla 36: Genes core detectados únicamente en las cepas de *P. aeruginosa* ST274.

Número	Categoría COG	Nombre	PFAMs	Descripción
1	S	<i>cat</i>	Hexapep	Hexapéptido de transferasa bacteriana (seis repeticiones)
2	E	<i>ycjQ</i>	ADH_N,ADH_zinc_N,GFO_IDH_MocA,GFO_IDH_MocA_C	Deshidrogenasa
4	S	<i>romA</i>	Lactamase_B_2	Hidrolasas dependientes de Zn del pliegue β -lactamasa.
5	Q	<i>ycaC</i>	Isochorismatase	Familia isocorismatasa
6	IQ	-	adh_short_C2	Deshidrogenasas con diferentes especificidades (Relacionadas con alcohol deshidrogenasas de cadena corta)
7	T	-	cNMP_binding	Dominio de unión de nucleótido cíclico-monofosfato
8	-	-	-	-
9	J	<i>pvdYII</i>	Acetyltransf_8	Dominio de proteína de biosíntesis de sideróforos
10	S	-	DUF2875	Proteína de función desconocida (DUF2875)
11	M	<i>wecC</i>	UDPG_MGDP_dh,UDPG_MGDP_dh_C,UDPG_MGDP_dh_N	Pertenece a la familia UDP-glucosa GDP-manosa deshidrogenasa
12	S	-	Polysacc_synt,Polysacc_synt_3,Polysacc_synt_C	Proteína de biosíntesis de polisacáridos.
15	M	<i>epsL</i>	Bac_transf	COG2148 Transferasas de azúcar involucradas en la síntesis de lipopolisacáridos
16	S	-	Hexapep	COG0110 Acetiltransferasa (superfamilia de parches de isoleucina)
18	-	-	-	-
19	K	-	-	Proteína de unión a RNA homóloga al snRNP eucariota
21	PT	<i>fpvR</i>	DUF4880,DUF4974,FecR	Dominio de función desconocida (DUF4880)
22	K	<i>fpvI</i>	Sigma70_r2,Sigma70_r4_2	ECF factor sigma
25	C	-	HEAT_2	Actividad liasa
26	-	-	-	-
27	K	-	DUF4150,Tox-GHH2	GHH que contiene la toxina nucleasa 2 de la superfamilia HNH/Endo VII
28	IQ	-	-	Sintasa
30	K	<i>dnr</i>	HTH_Crp_2,cNMP_binding	Proteína reguladora de AMPc
31	IQ	-	adh_short_C2	Enoil-(proteína transportadora de acilo) reductasa
32	J	<i>rplR</i>	Ribosomal_L18p	Proteína que se une y probablemente media la unión del RNA 5S a la subunidad ribosómica grande, donde forma parte de la protuberancia central.
33	L	-	HTH_Tnp_1	Dominio hélice-giro hélice

Número	Categoría COG	Nombre	PFAMs	Descripción
34	L	-	HTH_21,rve	Dominio central de integrase
35	L	-	-	Pertenece a la familia de las integrasas de fagos
36	S	-	Tautomerase	4-oxalocrotonato tautomerasa
37	O	-	OsmC	Proteína similar a OsmC
38	Q	-	DSBA	Actividad de disulfuro de proteína oxidorreductasa
39	J	<i>rpmD</i>	Ribosomal_L30	Proteína ribosómica L30
40	T	-	HAMP, HATPase_c,HisKA,Hpt,PAS_3,PAS_9,Response_reg	Histidina quinasa
41	I	-	Acyl-CoA_dh_1,Acyl-CoA_dh_2,Acyl-CoA_dh_M,Acyl-CoA_dh_N	acil-CoA deshidrogenasa
42	E	<i>proV</i>	ABC_tran,CBS	ATPasas asociadas con una variedad de actividades celulares.
44	EH	<i>pabB</i>	Anth_synt_I_N,Chorismate_bind	Enzima de unión a corismato
45	S	-	-	Membrana
46	J	<i>rpsR</i>	Ribosomal_S18	Se une como heterodímero con la proteína S6 al dominio central del RNAr 16S, donde ayuda a estabilizar la plataforma de la subunidad 30S.
47	J	<i>rpsF</i>	Ribosomal_S6	Se une con el RNAr 18S al 16S.
48	G	<i>ppiC</i>	Rotamase,Rotamase_3	Peptidilprolil isomerasa
49	N	-	FliL	Controla la dirección de rotación de los flagelos durante la quimiotaxis.
51	S	<i>yigZ</i>	DUF1949,UPF0029	Dominio de función desconocida (DUF1949)
52	J	<i>rpsE</i>	Ribosomal_S5,Ribosomal_S5_C	Ubicado en la parte posterior del cuerpo de la subunidad 30S donde estabiliza la conformación de la cabeza con respecto al cuerpo.
53	I	<i>atoB</i>	Thiolase_C,Thiolase_N	Cataliza la síntesis de acetoacetil coenzima A a partir de dos moléculas de acetil coenzima A. También puede actuar como tiolasa, catalizando la reacción inversa y generando unidades de dos carbonos a partir del producto de cuatro carbonos de la oxidación de ácidos grasos.
54	Q	<i>hpaG</i>	FAA_hydrolase	Familia de hidrolasas de fumarilacetoacetato (FAA)
55	J	<i>rpmJ</i>	Ribosomal_L36	Pertenece a la familia de proteínas ribosómicas bacterianas bL36.
56	E	-	-	Transposasa
58	-	-	SPOR	-
59	J	<i>rplF</i>	Ribosomal_L6	Esta proteína se une al RNAr 23S y es importante en su estructura secundaria. Se encuentra cerca de la interfaz de la subunidad en la base del tallo L7 L12 y cerca del sitio de unión del tRNA del centro de peptidiltransferasa.
60	E	<i>cysE</i>	Hexapep,SATase_N	Hexapéptido de transferasa bacteriana (seis repeticiones)

3.2.2 Resistoma de las cepas *P. aeruginosa* pertenecientes al clon ST274.

Se analizó la presencia de genes de resistencia adquiridos y el resistoma mutacional de las 11 *P. aeruginosa* ST274 de nuestra colección y las 14 *P. aeruginosa* ST274 de referencia obtenidas de la base de datos.

Los genes *bla*_{PDC-24} y *bla*_{OXA-486} (que confieren resistencia a β -lactámicos) se detectaron en todas las cepas estudiadas, excepto en AZPAE15040 que albergaba la variante *bla*_{PDC-69}. Los genes *aph(3')-IIB* (relacionado con resistencia a aminoglucósidos), *catB7* (resistencia a fenicoles) y *fosA* (resistencia a fosfomicina) se detectaron en todas las cepas, excepto en la cepa AZPAE14971 que carecía del gen *aph(3')-IIB*. Estos resultados se resumen en la Tabla 37.

Tabla 37: Genes de resistencia adquiridos detectados en las cepas *P. aeruginosa* pertenecientes al clon ST274 analizadas en este trabajo.

Cepa	Genes de resistencia adquiridos ^a					<i>crpP</i>
	<i>bla</i> _{OXA} ^a	<i>bla</i> _{PAO} ^a	<i>catB7</i>	<i>fosA</i>	<i>aph(3')-IIb_2</i>	
G042	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,02%	99,26%	95,96%
G044	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,02%	99,26%	97,47%
G073	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,02%	99,26%	-
G092	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,02%	99,26%	97,98%
G105	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,51%	99,26%	-
G115	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,51%	99,26%	-
G148	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,02%	99,26%	97,47%
G178	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,51%	99,26%	-
G179	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,51%	99,26%	-
G224	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,02%	99,26%	-
G245	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,02%	99,26%	95,96%
AUS603	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	98,91%	99,51%	99,26%	-
AZPAE14926	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,02%	99,26%	97,98%
AZPAE12412	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,02%	99,26%	97,98%
AZPAE14914	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,02%	99,26%	-
AZPAE14971	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,51%	-	97,98%
AZPAE15033	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,02%	99,26%	-
AZPAE15040	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-69}	99,06%	99,02%	99,26%	-
Env138	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,02%	99,26%	-
Env193	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,51%	99,26%	-
FQSE100106	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,02%	99,26%	98,49%
JYH21	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,02%	99,26%	-
Pae_CF67,011	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,02%	99,26%	-
UY1PSABAL2	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,02%	99,26%	-
VET-37	<i>bla</i> _{OXA-486}	<i>bla</i> _{PDC-24}	99,06%	99,02%	99,26%	95,96% / 8,48% ^b

^a Se muestran los porcentajes de homología obtenidos según Resfinder v.3.2. Se indica la variante detectada en los genes *bla*_{OXA} y *bla*_{PDC}. (-) Ausencia de este gen.

^b Esta cepa tiene dos copias del gen *crpP* (ubicado en los nodos 276 y 292).

Dos cepas de referencia (AZPAE14926 y AZPAE14914) portaban adicionalmente los genes *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *sul1*, *sul2*, *bla_{AER-1}* (al 83,7% de homología) y *floR_1* (al 88,4%).

Para determinar el resistoma mutacional se analizó la presencia de sustituciones no sinónimas en 170 genes cromosómicos involucrados en la resistencia a diferentes antimicrobianos (Anexo 2). Para ello, se consideró como secuencia “wild type” (WT) o salvaje, la de la cepa control *P. aeruginosa* PAO1, excepto para el gen *mexT* cuya secuencia WT fue considerada la de la cepa *P. aeruginosa* PA14. Los cambios aminoacídicos detectados en cada cepa se encuentran recogidos en la Tabla Anexo 5.

El resistoma mutacional observado fue muy similar en todas las cepas del clon ST274 analizadas, tanto las de nuestra colección como las obtenidas de la base de datos (Figura 112). De este modo, la secuencia WT se detectó en 69 genes (41% del total de genes analizados) de todas las cepas ST274, sin embargo, se encontró al menos una mutación no sinónima en 57 genes (34% del total de genes analizados), 13 de los cuales (7,7%) presentaron 3 o más sustituciones de este tipo. Cabe destacar, que el mayor número de cambios aminoacídicos se encontró, independientemente del fenotipo de resistencia de las cepas, en las proteínas PA1797, OprD, MexX, PdxB y MexQ (Figura 112).

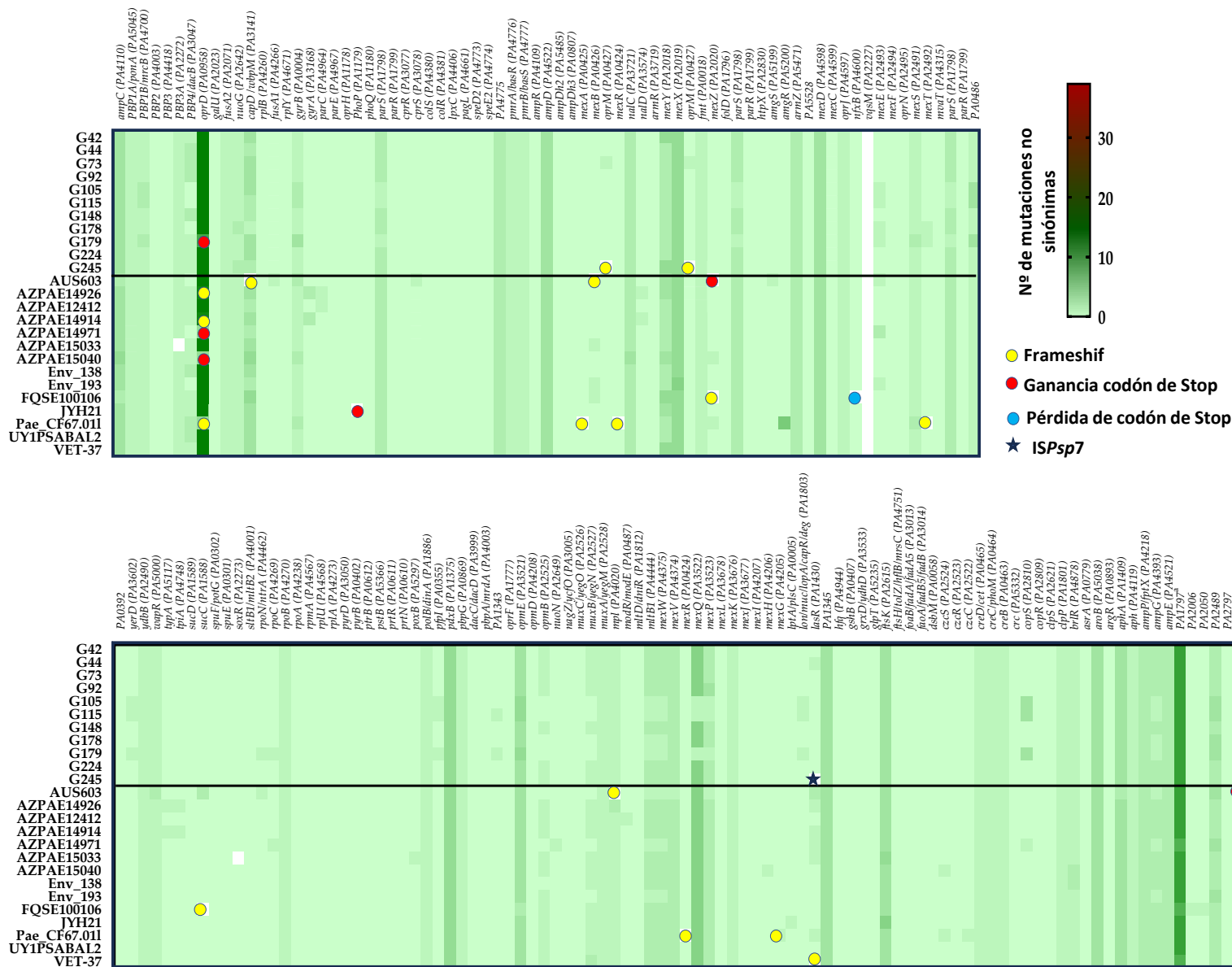


Figura 112: Heatmap representando el resistoma mutacional (mutaciones no sinónimas) en 170 genes implicados en la resistencia a diferentes antimicrobianos de las 11 cepas *P. aeruginosa* ST274 de este trabajo y 14 cepas *P. aeruginosa*-ST274 de referencia obtenidas de la base de datos. La escala de colores representa el número de eventos mutacionales con respecto a la secuencia de *P. aeruginosa* PAO1, excepto *mexT* que se comparó con PA14.

Entre los resultados obtenidos destacan la ausencia del gen *vqsM* y la presencia del mismo/s cambio/s aminoacídico/s en 26 genes (15,3%) en todas las cepas *P. aeruginosa* ST274, tanto sensibles como resistentes a antimicrobianos, y que incluyen sustituciones en proteínas como: los sistemas sensor-reguladores de dos componentes PmrAB (sustituciones L71R y Y345H, respectivamente) y CreBD (E128G y A397V, respectivamente); el regulador AmpD de expresión de β -lactamasa (R11L, G148A, D183Y); la proteína transportadora de penicilina 1A (A615_D616insP); o el factor de alargamiento G FusA2 (G695A) (Anexo 5, Figura 112).

Se analizó en detalle el resistoma mutacional de la cepa XDR/DTR (G179), en la que se observaron diferentes mutaciones no sinónimas en comparación con las 9 cepas multiS y la modR restantes. Estas diferencias se detectaron en ocho de las 170 proteínas estudiadas: la porina OprD (nueve sustituciones y un codón de parada prematuro en la posición W277) implicada en la resistencia a los carbapenémicos (Figura 113A); DacB/PBP4 (delección de 12 aminoácidos, N454_L465del) implicada en la resistencia a β -lactámicos (Figura 113B); GyrB (S466F) relacionado con la resistencia a las quinolonas; CapD (T27S; S51G; T507A) involucrada en la biosíntesis del antígeno O y previamente relacionada con la resistencia a aminoglucósidos; los reguladores MexT (T157S) y MexS (D249N; G275S) de la bomba de expulsión MexEF-OprN; RpoC (E386K), una cadena β de RNA polimerasa dirigida por DNA, y RpoN (inserción de 4 aminoácidos, I180insSLEE), el factor sigma-54 de RNA polimerasa que regula muchos genes de virulencia y está relacionado con la resistencia a los antibióticos (Anexo 5).

Se estudiaron mediante simulación con RasMol-RasWin las diferencias detectadas en la porina OprD y la delección de 12 aminoácidos, N454_L465del, detectada en DacB/PBP4 de la cepa XDR/DTR (G179). En la proteína DacB se observó la pérdida de un fragmento alfa hélice que podría dar lugar a una proteína no funcional (Figura 113).

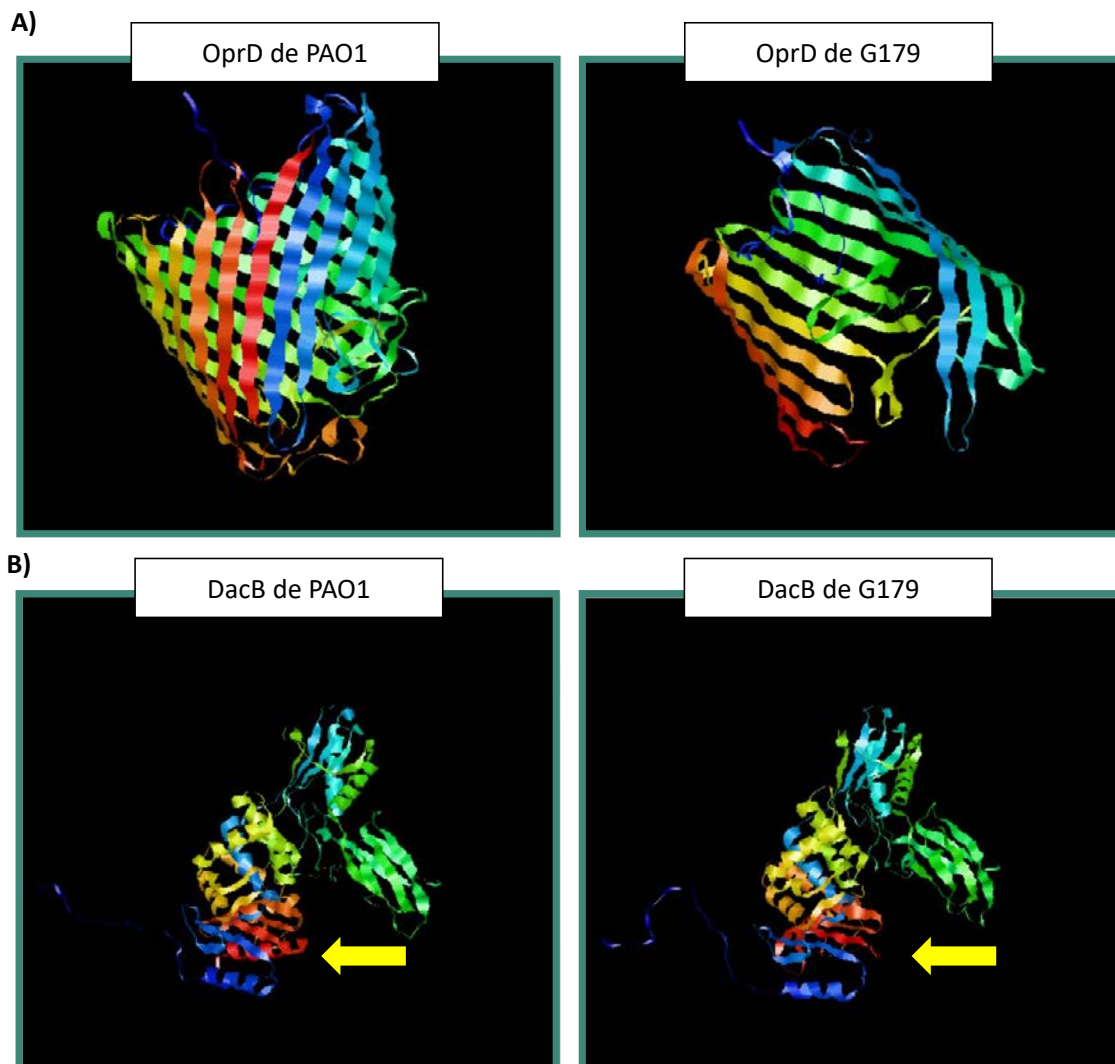


Figura 113: Visualización de las predicciones de estructuras proteicas de OprD (A) y DacB/PBP4 (B) de las cepas PAO1 y G179. La flecha amarilla en las imágenes de DacB indica la pérdida de un motivo de hélice alfa debido a la pérdida de 12 aminoácidos (N454_L465del) detectada en la cepa XDR/DTR, G179.

Además, se detectaron los mismos cambios aminoacídicos en 16 proteínas en la cepa XDR/DTR y las dos cepas estrechamente relacionadas por PFGE con ella (G105 y G115) (Figura 112), con excepción de los cambios en MexE, MltB1, MexW, AmpG, PA2489 y PA4069 que también se detectaron en la cepa G178 y los genomas de referencia env193, AZPAE14971 y AUS603.

Por otro lado, la cepa G245 con *lasR*-truncado mostró cambios únicos en NuoG (T484A, S527N) y OprM (T173fs) en comparación con el resto de cepas ST274. La modificación de la OprM fue analizada mediante simulación con RasMol-RasWin (Figura 114) donde se puede apreciar la pérdida real de la masa proteica.

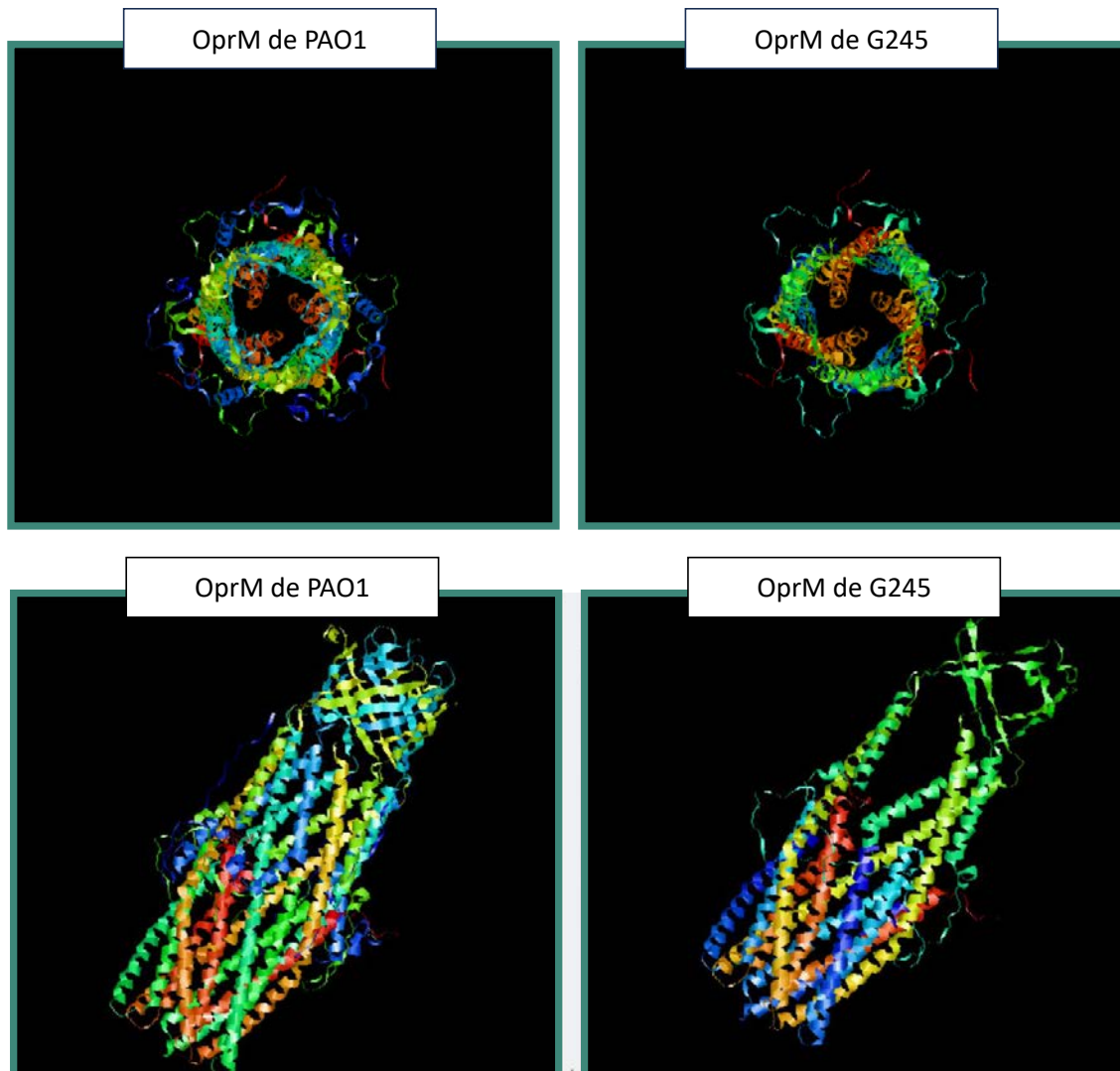


Figura 114: Visualización de las predicciones de las estructuras proteicas de OprM de G245 respecto a PAO1. En la parte superior, una visión transversal en la que se pueden apreciar la falta de las hélices representadas en azul y en la parte inferior se observa la pérdida de la masa proteica.

Se estudió también la presencia de mutaciones en 15 genes relacionados con el fenotipo hipermutador, o panel de mutatóma, en los que se detectó el tipo salvaje de los genes *mutS* y *mutL* en las 25 cepas *P. aeruginosa* del clon ST274 estudiadas. No obstante, se detectaron los cambios D61N en la proteína MutY en 19 cepas (76% del total), E236D en MutT en 18 cepas (72%) y D876E en PolA en todas las cepas analizadas, excepto la cepa VET-37 (96%). Además, las tres cepas clonalmente relacionadas (G179, G110 y G115) presentaban, la variación R48H para la proteína Pfpl (Tabla 38).

Tabla 38: Detección de alteraciones en los genes implicados en el fenotipo hipermutador de las 11 *P. aeruginosa* ST274 y las 14 cepas ST274 de la base de datos, con respecto al genoma PAO1.

Cepas	Genes implicados en el fenotipo mutador (Locus tag)														
	<i>pfpl</i>	<i>mutY</i>	<i>ung</i>	<i>dnaQ</i>	<i>mfd</i>	<i>mutS</i>	<i>sodB</i>	<i>mutT</i>	<i>sodM</i>	<i>rodA</i>	<i>mutL</i>	<i>mutM</i>	<i>oxyR</i>	<i>uvrD</i>	<i>polA</i>
	(PA0355)	(PA5147)	(PA0750)	(PA1816)	(PA3002)	(PA3620)	(PA4366)	(PA4400)	(PA4468)	(PA4609)	(PA4946)	(PA0357)	(PA5344)	(PA5443)	(PA5493)
G042	wt	D61N	wt	wt	wt	wt	wt	E236D	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
G044	wt	D61N	wt	wt	wt	wt	wt	E236D	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
G073	wt	D61N; R286H	wt	wt	wt	wt	wt	E236D	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
G092	wt	D61N	wt	wt	wt	wt	wt	E236D	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
G105	R48H	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
G115	R48H	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
G148	wt	D61N	wt	wt	wt	wt	wt	E236D	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
G178	wt	D61N	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	S662N; N666S	D876E
G179	R48H	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
G224	wt	D61N	wt	wt	wt	wt	wt	E236D	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
G245	wt	D61N	wt	wt	wt	wt	wt	E236D	L202R	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
AUS603	wt	wt	wt	wt	wt	wt	E25V	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
AZPAE14926	wt	D61N	wt	wt	wt	wt	wt	E236D	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
AZPAE12412	wt	D61N	wt	wt	wt	wt	wt	E236D	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
AZPAE14914	wt	D61N	wt	wt	wt	wt	wt	E236D	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
AZPAE14971	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
AZPAE15033	wt	D61N	wt	wt	wt	wt	wt	E236D	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
AZPAE15040	wt	D61N	wt	wt	wt	wt	wt	E236D	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
Env_138	wt	D61N	wt	wt	wt	wt	wt	E236D	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
Env_193	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
FQSE100106	wt	D61N	wt	wt	wt	wt	wt	E236D	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
JYH21	wt	D61N	wt	wt	wt	wt	wt	E236D	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
Pae_CF67.011	wt	D61N	wt	wt	wt	wt	wt	E236D	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
UY1PSABAL2	wt	D61N	wt	wt	wt	wt	wt	E236D	wt	wt	wt	wt	wt	wt	D876E
VET-37	wt	D61N	wt	wt	wt	wt	wt	E236D	L202R	wt	wt	wt	wt	wt	A411S

3.2.3 Detección de genes de virulencia y quorum sensing.

El serotipo O:3 se detectó in-silico con PAST 1,0 en todas las 25 cepas de *P. aeruginosa* pertenecientes al clon ST274 incluidas en este estudio, 11 cepas de nuestra colección y 14 de la base de datos.

Se analizó la presencia/ausencia y la homología (viruloma mutacional) de un total de 247 genes de virulencia de PAO1, así como los genes *exoU* de PA14 y *exlA* y *exlB* de PA7. Las secuencias de todos estos 250 genes se obtuvieron de la base de datos VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi; setB>) (Anexo 2).

Los resultados obtenidos para las cepas de nuestra colección se muestran en la Figura 115. El anillo de homología frente a los genes estudiados mostró, en general, un alta paralelismo entre las 11 cepas de nuestro estudio.

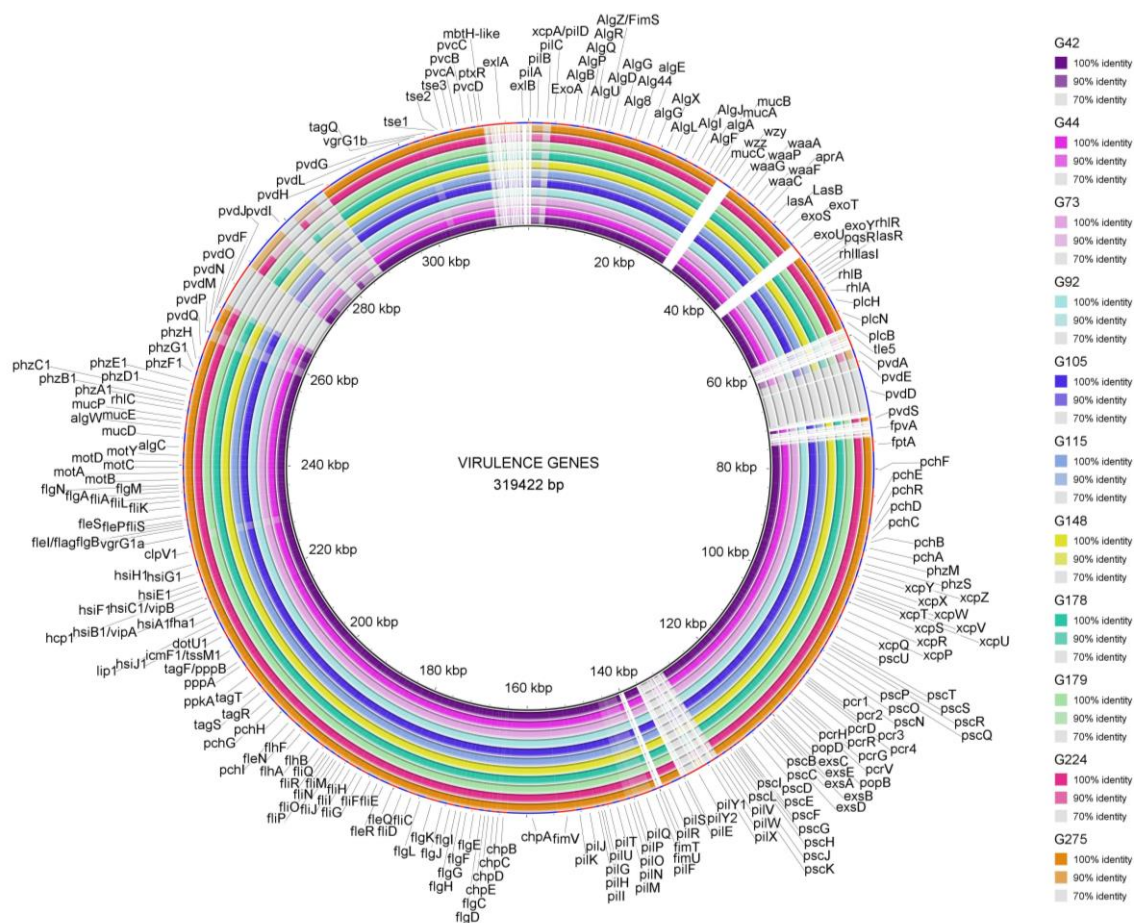


Figura 115: Anillo de homología de los 250 genes de virulencia estudiados en las 11 cepas de *P. aeruginosa* ST274 de nuestra colección. Como referencia se utilizó el genoma de *P. aeruginosa* PAO1, excepto para el gen *exoU* de la cepa control PA14 y los genes *exlA* y *exlB* de la cepa PA7.

El viruloma mutacional se analizó en las 11 cepas de nuestro estudio y las 14 de referencia ST274. Los resultados se muestran en el Anexo 6.

No se observaron cambios en 91 de los 250 (36,4%) genes analizados. Por otro lado, las 25 cepas ST274 compartían las siguientes características: 16 genes ausentes (*pilA*, *pilE*, *pilV*, *pilW*, *pilX*, *pilY1*, *pilY2*, *fimT*, *fimU*, *pldA/tleS*, *fpvA*, *wzz*, *wzy*, *exlA*, *exlB*, *exoU*) y 13 genes, en su mayoría implicados en la biosíntesis de pioverdina y pili tipo IV (*pvdL*, *pvdE*, *pvdD*, *pvdJ*, *pvdI*, *pvdF*, *pvdM*, *pvdP*, *pvdA*, *pchl*, *pilP*, *pilN*, *pilC*), mostraron más de 10 cambios aminoacídicos iguales.

Se detectaron los mismos patrones mutacionales en 68 proteínas (27%) en todas las cepas ST274 analizadas, independientemente de sus orígenes clínicos/no clínicos o geográficos. Por otro lado, PscP (proteína de translocación en el sistema de secreción tipo III) y LasR (regulador de detección de quórum sensing) mostraron el mayor número de patrones diferentes (10 y 9, respectivamente) entre las 25 cepas ST274 analizadas. Además, se detectaron codones de parada prematuros, deleciones o inserciones en 6 genes (*pilC*, *pchF*, *pvdM*, *pcrH*, *pscK*, *toxA*) en todas las cepas estudiadas. Destacan los resultados observados en ToxA, precursor de la exotoxina A, donde se encontraron dos patrones mutacionales que incluyen deleciones: i) T4I, F22S, G386_A388del, I432V, D500A, detectado en las cepas G105, G115, G179 y G178 y las cepas de referencia env193, AZ-PAE14971 y AUS603, y ii) T4I, F22S, A58_T62del, I432V observadas en las 18 cepas ST274 restantes.

La cepa XDR/DTR (G179) mostró cambios únicos en PilN (V30L, A31V, A33G, D40G, F43L, T44N, A45T, N49H, N51G, K75R) y un codón de parada prematuro en la posición Q80) y en RhlR (Y72C), y compartió los mismos cambios aminoacídicos en 23 genes sólo con las cepas de *P. aeruginosa* G105, G115, G178, env193, AZPAE14971 y AUS603.

La cepa G245 con *lasR*-truncado tenía patrones únicos en las proteínas FleQ, PchH, PchE (D6fs) y PvdS. Por otro lado, la cepa G044 modR sólo mostró el cambio de aminoácido C79I en LasR, que no se detectó en el resto de las cepas analizadas.

Los 40 genes relacionados con el sistema de secreción tipo III (T3SS) y sus efectores de traslocación se detectaron en todas las cepas ST274 estudiadas, con

excepción del gen *exoU*. Los genes implicados en flagelos, fenazinas y producción de alginato estaban en su mayoría altamente conservados y eran homólogos entre todas las cepas ST274; sin embargo, los genes de biosíntesis del pili tipo IV (T4P), pioquelina y pioverdina fueron más variables.

Al analizar los 23 genes relacionados con la biosíntesis de T4P, 9 genes estaban ausentes (*pilA* y el grupo de genes *fimU/T/pilV/W/X/Y1/Y2/E*), y se observó al menos un cambio aminoacídico en 11 proteínas en todas las cepas ST274, mostrando un elevado polimorfismo en proteínas como PilC, PilN, PilO o PilP (de 8 a 50 modificaciones). La subunidad principal de T4P es una proteína codificada por el gen *pilA*. Este gen tiene cinco alelos pili que se encuentran en un locus cromosómico conservado entre los genes adyacentes *pilB* y *tRNA-Thr* (Horna *et al.*, 2019). Al analizar la región *pilB/tRNA-Thr* de todas las cepas ST274, mediante BLAST contra secuencias GenBank, se observó que *pilA* pertenecía al grupo V de T4P (*pilA_V*). Como los parámetros utilizados para comparar con los genes de PAO1 incluyeron >90% de similitud, no fue posible detectar todos esos genes en comparación con PAO1-*pilA* porque pertenece al grupo II de T4P (*pilA_{II}*) y la identidad frente a *pilA_V* es de sólo un 23% (Figura 116).

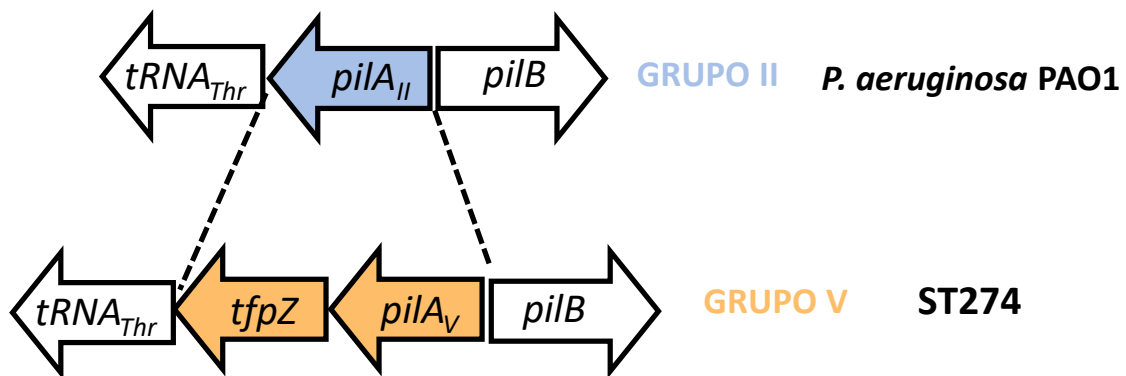


Figura 116: Esquema del locus cromosómico conservado entre los genes adyacentes *pilB* y *tRNA-Thr*.

Por otro lado, la biosíntesis de pioverdina en *P. aeruginosa* es un proceso complejo que involucra al menos 16 proteínas diferentes. En todas las cepas ST274, los genes *pvdA*, *pvdP*, *pvdD*, *pvdE*, *pvdJ* y *pvdI* eran genes muy divergentes en comparación con los de la cepa de referencia PAO1, y además el gen *fpvA* (receptor de ferripioverdina) estaba ausente. Para determinar que ocurría en esta región en las cepas del clon ST274 estudiadas, se comparó la región entre *treA* y *pvdQ* (genes adyacentes a la región

relacionada con la pioverdina) utilizando BLAST con los genomas de GenBank, y se detectó una identidad superior al 80% entre nuestras cepas ST274 y múltiples secuencias, incluida la referencia PAO1 (clase I), ATCC27853 (clase II) y ATCC BAA-2108 (clase III). La Figura 117 muestra la alineación de la región de pioverdina de una cepa ST274 en comparación con las cepas productoras de pioverdina de clase I, clase II y clase III, observándose que todas las cepas del clon ST274 presentaban un locus de pioverdina de clase II.

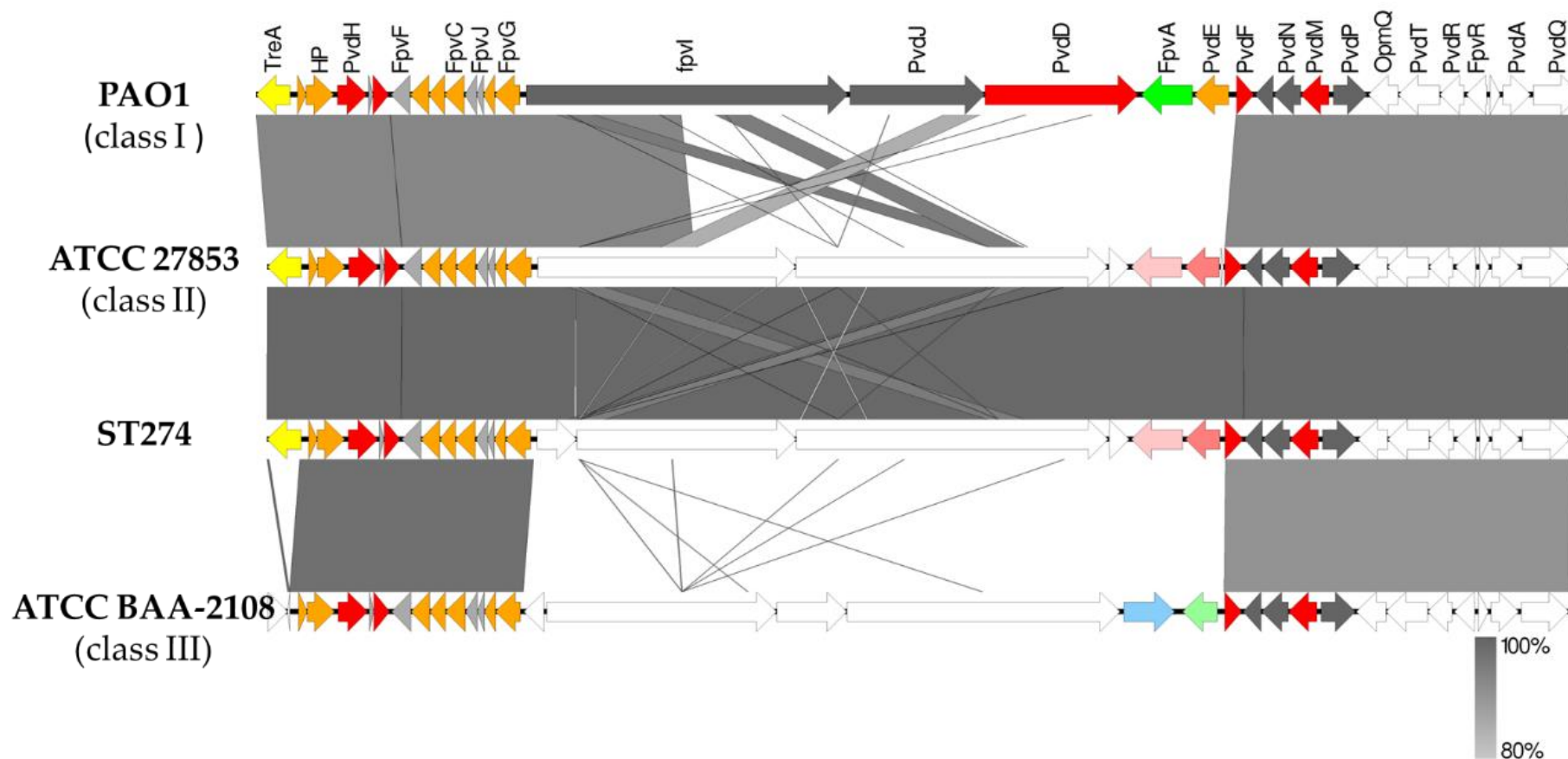


Figura 117: Representación esquemática de las diferencias encontradas en la región codificante de pioverdina entre las cepas *P. aeruginosa* PAO1 (clase I), ATCC27853 (clase II), ATCC BAA-2108 (clase III) y las cepas de *P. aeruginosa* ST274. Los colores representan la localización según la página web de *Pseudomonas* (www.pseudomonas.com): naranja: proteínas de la membrana citoplasmática, rojo: proteínas citoplasmáticas, verde: proteínas de la membrana externa y gris: proteínas de ubicación desconocida. Además, la flecha amarilla indica el gen *treA* (ausente en la clase III), el rosa claro representa otro receptor de hierro diferente a FpvA y el rosa oscuro representa un transportador ABC de exportación de péptidos cíclicos, las flechas azul y verde claro indican dos proteínas diferentes ubicadas en esa región en la pioverdina de clase III.

3.3 Sistema CRISPR-Cas

En las 11 cepas *P. aeruginosa* ST274 de este trabajo se estudió la presencia y la estructura de sistemas CRISPR-Cas. Todas las cepas albergaban dos estructuras CRISPR denominadas estructura A y B (Figura 118).

La estructura A tenía una región CRISPR formada por diez espaciadores iguales sin sistema Cas asociado. La estructura A de la cepa G224 mostró tres espaciadores adicionales diferentes al final de la estructura. Por otro lado, la estructura B contaba con un sistema CRISPR-Cas completo con Cas tipo IF (Cas1, Cas3-Cas2, Csy1, Csy2, Csy3, Cas6/Cys4), a excepción de la cepa G224 que carecía de este sistema Cas. Los espaciadores fueron muy variables en la estructura B, principalmente en las de las cepas clonales G105, G115 y G179 que albergaban 15 espaciadores completamente diferentes al resto de cepas (Figura 118).

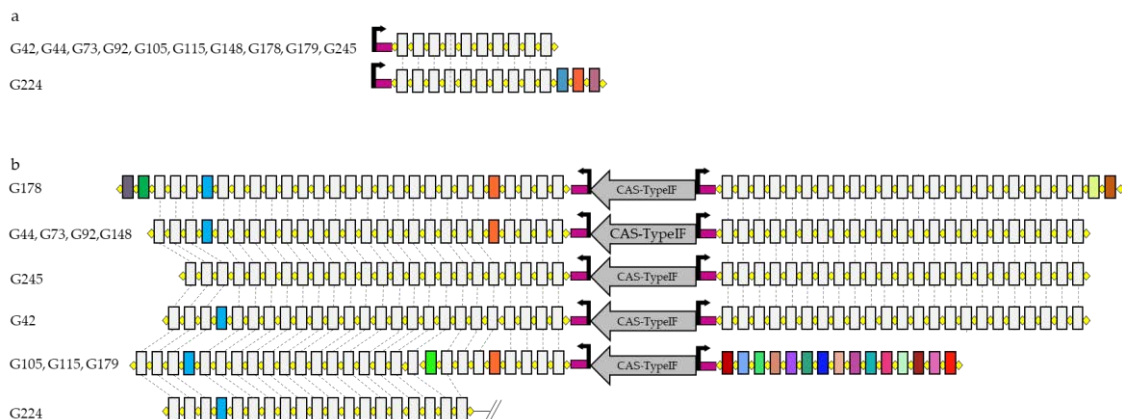


Figura 118: Estructura A de CRISPR (a) y estructura B (b) detectadas entre las 11 cepas *P. aeruginosa* ST274 de este trabajo. Las repeticiones están indicadas por rombos amarillos. Los rectángulos representan los diferentes espaciadores: los rectángulos blancos unidos por líneas grises son iguales entre ellos y los rectángulos de diferentes colores son completamente diferentes entre nuestras cepas. Los rectángulos horizontales morados representan la dirección del líder. El CAS-TypeIF incluye los siguientes casetes CAS: Cas1, Cas3-Cas2, Csy1, Csy2, Csy3, Cas6/Cys4.

4. Análisis comparativo de tres clones de alto riesgo

El problema epidemiológico de cepas de *P. aeruginosa* MDR/XDR/DTR se ve agravado por la diseminación epidémica a nivel mundial de cepas concretas, denominadas clones de alto riesgo (CAR) como ST175 y ST235, o por la persistencia de clones endémicos en ciertos hospitales, como el clon ST973 detectado en esta tesis en pacientes del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza.

Por ello, otro de los objetivos de esta tesis fue analizar y comparar las características biológicas y genómicas de las cepas de *P. aeruginosa* de los clones ST175, ST973 y ST235.

4.1 Cepas seleccionadas

Para este objetivo se seleccionaron todas las cepas ST175, ST235 y ST973 resistentes a imipenem de la colección de 275 cepas de *P. aeruginosa* utilizadas en esta tesis. En concreto, un total de 42 cepas, 25 cepas pertenecientes al ST235, 9 al ST175 y 8 al ST973 (Figura 119). Los datos de las cepas de estudio se muestran en la Tabla 38 y en el Anexo 7.

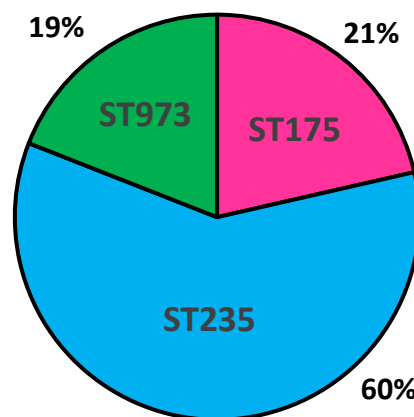


Figura 119: Representación porcentual del número de cepas incluidas en el estudio comparativo de clones de alto riesgo.

Tabla 39: Características de las 42 cepas incluidas en el análisis comparativo de los clones de alto riesgo.

Cepa	MLST	Origen	Hospital	Pulsotipo	Serotipo	Fenotipo de resistencia
G192*	ST175	Sangre	HUSP	P033	PolIA	FEP, IMP, MER, DOR, GEN, TOB, CIP
G202*	ST175	Respiratorio	HCULB	P034	O:4	IMP, MER, DOR, GEN, TOB, CIP
G226*	ST175	Respiratorio	HUSP	P032	O:4	IMP, MER, PTZ, ATM, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP
G233*	ST175	Respiratorio	HUSP	P030	PolIA	IMP, MER, PTZ, CAZ, FEP, GEN, TOB, CIP
G242*	ST175	Respiratorio	HUSP	P029	PolIA	IMP, MER, GEN, TOB, CIP
G251*	ST175	Respiratorio	HUSP	P026	PolIA	IMP, MER, AZT, GEN, TOB, AMK, CIP
G259*	ST175	Orina	HCULB	P031	O:4	IMP, MER, DOR, GEN, TOB, CIP
G266*	ST175	Orina	HUSP	P028	O:4	IMP, MER, DOR, GEN, TOB, CIP
G267*	ST175	Orina	HUSP	P027	O:4	IMP, MER, DOR, GEN, TOB, CIP
G193*	ST235	Respiratorio	HCULB	P018	O:9	IMP, MER, DOR, GEN, TOB, NET
G195*	ST235	Respiratorio	HCULB	P025	O:11	IMP, MER, DOR, FEP, GEN, NET
G197	ST235	Respiratorio	HCULB	P022	PolIA	IMP, MER, DOR, GEN, NET, CIP
G199*	ST235	Respiratorio	HCULB	P017	PolIA	IMP, MER, DOR, GEN, NET, CIP
G201*	ST235	Respiratorio	HCULB	P021	O:11	IMP, MER, DOR, PTZ, ATM, CAZ, FEP, GEN, NET, CIP
G203	ST235	Respiratorio	HCULB	P010	PolIA	IMP, MER, DOR, CAZ, FEP, GEN, TOB, AMK, NET, CIP
G204*	ST235	Respiratorio	HCULB	P011	O:11	IMP, MER, DOR, CAZ, FEP, GEN, TOB, NET, CIP
G206*	ST235	Respiratorio	HCULB	P012	AutoA	IMP, MER, DOR, GEN, TOB, NET, CIP
G207*	ST235	Respiratorio	HCULB	P008	O:11	IMP, MER, DOR, CAZ, FEP, GEN, TOB, NET, CIP
G208	ST235	Respiratorio	HCULB	P014	PolIA	IMP, MER, DOR, PTZ, ATM, CAZ, FEP, GEN, TOB, NET, CIP
G209*	ST235	Respiratorio	HCULB	P001	O:12	IMP, MER, DOR, GEN, TOB, NET, CIP
G210	ST235	Respiratorio	HCULB	P013	O:11	IMP, MER, DOR, GEN, TOB, NET, CIP
G211*	ST235	Respiratorio	HCULB	P004	O:11	IMP, DOR, GEN
G214*	ST235	Respiratorio	HCULB	P024	O:9	IMP, MER, DOR, GEN, TOB, NET, CIP
G215	ST235	Respiratorio	HCULB	P020	PolIA	IMP, MER, DOR, PTZ, CAZ, FEP
G216	ST235	Respiratorio	HCULB	P015	PolIA	IMP, MER, DOR, CIP
G218*	ST235	Respiratorio	HCULB	P019	AutoA	IMP, MER, DOR, GEN, TOB, CIP
G253*	ST235	Exudado herida	HCULB	P008	NA	IMP, MER, DOR, CAZ, FEP, CIP
G254*	ST235	Respiratorio	HCULB	P003	O:11	IMP, MER, DOR, PTZ, CAZ, FEP, GEN, CIP
G255*	ST235	Exudado herida	HCULB	P009	O:12	IMP, MER, GEN, CIP
G258*	ST235	Sangre	HCULB	P023	O:4	IMP, MER, DOR, PTZ, AZT, CAZ, GEN, TOB, CIP
G260*	ST235	Exudado herida	HCULB	P016	O:11	IMP, GEN, CIP
G263*	ST235	Respiratorio	HCULB	P006	PolIA	IMP, MER, AZT, GEN, TOB, CIP
G264*	ST235	Exudado herida	HCULB	P005	PolIA	IMP, MER, DOR, PTZ, AZT, CAZ, GEN, TOB, CIP
G268*	ST235	Orina	HUSP	P002	AutoA	IMP, MER, DOR, GEN, TOB, AMK, NET, CIP
G205*	ST973	Respiratorio	HCULB	P042	PolIA	IMP, MER, DOR, CAZ, FEP, GEN, TOB, NET, CIP
G212*	ST973	Respiratorio	HCULB	P040	AutoA	IMP, DOR, FEP, GEN, TOB, NET, CIP
G252*	ST973	Sangre	HCULB	P039	PolIA	IMP, MER, DOR, CAZ, FEP, GEN, TOB, AMK
G261*	ST973	Orina	HCULB	P036	PolIA	IMP, MER, DOR, GEN, TOB, AMK, CIP
G262*	ST973	Orina	HCULB	P038	AutoA	IMP, MER, DOR, PTZ, ATM, CAZ, GEN, TOB, AMK, CIP
G273*	ST973	Respiratorio	HCULB	P037	O:15	IMP, MER, DOR, FEP, GEN, TOB, NET, CIP
G274*	ST973	Orina	HUSP	P035	O:15	IMP, MER, DOR, GEN, TOB, NET, CIP
G275*	ST973	Absceso intraabdominal	HCULB	P041	O:15	IMP, MER, DOR, ATM, CAZ, FEP, PTZ, PIP, GEN, TOB, AMK, NET

^a: AutoA: autoaglutinante, NoA: no aglutinante; PolIA: poliaglutinante. * Cepas que se secuenciaron para los estudios de NGS.

Todas las cepas eran de origen clínico y en la Figura 120 podemos ver la distribución de los orígenes específicos de cada cepa en función del ST de cada una de ellas.

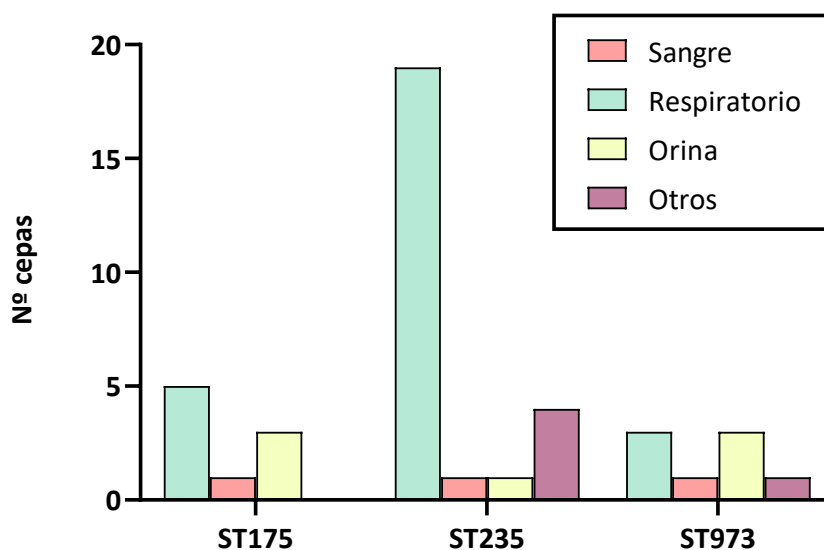


Figura 120: Origen específico de las cepas de *P. aeruginosa* incluidas.

4.2 Tipificación bacteriana

4.2.1 Serotipo

Los serotipos analizados mediante aglutinación mostraron una asociación de O:4 para ST175, O:11 para ST235 y O:15 para ST973 (Figura 121, Tabla 38), aunque mayoritariamente eran cepas no tipables (autoaglutinantes, no aglutinantes o poliaglutinantes) (Tabla 39). En el caso del ST235, además del serotipo O:11 y el no tipable, se obtuvieron en menor porcentaje otros serotipos como el O:9, O:4 u O:12.

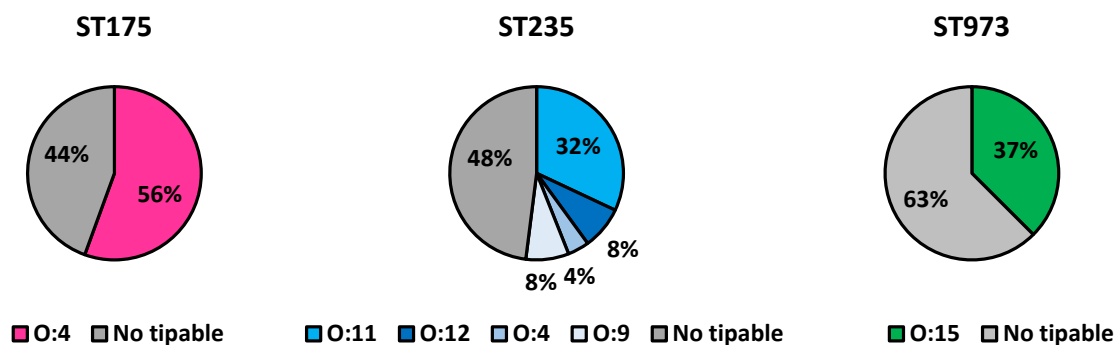


Figura 121: Distribución de serotipos obtenidos mediante aglutinación para cada uno de los ST estudiados. En gris se representan los serotipos no tipables (autoaglutinantes, no aglutinantes o poliaglutinantes).

Tabla 40. Serotipo no tipables encontrados en las distintas cepas de *P. aeruginosa* en función de los distintos STs. El % representado es en relación con el total de cepas de cada ST.

	Autoaglutinante	No aglutinante	Poliaglutinante
ST175	-	-	4 (44%)
ST235	3 (12%)	1 (4%)	8 (32%)
ST973	2 (25%)	-	3 (38%)

4.2.2 Relación clonal

Las 42 cepas se agruparon en 42 pulsotipos diferentes (Tabla 38, Figura 122, Anexo 7). No se detectaron pulsotipos comunes entre los tres clones, ni clonalidad entre las cepas.

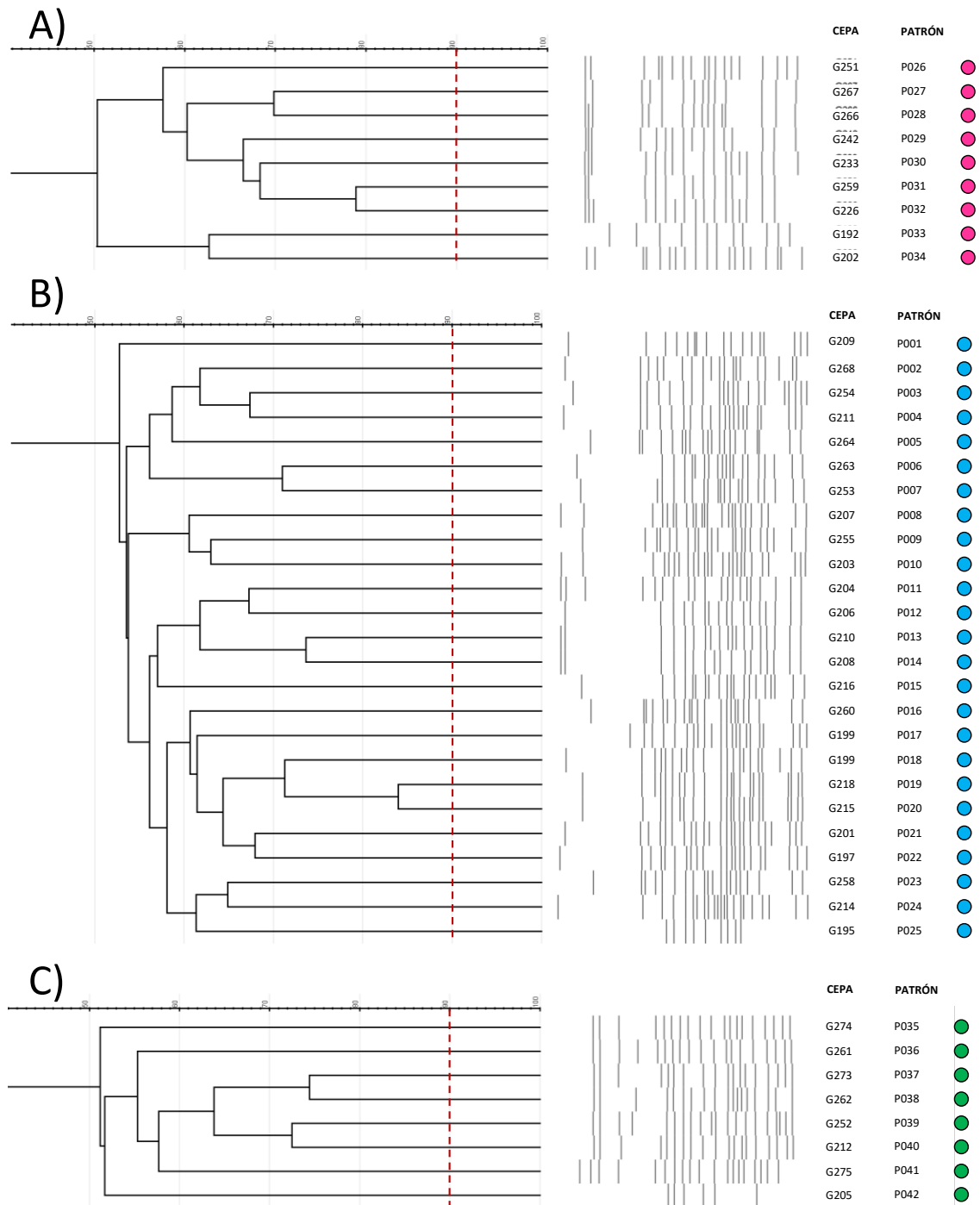


Figura 122: Dendrograma de patrones PFGE obtenido en las cepas *P. aeruginosa* pertenecientes al estudio de los clones de alto riesgo. El dendrograma se ha realizado con el programa gelJ. Se representan cada uno de los ST por colores A: ST175 (magenta, B) ST235 (azul) y C: ST973 (verde). La línea vertical roja indica una similitud del 90% a partir de la cual las cepas se consideran relacionadas clonalmente.

4.3 Fenotipo de resistencia a agentes antipseudomónicos.

Analizando el fenotipo de resistencia, todas las cepas pertenecientes al ST973 se clasificaron como MDR, incluyendo una que además era XDR (G262); entre las 25 cepas pertenecientes al ST235 encontramos 3 cepas modR, 18 MDR y 4 XDR (G201, G208, G258 y G264) y entre las 9 cepas del ST175 incluidas, se encontraron 8 MDR y 1 XDR (G226) (Figura 123, Tabla 38, Anexo 7).

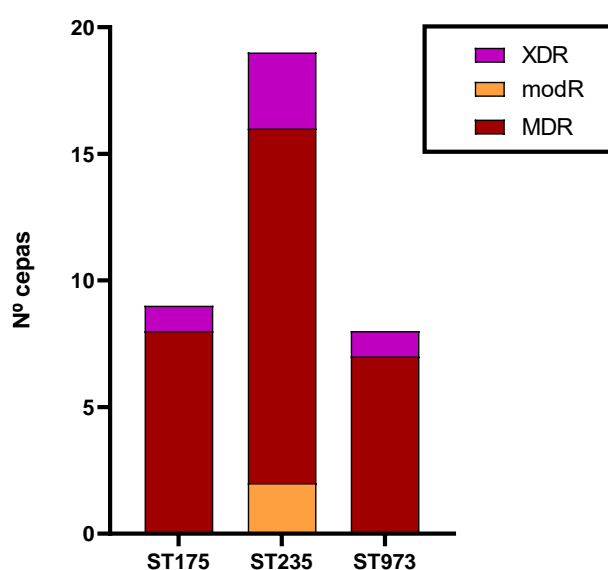


Figura 123: Patrones de resistencia encontrados en las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas pertenecientes a los clones ST175, ST235 y ST973.

El fenotipo de resistencia más común entre todas las cepas analizadas asociaba los carbapenémicos imipenem, meropenem o doripenem con los aminoglucósidos gentamicina y/o tobramicina (93% de las cepas) (Figura 124). Todas las cepas del ST175, el 84% de las cepas del ST235 y el 75% de las ST973 fueron resistentes a ciprofloxacina (Figura 124). Todas las cepas ST973 fueron resistentes a amikacina y/o netilmicina; mientras que todas las cepas ST175 fueron sensibles a ambos antibióticos.

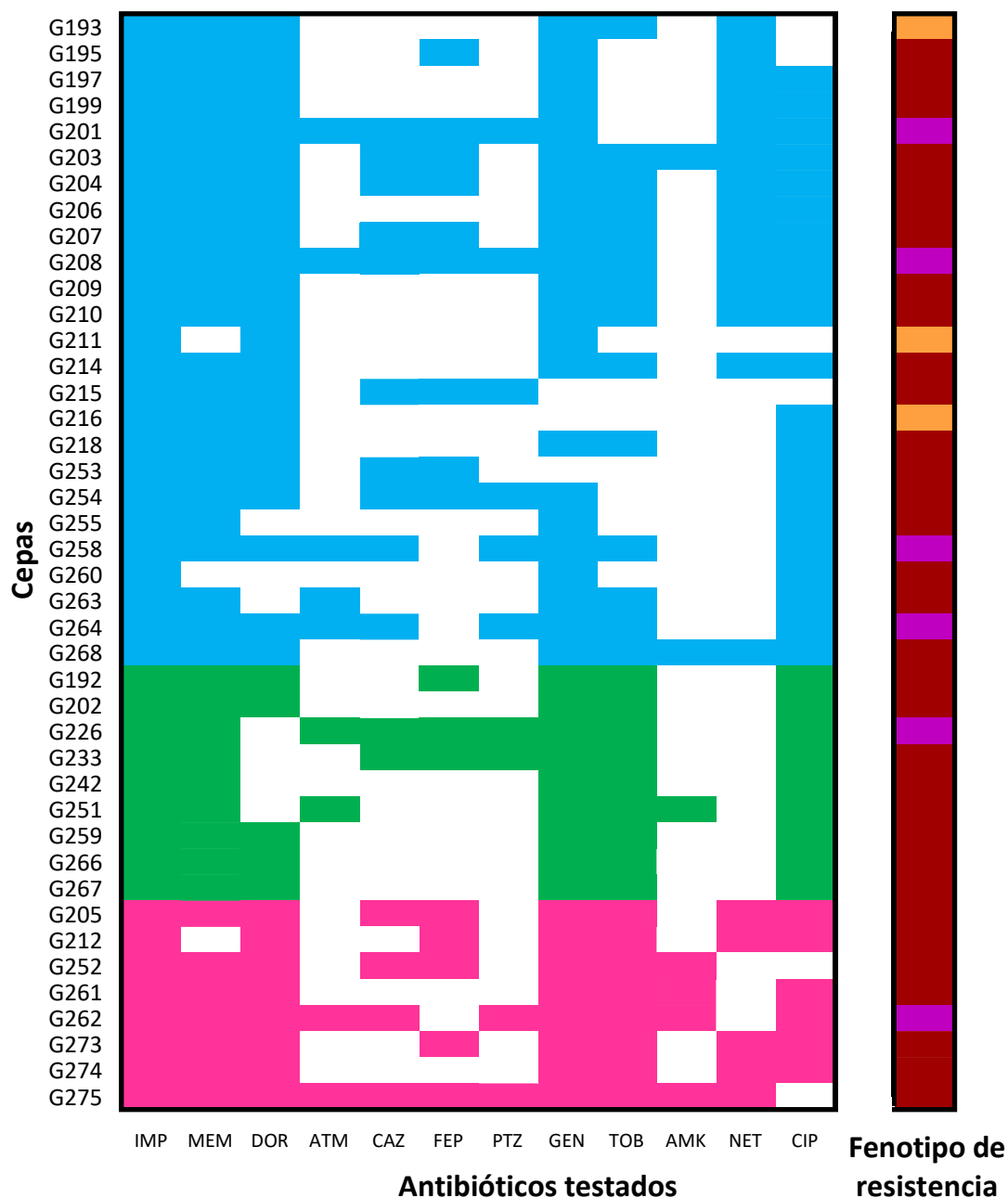


Figura 124: Heatmap resumen del fenotipo de resistencia detectado en las cepas de *P. aeruginosa* del ST175, ST235 y ST973. A la derecha se muestra el fenotipo de resistencia asociado a cada cepa. Antibióticos testados: IMP, imipenem; MEM, meropenem; DOR, doripenem; ATM: aztreonam; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepima; PTZ, piperacilina-tazobactam; GEN, gentamicina; TOB, tobramicina; AMK, amikacina; NET, netilmicina; CIP, ciprofloxacina. Se representan cada uno de los ST por colores (azul ST235, magenta ST175 y verde ST973) indicando resistencia cuando el cuadro aparece coloreado y sensibilidad si aparece en blanco. Naranja: ModR, rojizo: MDR, morado: XDR.

4.4 Virulotipos

Las 9 cepas del clon ST175 y las 8 del clon ST973 pertenecían al virulotipo V5 y V6, respectivamente (Tabla 41, Anexo 7). En ambos virulotipos se amplifican los genes *exoS*, *exoY*, *exoT*, *exoA*, *lasA*, *lasB*, *aprA* y *lasI*. Sin embargo, los genes *rhlAB*, *rhlI* y *rhlR* no se amplifican en el virulotipo V5 (ST175) y el gen *lasR* está ausente en el virulotipo V6 (ST973).

Por otra parte, las 25 cepas del clon ST235 pertenecían al virulotipo V8 (*exoU*, *exoY*, *exoT*, *exoA*, *lasA*, *lasB*, *aprA*, *rhlAB*, *rhlI*, *rhlR*, *lasI*, *lasR*), salvo dos cepas que no amplificaron el gen *exoY* (virulotipo V10) (Tabla 41).

Tabla 41: Virulotipo detectado en cada uno de los ST analizados.

	<i>exoU</i>	<i>exoS</i>	<i>exoY</i>	<i>exoT</i>	<i>exoA</i>	<i>lasA</i>	<i>lasB</i>	<i>aprA</i>	<i>rhlAB</i>	<i>rhlI</i>	<i>rhlR</i>	<i>lasI</i>	<i>lasR</i>	Nº cepas	Virulotipo
ST175	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	9	V5
ST235	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	23	V8
	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2	V10
ST973	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	8	V6

4.5 Parámetros biológicos

Las Figuras 125-128 muestran la producción de biofilm (biomasa total de biofilm (CV) y la actividad metabólica dentro del biofilm (FDA)), la producción de pigmentos (piocianina, piorrubina y pioverdina), la actividad elastasa y la motilidad (swimming y swarming) de las 42 cepas pertenecientes a los CAR ST175, ST235 y ST973 (Anexo 7).

Los resultados obtenidos quedan resumidos en la Tabla 42, destacando que, en promedio, todas las cepas CAR se caracterizaban por una producción media/baja de biofilm y piorrubina, una producción baja de elastasa, pioverdina y piocianina, además de una motilidad baja en swimming e inmóviles en swarming.

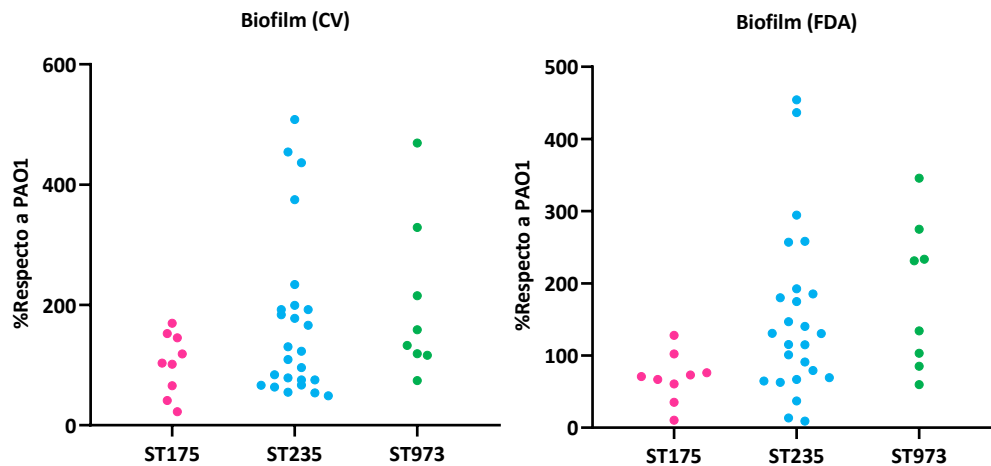


Figura 125: Resultados obtenidos en la producción de biofilm entre las cepas de los diferentes clones de alto riesgo analizados.

La producción de piocianina, pioverdina y piorrubina fue mayor en las cepas del ST175 que en el resto de clones, pero en ninguno de los casos los resultados fueron estadísticamente significativos (Figura 126).

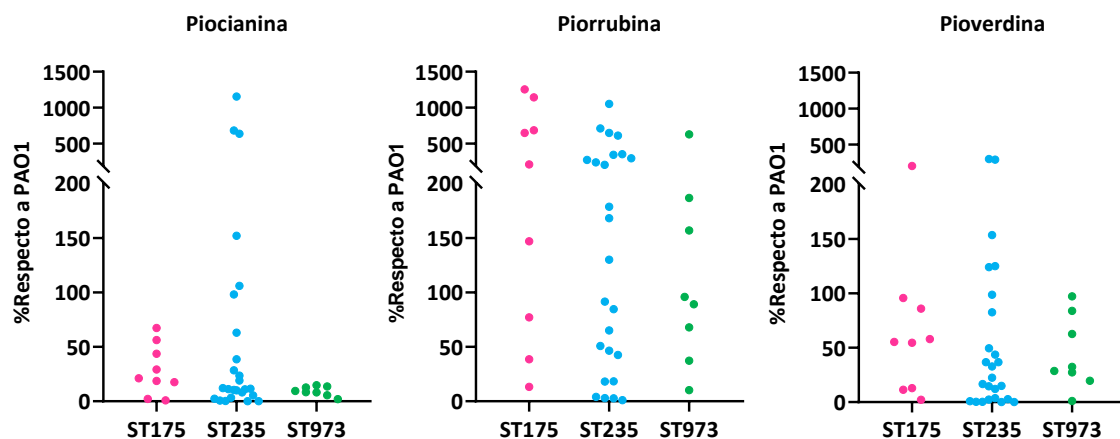


Figura 126: Resultados obtenidos en la producción de pigmentos entre las cepas de los diferentes clones de alto riesgo analizados.

Analizando la producción de elastasa, no se observaron diferencias significativas, aunque se puede apreciar en la Figura 127 una producción más baja en los aislados del ST973 que en el resto de los clones.

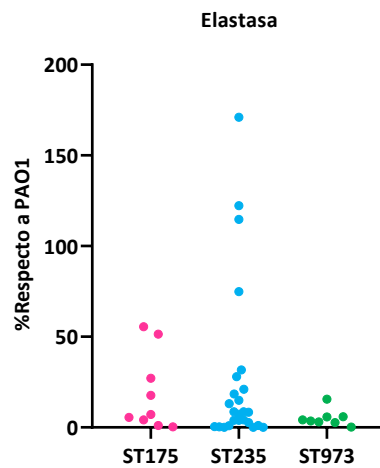


Figura 127: Resultados obtenidos en la producción de elastasa entre las cepas de los diferentes clones de alto riesgo analizados.

Finalmente, analizando la motilidad entre las cepas pertenecientes a los clones de alto riesgo observamos en general una motilidad muy baja. La cepa más motil fue G207 del ST235, con una dispersión de 1.930,63 mm² y 5.181,65 mm² para swimming y swarming, respectivamente (Figura 128).

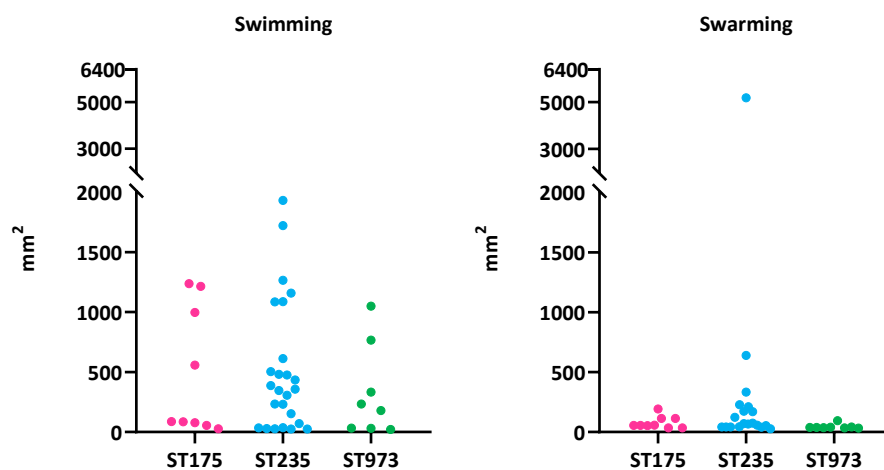


Figura 128: Resultados obtenidos en la motilidad bacteriana, swimming y swarming, entre las cepas de los diferentes clones de alto riesgo analizados.

Tabla 42: Resumen de las características principales encontradas en las 42 cepas resistentes a imipenem de los clones ST175, ST235 y ST973.

MLST (nº)	Fenotipo de resistencia (nº) ^a	Serotipo (nº)	Virulotipo (nº)	CV50 ^a	FDA50 ^a	ELA50 ^a	PCIA50 ^a	PRUB50 ^a	PVD50 ^e	SWI50 ^a	SWAR50 ^a
ST175 (9)	MDR (8) XDR (1)	No tipable (4) O:4 (5)	V5	103,3	70,9	7,2	21,2	210,7	55,4	86,9	55,7
ST235 (25)	ModR (3) MDR (18) XDR (4)	No tipable (12) O:11 (8) O:9 (2) O:12 (2) O:4 (1)	V8 (23) V10 (2)	122,9	130,8	8,4	11,5	130,1	22,36	358,1	57,2
ST973 (8)	MDR (7) XDR (1)	No tipable (5) O:15 (3)	V6	158,7	231,2	4,14	9,4	95,8	32,4	233,7	38,8

*nº: nº de cepas. ^a Porcentaje de producción observado en el 50% de las cepas de cada CAR.

4.6 Propiedades del genoma de *P. aeruginosa* ST175, ST235 y ST973

Se secuenciaron completamente mediante NGS (Illumina, HiSeq 1500) los genomas de 20 de las 42 cepas pertenecientes a los CAR (5 del ST175, 7 del ST235 y 8 del ST973) (marcadas con asterisco en la Tabla 39).

Los principales datos de secuenciación y ensamblaje de estas cepas están recogidos en la Tabla 43.

Tabla 43. Parámetros de secuenciación y ensamblaje de las cepas de *P. aeruginosa* analizadas en este estudio

Cepa	Parámetros de ensamblaje							
	Nº contigs	N50 (pb)	Tamaño del genoma (pb)	Contenido GC (%)	CDS	rRNA	tRNA	
ST175	G192	113	336.073	7.379.869	65,55	7.244	2	62
	G226	108	472.990	6.933.434	66,06	6.725	4	63
	G251	144	281.512	7.033.498	65,99	6.844	4	62
	G266	106	322.480	7.372.078	65,56	7.236	2	62
	G267	113	548.239	7.388.774	65,56	7.239	6	60
ST235	G201	123	270.053	6.902.999	66,03	6.711	3	63
	G204	133	287.257	6.839.729	65,93	6.750	3	63
	G254	231	170.904	6.978.397	65,93	6.926	3	63
	G255	179	270.750	6.869.904	66,04	6.670	3	64
	G260	131	260.452	6.927.527	66,02	6.773	3	64
	G264	200	175.599	6.716.309	66,06	6.600	3	60
	G268	136	235.407	7.036.845	65,96	6.787	4	59
ST973	G205	131	176.564	6.649.973	65,92	6.322	3	59
	G212	140	202.935	6.883.208	65,93	6.552	3	59
	G252	167	185.990	6.916.983	65,93	6.600	3	56
	G261	167	185.990	6.916.983	65,93	6.600	3	56
	G262	134	186.300	6.634.697	65,88	6.346	3	59
	G273	139	185.694	6.631.321	65,96	6.371	3	59
	G274	142	202.935	6.874.523	65,94	6.553	3	59
	G275	175	160.202	6.783.471	66,02	6.470	3	58

4.6.1 Relación filogenética

Para estudiar la relación filogenética (inter e intra-CAR) se incluyeron los genomas de las 20 cepas y el genoma completo de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 descargada de "<http://www.pseudomonas.com> (fecha de descarga 09/02/2021).

En el árbol obtenido mediante CSI Phylogeny Versión 1.4 que infiere una filogenia basada en la alineación concatenada de los SNP de alta calidad (Figura 129), puede observarse que las cepas del ST973 están más cercanas filogenéticamente al clon ST175, mientras que las cepas pertenecientes al clon ST235 aparecen en otra rama, y por tanto más alejadas filogenéticamente.

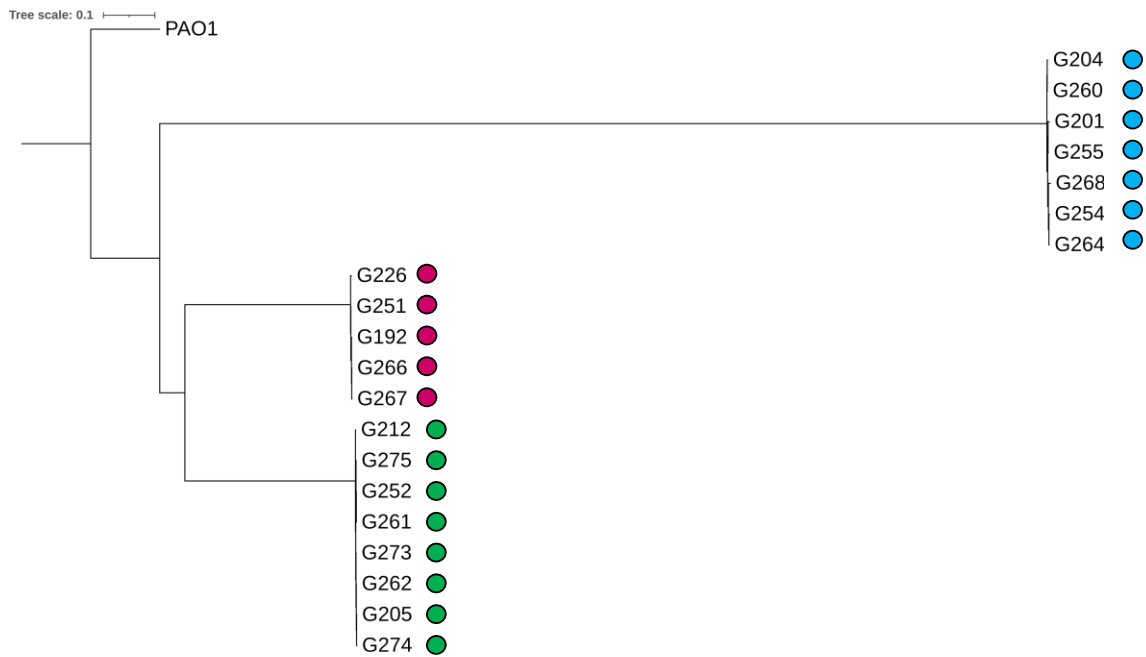


Figura 129: Árbol filogenético que muestra la relación entre las cepas *P. aeruginosa* de los tres clones de alto riesgo en relación con la cepa de referencia PAO1. Los colores representan el ST al que pertenece cada cepa: verde: ST973, magenta ST175 y azul ST235. Realizado con CSIPhylogeny v1.4.

4.6.2 Serotipo mediante NGS

Se analizaron los serotipos de todas las cepas también *in silico*, con la herramienta PAST 1.0. Todas las cepas pertenecientes al ST175 fueron serotipo O:4 y todas las pertenecientes al ST235 fueron O:11.

En el caso de las cepas del ST973, la herramienta PAST arrojó un resultado de O:11, pero con una cobertura de únicamente el 21%. Por aglutinación se detectaron los serotipos O:15 o no tipable en las cepas ST973; por lo que se revisó y se comprobó que la herramienta de predicción PAST utilizada, no tiene incorporado el serotipo O:15 en su base de datos porque no se encuentra codificado por los genes OSA.

Analizando en detalle las secuencias pertenecientes al ST973 y la secuencia definida como O:15 por Huszczyński (2020), encontramos un 99,95% de homología en las secuencias que definen al O:15 (desde *galE* hasta *orf12*) que se encuentra localizado entre los nucleótidos 2.366 y 18.041 del genoma de la cepa *P. aeruginosa* ATCC 33362 (GenBank NZ_LJZI01000136.1) (Figura 130).

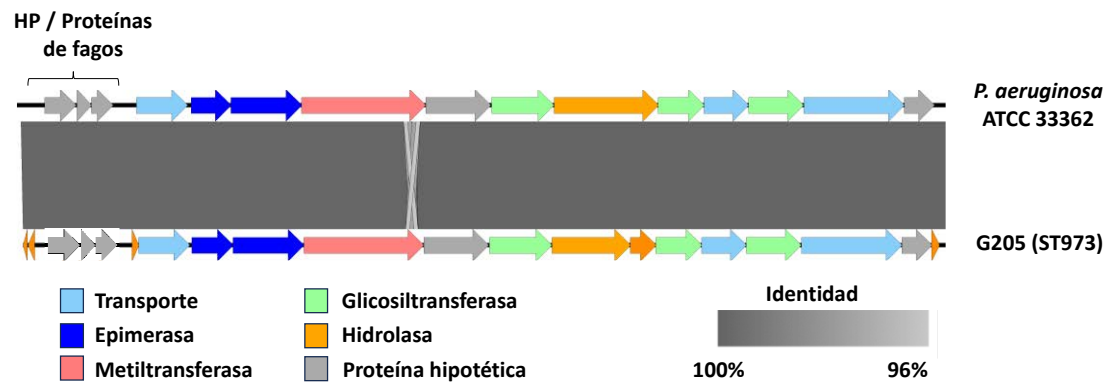


Figura 130: Apilamiento de la secuencia definida como O:15 por Huszczyński *et al.*, 2020 y la secuencia de una de las cepas *P. aeruginosa* ST973 (G205). La región definida va desde *galE* hasta *orf12* localizándose entre los nucleótidos 2.366 y 18.041 (GenBank acc. number: NZ_LJZI01000136.1).

4.6.3 Resistoma

Se analizó la presencia de genes de resistencia adquiridos y el resistoma mutacional de 24 genes cromosómicos en las 20 cepas CAR. Los resultados se resumen en las Tablas 44 y 45 y todos los datos obtenidos en el Anexo 8.

Todas las cepas pertenecientes al ST175 contenían los genes de resistencia a β -lactámicos *bla*_{PDC-1} y *bla*_{OXA-50}, *aphA-IIb*, *aadB*, *qacE Δ 1*, *sul1catB7*, *crpP-2* y *fosA*. La cepa G251 además presentaba los genes *bla*_{VIM-20}, *bla*_{OXA-2} y las cepas G266 y G267 el gen *bla*_{VIM-2}.

Las cepas del ST235 resultaron las más diversas en cuanto a genes adquiridos, aunque en todas ellas se encontraron *bla*_{PDC-35} y *bla*_{OXA-488}, *aphA-IIb*, *fosA1*, *catB7*, *qacE Δ 1*, y *sul1*. Además, algunas de ellas contenían genes como *bla*_{GES-5}, *aaC1a*, *aacA4*, *aadA1b* o *aphA15*, entre otros. Cabe además destacar, que el gen *crpP-1* se encontraba en todas, excepto en una de las cepas de este ST235 (G268), cepa que, además, poseía el gen *bla*_{GES-5}.

Todas las cepas pertenecientes al ST973 poseían los genes de resistencia a β -lactámicos *bla*_{VIM-2}, *bla*_{PDC-5} y *bla*_{OXA-50}; genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos, como son *aphA-IIb*, *aacA4* y *aadA1b*; el gen *crpP-4*, relacionado con la resistencia a quinolonas; así como los genes *qacE Δ 1*, *sul1*, *fosA* y *catB7*.

Tabla 44: Resistoma mediante NGS en todas las cepas del estudio.

	β -lactámicos				Aminoglucósidos			Otros genes			Fluoroquinolonas	
	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{PDC}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{GES}	<i>aphA</i>	<i>aacA/aacC</i>	<i>aadA1/aadB/aadA6</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	<i>crpP</i>	
ST175	G192	-	PDC-1	OXA-50	-	<i>aphA-IIb</i>	-	<i>aadB</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	<i>crpP-2</i>
	G226	-	PDC-1	OXA-50	-	<i>aphA-IIb</i>	-	<i>aadB</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	<i>crpP-2</i>
	G251	VIM-20	PDC-1	OXA-2 y OXA-50	-	<i>aphA-IIb</i> y <i>aphA6</i>	-	<i>aadB</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	<i>crpP-2</i>
	G266	VIM-2	PDC-1	OXA-50	-	<i>aphA-IIb</i>	-	<i>aadB</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	<i>crpP-2</i>
	G267	VIM-2	PDC-1	OXA-50	-	<i>aphA-IIb</i>	-	<i>aadB</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	<i>crpP-2</i>
ST235	G201	-	PDC-35	OXA-488	-	<i>aphA-IIb</i>	<i>aacC1a</i>	<i>aadA1, aadA6</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	<i>crpP-1</i>
	G204	VIM-2	PDC-35	OXA-488	-	<i>aphA-IIb</i>	<i>aacA4', aacC1a</i>	<i>aadA1</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	<i>crpP-1</i>
	G254	VIM-2	PDC-35	OXA-488	-	<i>aphA-IIb</i>	<i>aacA4', aacC1a</i>	<i>aadA1</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	<i>crpP-1</i>
	G255	-	PDC-35	OXA-488	-	<i>aphA-IIb</i>	<i>aacC1a</i>	<i>aadA1, aadA6</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	<i>crpP-1</i>
	G260	-	PDC-35	OXA-488	-	<i>aphA-IIb</i>	<i>aacC1a</i>	<i>aadA1, aadA6</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	<i>crpP-1</i>
	G264	VIM-2	PDC-35	OXA-488	-	<i>aphA-IIb</i>	<i>aacA4', aacC1a</i>	<i>aadA1b</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	<i>crpP-1</i>
	G268	-	PDC-35	OXA-488	GES-5	<i>aphA-IIb</i> y <i>aphA15</i>	<i>aacA4</i>	<i>aadA6</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	-
ST973	G205	VIM-2	PDC-5	OXA-50	-	<i>aphA-IIb</i>	<i>aacA4</i>	<i>aadA1b</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	<i>crpP-4</i>
	G212	VIM-2	PDC-5	OXA-50	-	<i>aphA-IIb</i>	<i>aacA4</i>	<i>aadA1b</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	<i>crpP-4</i>
	G252	VIM-2	PDC-5	OXA-50	-	<i>aphA-IIb</i>	<i>aacA4</i>	<i>aadA1b</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	<i>crpP-4</i>
	G261	VIM-2	PDC-5	OXA-50	-	<i>aphA-IIb</i>	<i>aacA4</i>	<i>aadA1b</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	<i>crpP-4</i>
	G262	VIM-2	PDC-5	OXA-50	-	<i>aphA-IIb</i>	<i>aacA4</i>	<i>aadA1b</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	<i>crpP-4</i>
	G273	VIM-2	PDC-5	OXA-50	-	<i>aphA-IIb</i>	<i>aacA4</i>	<i>aadA1b</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	<i>crpP-4</i>
	G274	VIM-2	PDC-5	OXA-50	-	<i>aphA-IIb</i>	<i>aacA4</i>	<i>aadA1b</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	<i>crpP-4</i>
	G275	VIM-2	PDC-5	OXA-50	-	<i>aphA-IIb</i>	<i>aacA4</i>	<i>aadA1b</i>	<i>qacEΔ1+sul1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB7</i>	<i>crpP-4</i>

Se determinó el resistoma mutacional analizando los cambios aminoacídicos en 24 proteínas implicadas en las dianas de fluoroquinolonas, carbapenémicos; así como relacionadas con la expresión de bombas de expulsión activas (GyrA, ParC, GyrB, ParE, OprD, MexA, MexB, OprM, MexR, NalC, NalD, MexC, MexD, OprJ, NfxB, MexE, MexF, OprN, MexS, MexT, MvaT, MexX, MexY y MexZ) (Tabla 44 y 45).

Todas la 20 cepas CAR analizadas presentaron el mismo patrón de cambios aminoacídicos en las proteínas GyrB (wt), MexA (wt), OprM (wt), NfxB (wt), MexF (wt), MexS (D249N), MexT (wt) comparada con PA14 y MvaT (wt). Mientras que en el resto de las proteínas se observaron diferencias entre las cepas de cada CAR (Anexo 8). Todas las cepas, excepto cinco (Patrones 1 y 4 de OprD), mostraron inserciones, deleciones y codones de finalización prematuros en OprD que afectan la funcionalidad de dicha porina (Tabla 44).

Hay que destacar que todas las cepas del ST175 mostraron los mismos cambios aminoacídicos en: GyrA (T83I, D87N), ParC (S87W, L168Q), NalC (G71E, A186T), MexC (E26A, H310R, S330A, P383S), MexD (E317Q, S845A), OprJ (M69V), MexX (K329Q; W358R), MexY (T543) y MexZ (G195E); mientras que se detectó el genotipo wt en el resto de las proteínas analizadas, salvo MexB de G226 (V203STOP). Por otra parte, todas las cepas ST235 mostraron los mismos cambios aminoacídicos en GyrA (T83I), ParC (S87L), ParE (D533E), MexB (G957D, S1041E, V1042A), MexR (V126E), NalC (G71E, Q153E, S209R), MexC (A31V, R76Q, H310R, S330A, P383S), MexD (S845A, I982V), OprJ (M69V, Q267R), MexE (E2V, S8F, Q368R), OprN (S13P), MexX (A30T, K329Q, L331V, W358R), MexY (T543A) y se observó la mutación L127Fs en MexZ en todas las cepas del ST235, a excepción de G268 que presentaba G98Fs. Las cepas ST973 presentaron los mismos cambios aminoacídicos en ParE (A473V), MexB, OprJ y MexE (wt), MexR (V126E), NalC (G71E, S209R), MexC (R76Q, G182S, H310R, S330A, P383S), MexD (E257Q, S845A), OprN (R83S, K117T), MexX (K329Q; L331V; W358R) y MexY (T543A; I642V, Q840E, Q1039H).

Tabla 44: Variantes aminoacídicas encontradas en las OprD de las 20 cepas CAR.

CEPAS	TAMAÑO	CAMBIOS AMINOACÍDICOS	Inserciones y deleciones ^a	Patrón
G266	443	wt		Patrón1
G226	141	D43N, S57E, S59R, Q142*	-	Patrón2
G192, G267	64	N34D, S57E, S59R, W65*	-	Patrón3
G251, G252, G262 G274, G275	441	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G y V359L.	Loop L7-corto	Patrón4
G205, G212, G273	>443	D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G y V359L.	Loop L7-corto e inserción de 2 pb en el codón 387 (nt1160)	Patrón5
G261	-	-	<i>ISPu21</i>	Patrón6
G204, G254, G264	66	Q67*	-	Patrón7
G260	>443	T103S, K115T, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E y A315G.	Inserción de 1 pb en el codón 402 (nt 1206)	Patrón8
G201	72	Y73*	-	Patrón9
G255	88	-	Deleción de 16 pb en el codón 18 (nt 55)	Patrón10
G268	-	-	<i>ISPa26</i>	Patrón11

Se representan cada uno de los ST por colores (magenta ST175, azul ST235 y verde: ST973). *: Codón stop. ^a Loop L7-corto: Loop L7 acertado 372V-DSSSSYAGL-L383. wt: fenotipo salvaje.

Tabla 45: Resistoma mutacional de los clones analizados en el estudio.

		GyrA	ParC	ParE	MexB	MexR	NalC	NalD
ST175	G226	T83I, D87N	S87W, L168Q	wt	V203STOP	wt	G71E,A186T	wt
	G267	T83I, D87N	S87W, L168Q	wt	wt	wt	G71E,A186T	wt
	G266	T83I, D87N	S87W, L168Q	wt	wt	wt	G71E,A186T	wt
	G251	T83I, D87N	S87W, L168Q	wt	wt	wt	G71E,A186T	wt
	G192	T83I, D87N	S87W, L168Q	wt	wt	wt	G71E,A186T	wt
ST235	G201	T83I	S87L	D533E	G957D, S1041E, V1042A	V126E	G71E, Q153E, S209R	wt
	G204	T83I	S87L	D533E	G957D, S1041E, V1042A	V126E	G71E, Q153E, S209R	wt
	G254	T83I	S87L	D533E	G957D, S1041E, V1042A	V126E	G71E, Q153E, S209R	wt
	G255	T83I	S87L	D533E	G957D, S1041E, V1042A	V126E	G71E, Q153E, S209R	wt
	G260	T83I	S87L	D533E	G957D, S1041E, V1042A	V126E	G71E, Q153E, S209R	wt
	G264	T83I	S87L	D533E	G957D, S1041E, V1042A	V126E	G71E, Q153E, S209R	wt
	G268	T83I	S87L	D533E	G957D, S1041E, V1042A	V126E	G71E, Q153E, S209R	wt
ST973	G205	T83I	wt	A473V	wt	V126E	G71E, S209R	wt
	G212	T83I	wt	H461D, A473V	wt	V126E	G71E, S209R	wt
	G252	wt	wt	A473V	wt	V126E	G71E, S209R	wt
	G261	wt	wt	A473V	wt	V126E	G71E, S209R	wt
	G262	wt	wt	A473V	wt	V126E	G71E, S209R	wt
	G273	T83I	L95Q	A473V	wt	V126E	G71E, S209R	
	G274	T83I	wt	A473V	wt	V126E	G71E, S209R	wt
	G275	wt	wt	A473V	wt	V126E	G71E, S209R	wt

Las proteínas GyrB, MexA, OprM, NfxB, MexF, MexS, MexT y MvaT no presentaban cambios en ninguna de las cepas analizadas. wt: fenotipo salvaje.

Tabla 45: Resistoma mutacional de los clones analizados en el estudio. (continuación)

	MexC	MexD	OprJ	MexE	OprN	MexX	MexY	MexZ	
ST175	G192	E26A; H310R; S330A;P383S	E317Q; S845A	M69V	wt	wt	K329Q; W358R	T543A	G195E
	G226	E26A; H310R; S330A;P383S	E317Q; S845A	M69V	wt	wt	K329Q; W358R	T543A	G195E
	G251	E26A; H310R; S330A;P383S	E317Q; S845A	M69V	wt	wt	K329Q; W358R	T543A	G195E
	G266	E26A; H310R; S330A;P383S	E317Q; S845A	M69V	wt	wt	K329Q; W358R	T543A	G195E
	G267	E26A; H310R; S330A;P383S	E317Q; S845A	M69V	wt	wt	K329Q; W358R	T543A	G195E
ST235	G201	A31V; R76Q;H310R; S330A; P383S	S845A; I982V	M69V, Q267R	E2V, S8F, Q368R	S13P	A30T; K329Q; L331V; W358R	T543A	L127Fs
	G204	A31V; R76Q;H310R; S330A; P383S	S845A; I982V	M69V, Q267R	E2V, S8F, Q368R	S13P	A30T; K329Q; L331V; W358R	T543A	L127Fs
	G254	A31V; R76Q;H310R; S330A; P383S	S845A; I982V	M69V, Q267R	E2V, S8F, Q368R	S13P	A30T; K329Q; L331V; W358R	T543A	L127Fs
	G255	A31V; R76Q;H310R; S330A; P383S	S845A; I982V	M69V, Q267R	E2V, S8F, Q368R	S13P	A30T; K329Q; L331V; W358R	T543A	L127Fs
	G260	A31V; R76Q;H310R; S330A; P383S	S845A; I982V	M69V, Q267R	E2V, S8F, Q368R	S13P	A30T; K329Q; L331V; W358R	T543A	L127Fs
	G264	A31V; R76Q;H310R; S330A; P383S	S845A; I982V	M69V, Q267R	E2V, S8F, Q368R	S13P	A30T; K329Q; L331V; W358R	T543A	L127Fs
	G268	A31V; R76Q;H310R; S330A; P383S	S845A; I982V	M69V, Q267R	E2V, S8F, Q368R	S13P	A30T; K329Q; L331V; W358R	T543A	E98Fs
ST973	G205	R76Q; G182S; H310R; S330A;P383S	E257Q, S845A,	wt	wt	R83S, K117T	K329Q; L331V; W358R	T543A; I642V; Q840E; Q1039H	wt
	G212	R76Q; G182S; H310R; S330A;P383S	E257Q, S845A,	wt	wt	R83S, K117T	K329Q; L331V; W358R	T543A; I642V; Q840E; Q1039H	wt
	G252	R76Q; G182S; H310R; S330A;P383S	E257Q, S845A,	wt	wt	R83S, K117T	K329Q; L331V; W358R	T543A; I642V; Q840E; Q1039H	ΔE21- G28
	G261	R76Q; G182S; H310R; S330A;P383S	E257Q, S845A,	wt	wt	R83S, K117T	K329Q; L331V; W358R	T543A; I642V; Q840E; Q1039H	ΔE21- G29
	G262	R76Q; G182S; H310R; S330A;P383S	E257Q, S845A,	wt	wt	R83S, K117T	K329Q; L331V; W358R	T543A; I642V; Q840E; Q1039H	wt
	G273	R76Q; G182S; H310R; S330A;P383S	E257Q, S845A,	wt	wt	R83S, K117T	K329Q; L331V; W358R	T543A; I642V; Q840E; Q1039H	L93P
	G274	R76Q; G182S; H310R; S330A;P383S	E257Q, S845A,	wt	wt	R83S, K117T	K329Q; L331V; W358R	I642V;Q840E; Q1039H	wt
	G275	R76Q; G182S; H310R; S330A;P383S	E257Q, S845A,	wt	wt	R83S, K117T	K329Q; L331V; W358R	T543A; I642V;Q840E; Q1039H	ΔE21- G29

El fenotipo hipermutador fue analizado en las cepas secuenciadas (Tabla 46) y mostró un perfil poco variable, destacando, el cambio aminoacídico V71I en *mutT* en las cepas del ST175 y A4T en *mutL* en el ST235. La cepa G201 tiene un codón stop prematuro y mutaciones puntuales diferentes al resto de cepas de su ST.

Tabla 46: Análisis del fenotipo hipermutador en las cepas de los CAR secuenciadas.

		<i>mutS</i> (PA3620)	<i>mutT</i> (PA4400)	<i>mutL</i> (PA4946)
ST175	G192	wt	V71I	wt
	G226	wt	V71I	wt
	G251	wt	V71I	wt
	G266	wt	V71I	wt
	G267	wt	V71I	wt
ST235	G201	wt	E53V; L54*	A4T
	G204	wt	wt	A4T
	G254	wt	wt	A4T
	G255	wt	wt	A4T
	G260	wt	wt	A4T
	G264	wt	wt	A4T
	G268	wt	wt	A4T
ST973	G205	wt	wt	wt
	G212	wt	wt	wt
	G252	wt	wt	wt
	G261	wt	wt	wt
	G262	wt	wt	wt
	G273	wt	wt	wt
	G274	wt	wt	wt
	G275	wt	wt	wt

wt: fenotipo salvaje.

4.6.4 Integrones

Se analizó la presencia de integrones, así como la estructura de éstos en las 20 cepas secuenciadas. Los resultados de NGS se completaron con PCR simples y secuenciación Sanger para definir las estructuras completas de los diferentes integrones.

En el caso de las cepas del ST175, todas contenían un integrón con el gen *aadB*, que confiere resistencia a aminoglucósidos. Dos cepas contenían además integrones con el gen *bla_{VIM-2}* y otra con el gen *bla_{VIM-20}*, este acompañado de *bla_{OXA-2}*, *gcu*, *ISAb_{a14}*, *aph(3')-VI* y una recombinasa (Tabla 47).

Las cepas del CAR ST235 fueron las que presentaron una mayor variabilidad de integrones. Tres cepas presentaron *bla_{VIM-2}* como casete génico en tres tipos de estructuras de integrón de clase 1, siendo uno de dichos integrones portador de dos copias de *bla_{VIM-2}*. El gen *bla_{GES-5}* se encontró en la estructura *bla_{GES-5}+aacA4+gcuE15+aphA15+ISPa21e*, en la cepa G268. Además, las cepas que no presentaban *bla_{VIM-2}* tenían el integrón *aadA6+orfD* (Tabla 47).

Por último, todas las cepas pertenecientes al ST973 contenían un integrón con el gen *bla_{VIM-2}* como único casete génico. Además, cuatro de estas cepas contenían un segundo integrón que contenía dos copias del gen *bla_{VIM-2}* así como la secuencia de inserción *ISPa34* y los genes de resistencia a aminoglucósidos *aacA4* y *aacA1* (Tabla 47)

Tabla 47: Integrones encontrados en cada cepa de los clones de alto riesgo.

		Integrones (casetes génicos)		
ST175	G192	<i>aadB</i>	-	-
	G226	<i>aadB</i>	-	-
	G251	<i>aadB</i>	<i>bla_{VIM-20}+bla_{OXA-2}+gcu+ISAb_{a14}+aph(3')-VI+recombinasa</i>	-
	G266	<i>aadB</i>	<i>bla_{VIM-2}</i>	
	G267	<i>aadB</i>	<i>bla_{VIM-2}</i>	
ST235	G201	<i>aacC-I+aadA1</i>	<i>aadA6+orfD</i>	-
	G204	<i>aacC-I+ISPa34+ aacC1a</i>	<i>bla_{VIM-2}</i>	<i>bla_{VIM-2}+aacA-lb'+aadA1+ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>
	G254	<i>aacC-Ia+ISPa34+ aacC1a</i>	<i>bla_{VIM-2}</i>	<i>bla_{VIM-2}+aacA-lb'+aadA1+ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>
	G255	-	<i>aadA6+orfD</i>	-
	G260	-	<i>aadA6+orfD</i>	-
	G264	<i>aacC-Ia+ISPa34+aadA1</i>	<i>bla_{VIM-2}+ aacA4+aacC1a+ISPa34+ND</i>	
	G268	<i>aad6Δ+ISPa21+Δaad6+orfD</i>	<i>bla_{GES-5}+aacA4 +gcuE15+aphA15+ISPa21e</i>	
ST973	G205	-	<i>bla_{VIM-2}</i>	<i>bla_{VIM-2}+aacA4'+aadA1+ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>
	G212	-	<i>bla_{VIM-2}</i>	<i>bla_{VIM-2}+aacA4'+aadA1+ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>
	G252	-	<i>bla_{VIM-2}</i>	-
	G261	-	<i>bla_{VIM-2}</i>	-
	G262	-	<i>bla_{VIM-2}</i>	-
	G273	-	<i>bla_{VIM-2}</i>	<i>bla_{VIM-2}+aacA4'+aadA1+ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>
	G274	-	<i>bla_{VIM-2}</i>	<i>bla_{VIM-2}+aacA4'+aadA1+ISPa34+ bla_{VIM-2}</i>
	G275	-	<i>bla_{VIM-2}</i>	-

4.6.5 Viruloma

Se analizó la presencia/ausencia de 250 genes de virulencia de *P. aeruginosa* PAO1, incluyendo *exoU* PA14 y *exIA/exIB* de PA7 obtenidos de la base de datos VFDB. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 131.

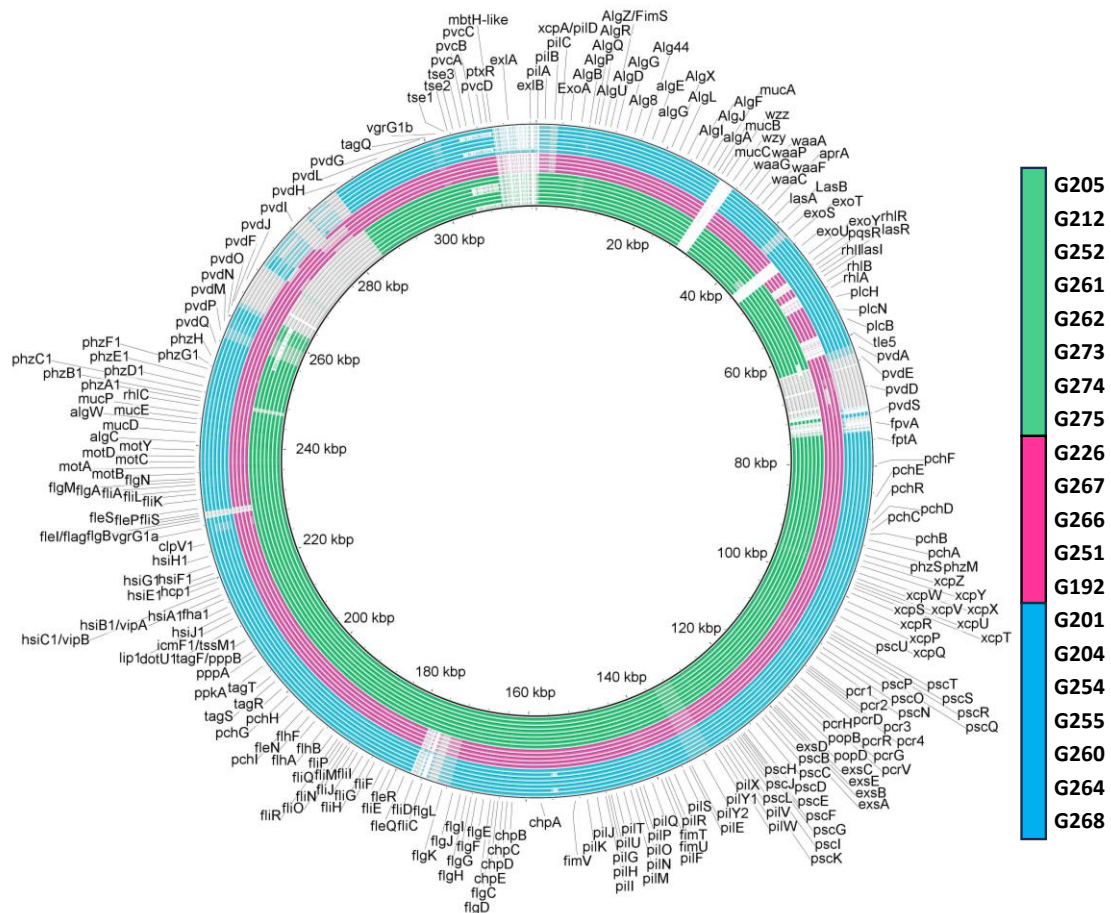


Figura 131: Genes de virulencia detectados entre las cepas de *P. aeruginosa* pertenecientes a los CAR ST175, ST235 y ST973. Se utilizó la herramienta BRIG para representar los genes y su identidad, utilizando el genoma PAO1 de *P. aeruginosa* de referencia (excepto los genes *exIA* y *exIB* que se compararon con PA7 y *exoU* con PA14). Se representan cada uno de los ST por colores (verde: ST973, magenta ST175 y azul ST235).

Se observó gran variabilidad de homología en los cluster de genes *pvd* y *fpvA*, relacionados con la pioverdina. Este hecho se analizó en detalle, observando que las cepas del ST175 poseen el cluster de pioverdina de clase I (similar a la PAO1), las ST235 el cluster de pioverdina de clase II (similar a ATCC27853) y las ST973 el cluster de pioverdina de clase III (similar a ATCC BAA-2108), como se representa en la Figura 132.

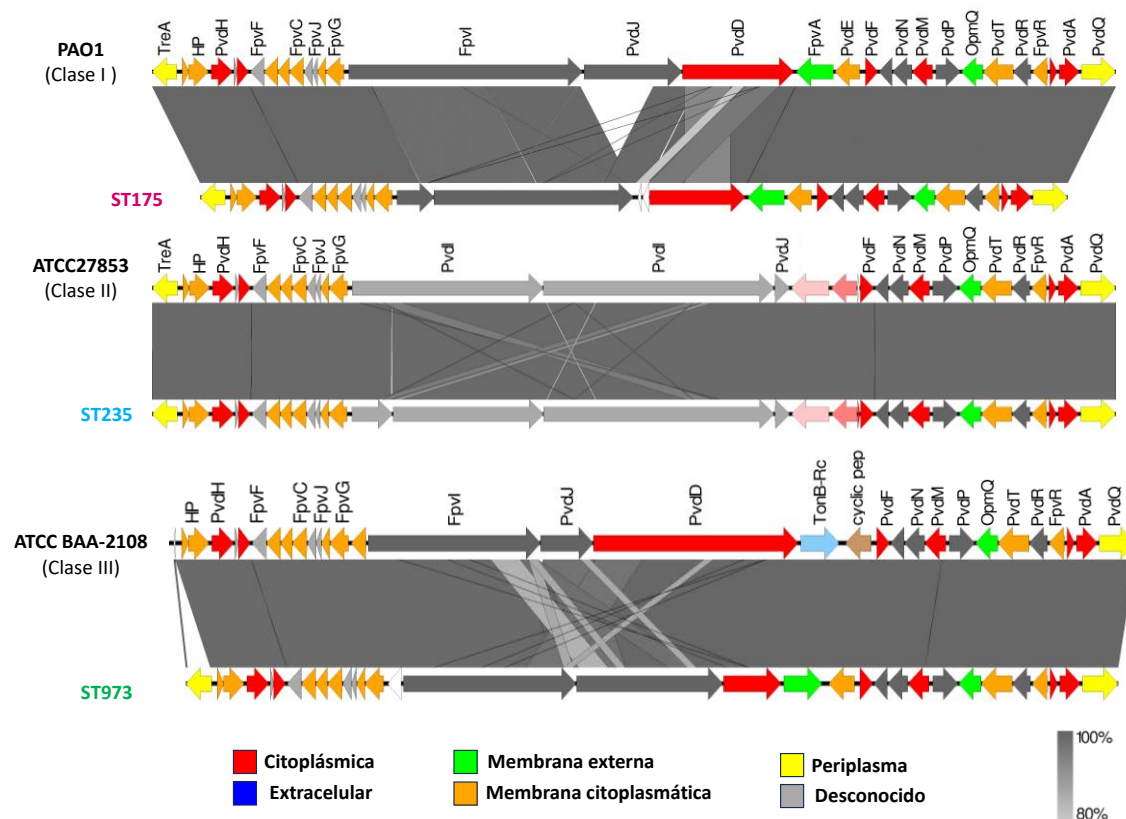


Figura 132: Análisis del cluster de la pioverdina entre las cepas de *P. aeruginosa* ST175, ST235 y ST973 estudiadas. Se utilizó la herramienta EasyFig para representar los genes y su identidad, utilizando como referencia los genomas de PAO1 (Clase I), ATCC27853 (Clase II) y ATCCBAA-2108 (Clase III). Los colores de los genes según la localización de la proteína según www.pseudomonas.com, a excepción de los colores rosa, rosa claro, azul claro y verde pastel que se han utilizado para resaltar las diferencias entre clases. En el Anexo 9 se encuentra la figura con la comparativa entre las diferentes clases.

Se observó la presencia de los genes *fli* relacionados con el flagelo en las cepas del ST973 (Figura 133). Sin embargo, en las cepas de los otros dos clones de alto riesgo analizados en lugar de los genes *fli* aparecen otros genes codificantes de proteínas como acetiltransferasas, oxidorreductasas, sintasas y las proteínas flagelares FlaC, FlaG y FliS, algunas de ellas con baja homología respecto a proteínas flagelares de PAO1. Las cepas del clon ST175 presentaron además una región exclusiva que incluye genes codificantes de aldolasas, citidililtransferasas y proteínas hipotéticas idénticas a las de PA21_ST175 (Cepa de referencia del ST175 en la base de datos).

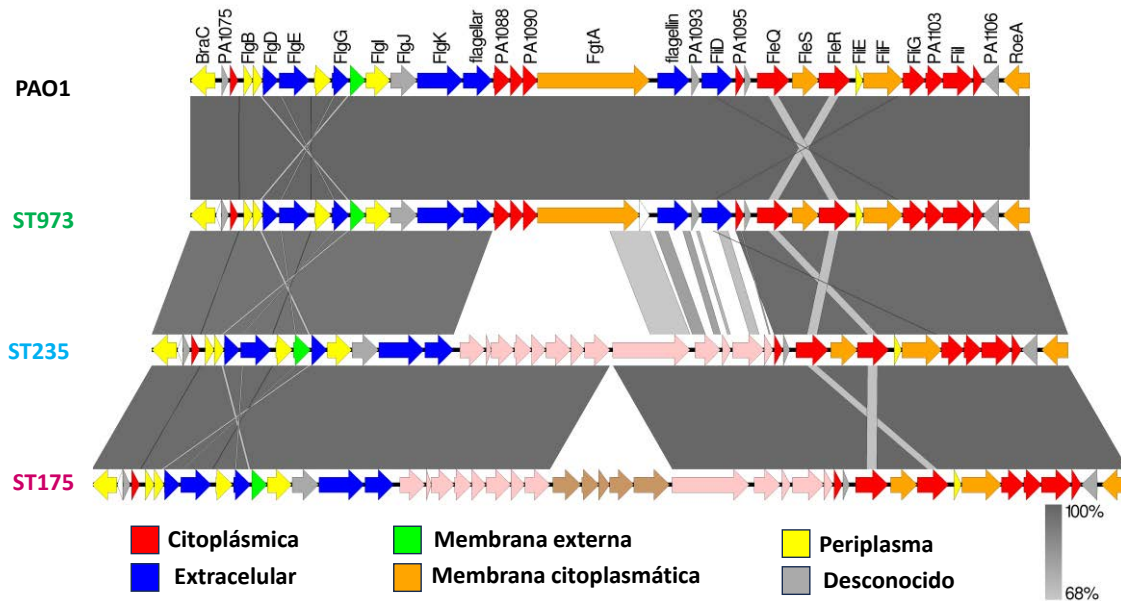


Figura 133: Análisis del cluster relacionado con la síntesis del flagelo entre las cepas de *P. aeruginosa* ST973, ST175 y ST235 estudiadas. Se utilizó la herramienta EasyFig para representar los genes y su identidad, utilizando el genoma PAO1 de *P. aeruginosa* de referencia. Los colores de los genes según la localización de la proteína según www.pseudomonas.com, a excepción de los colores rosa que marca la región compartida por el ST235 y el ST175 y el marrón que marca la región exclusiva del ST175.

Por otro lado, se analizó la presencia del gen *pilA*, subunidad principal de T4P, en las 20 cepas de estos CAR (Figura 134), mediante BLAST de la región entre los genes adyacentes *pilB* y *tRNA-Thr*. Se observó que *pilA* de los clones ST235 y ST973 son grupo 2 (*pilA_{II}*) como la PAO1 y las del ST175 son grupo 1 (*pilA_I*) que poseen además el gen *tfpO*.

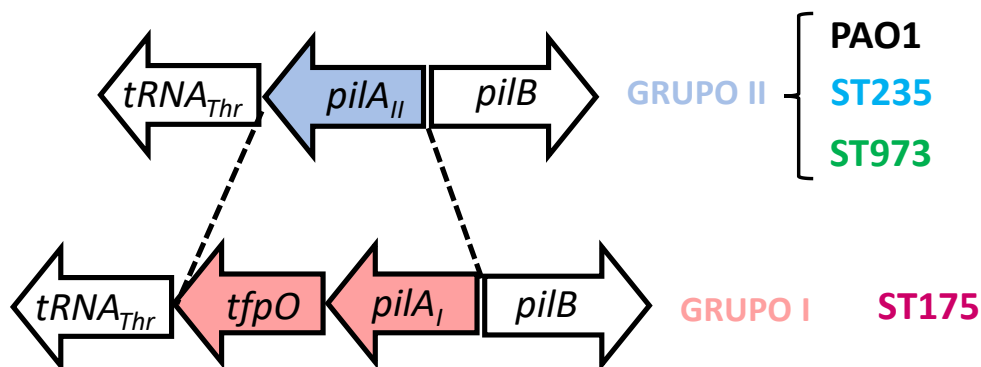


Figura 134: Esquema del locus cromosómico conservado entre los genes adyacentes *pilB* y *tRNA-Thr*.

4.6.6 Genes implicados en quorum sensing

Las cepas del clon ST235 pertenecían a los virulotipos 8 ó 10 y todas portaban los genes *lasR*, *lasI*, *rhIR* y *rhII* como se había determinado previamente por PCR (Tabla 40). Sin embargo, las cepas ST973 pertenecían al virulotipo 6 (no amplificaban el gen *lasR*) y las cepas ST175 al virulotipo 5 (carente de los genes *rhII*, *rhIR* y *rhIAB*). Por ello, se analizaron en detalle las secuencias y los entornos de dichos genes en las cepas de los clones ST973 y ST175. Así, cuando se analizó la secuencia del gen *lasR* en las cepas ST973 se observó la presencia de un codón stop prematuro dando lugar a una proteína LasR de 208 aminoácidos (N208*), como se muestra en la Figura 135.

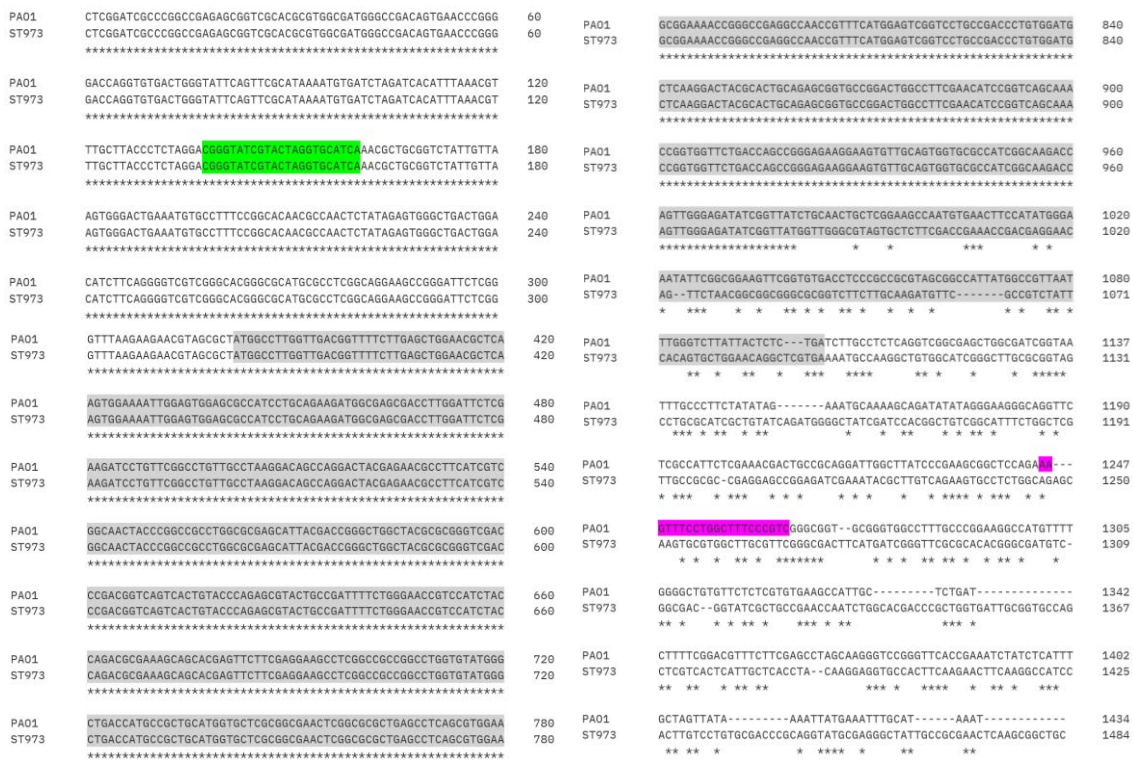


Figura 135: Representación de la secuencia y la localización del primer que hace que la PCR sea negativa. Primer F en verde y primer R en rosa. En gris la secuencia del gen *lasR*.

Por otra parte, se comprobó que las 5 cepas ST175 no sólo carecían de los genes *rhIAB*, *rhII* y *rhIR*, sino que carecían de la región completa del *rhI* desde la etiqueta PA3472 hasta PA3480 (según PA01) incluyendo los genes *pheC*, *rhl*, *rhIR*, *rhIB* y *rhIA* (Tabla 48). En su lugar, estas cepas en esa región presentaban una secuencia de lectura abierta de 468 pb con un 46% de identidad con respecto al gen codificante de MadN

(PA3474), una enzima málica dependiente de NAD. Esta secuencia se obtuvo con 71 pb de la región intergénica entre *rhIA* y PA3480 unida a 397 pb del gen *madN* (PA3474).

Tabla 48: Entorno genético de *rhl* en *P. aeruginosa*. Se incluye la proteína que codifican. Fuente: pseudomonas.com

GEN	PRODUCTO
PA3472	Proteína hipotética
PA3473	EamA family transporter RarD
PA3474	MadN
<i>pheC</i>	Precursor de la ciclohexadienil deshidratasa
<i>rhlI</i>	Proteína de síntesis autoinductora <i>rhlI</i>
<i>rhlR</i>	Regulador transcripcional <i>rhlR</i>
<i>rhlB</i>	Cadena B de ramnosiltransferasa
<i>rhIA</i>	Cadena A de ramnosiltransferasa
PA3480	Desoxicitidina trifosfato desaminasa

Para comprobar si ese hallazgo era intrínseco de todas las cepas ST175, se analizaron un total de 109 genomas de *P. aeruginosa* ST175, así como la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1. De estos genomas, 58 se obtuvieron de la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 42 de la base de datos PubMLST (<https://pubmlst.org/>), 8 cepas de nuestra colección y una de la base de datos de *Pseudomonas* (<https://pseudomonas.com/>) (Anexo 10).

Se realizó un apilamiento desde PA3472 hasta PA3480 (7.243 bp) de los genomas de las 109 cepas pertenecientes al ST175 con la cepa de referencia PAO1. Como se observa en la Figura 136, únicamente tres (representados en color verde) de los 109 genomas de cepas ST175 analizados tenían presente la región *rhl*. Estos genomas fueron WH-SGI-V-07230, ASM292719v1 e ID_3418. Las características de estos genomas se recogen en el Anexo 10.

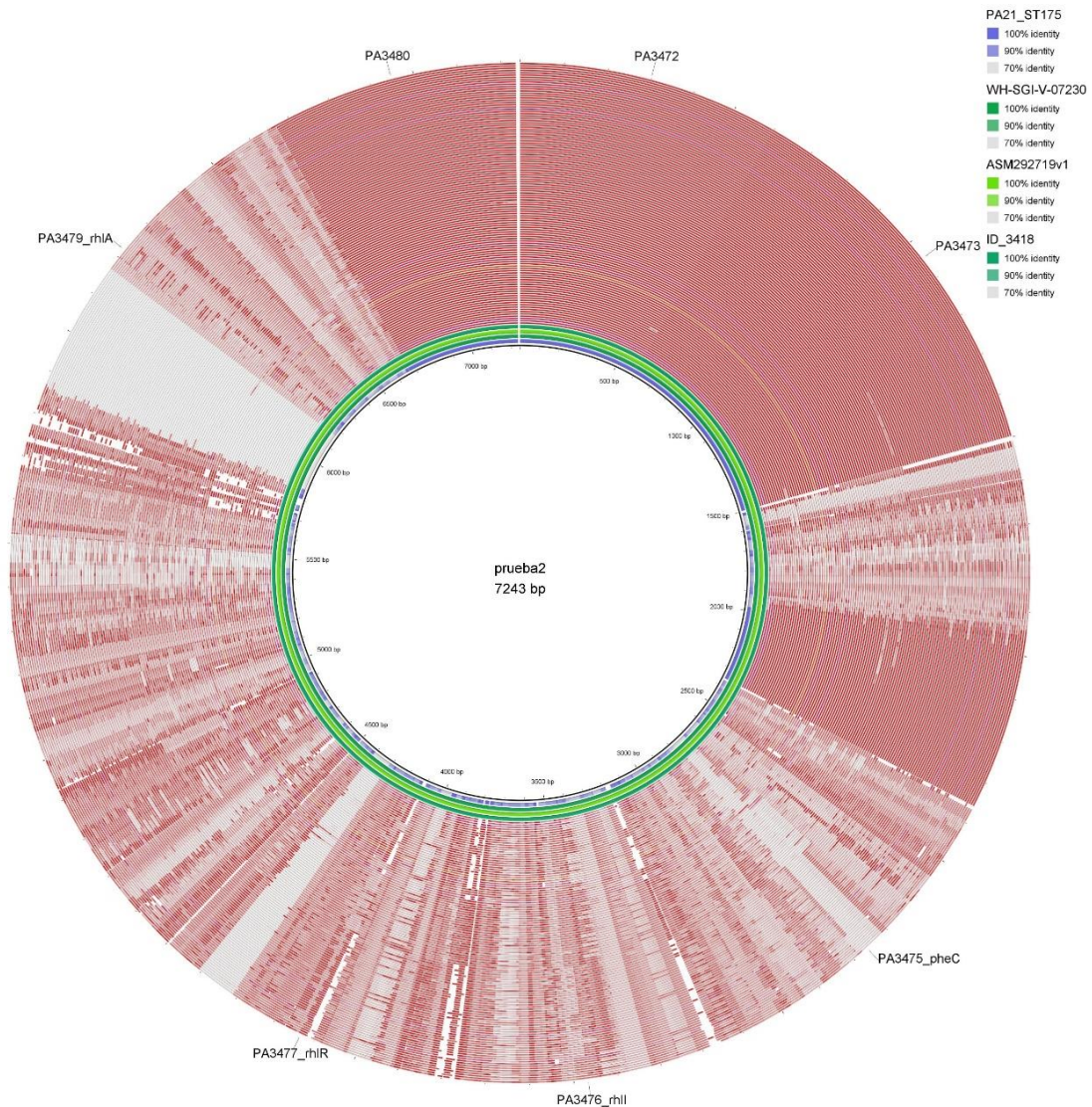


Figura 136: Representación gráfica del entorno de *rhl* de *P. aeruginosa* ST175. Se utilizó la herramienta BRIG para representar los genes y su identidad, utilizando el genoma PAO1 de *P. aeruginosa* como referencia. En azul la cepa de referencia de ST175 (PA21), en verde las cepas con una alta identidad y por lo tanto, la presencia de la región *rhl* y en rojo aquellas que no tienen los genes *rhl*.

Se realizó un apilamiento más detallado de estas secuencias y como muestra la Figura 137, el operón *rhl* de los genomas WH-SGI-V-07230, ASM292719v1 e ID_3418 fue idéntico a la cepa de referencia PAO1; mientras que los 106 genomas restantes carecían de los genes *pheC*, *rhII*, *rhIR*, *rhIB* y *rhIA*, detectando la secuencia de lectura abierta de 468 pb generada.

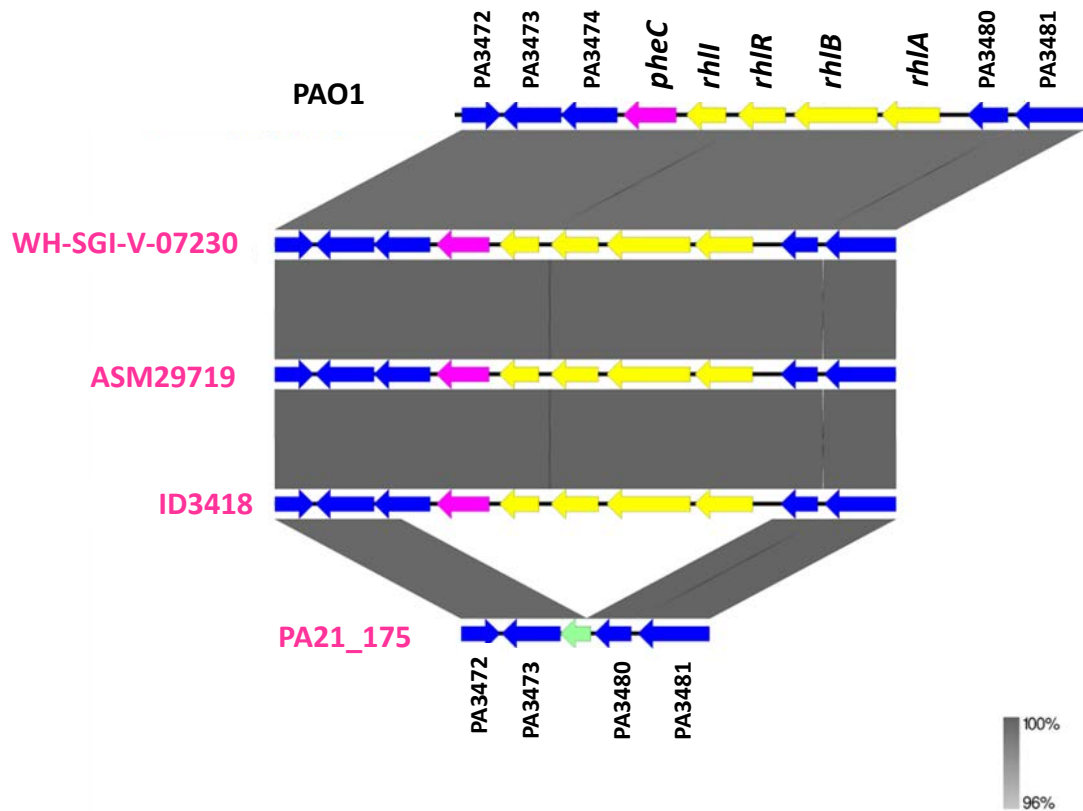


Figura 137: Representación gráfica de la región *rhl* comparando PAO1, las tres cepas de ST175 que tienen la región presente y la cepa de referencia PA21 que al igual que el resto de las ST175 no presentan esta región. Los colores representan: rosa del gen *pheC*, amarilla para los genes *rhl* y azul para las proteínas hipotéticas que flanquean esta región, en verde la secuencia de lectura abierta generada.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria ubicua, con gran versatilidad metabólica y capaz de crecer en ambientes muy variados. Se puede detectar en humanos, animales, alimentos, suelo, agua, ambientes contaminados con petróleo o ambientes hospitalarios, entre otros (Crone *et al.*, 2020). La capacidad de crecer en lugares húmedos con nutrientes mínimos hace que sea un problema importante a nivel hospitalario y alimentario.

P. aeruginosa es uno de los principales patógenos nosocomiales y posee características que le convierten en un importante patógeno, como son la resistencia intrínseca a un amplio número de antibióticos, una elevada capacidad de adquirir nuevas resistencias, un amplio arsenal de factores de virulencia y la capacidad de formar biofilm (Nicolau & Oliver, 2010; Subedi *et al.*, 2018). *P. aeruginosa* pertenece a las listas de patógenos ESKAPE y TOTEM, y desde 2017, la OMS clasificó a *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos como patógeno de Prioridad 1 (crítica) para el que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos (Tacconelli *et al.*, 2018; Botelho *et al.*, 2019; De Oliveira *et al.*, 2020; Venkateswaran *et al.*, 2023). Sin embargo, la mayoría de los estudios que han analizado la prevalencia de *P. aeruginosa*, de clones de alto riesgo (CAR) y de determinantes de resistencia en esta especie se han realizado sobre aislados clínicos (Mulet *et al.*, 2013; Botelho *et al.*, 2018; Del Barrio-Tofiño *et al.*, 2019; Recio *et al.*, 2020; del Barrio-Tofiño *et al.*, 2020; Sawa *et al.*, 2020; Pérez-Vázquez, *et al.*, 2020; Kocsis *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2023). Aunque en los últimos años, la importancia del concepto *One Health* está permitiendo que se haya incrementado el número de trabajos empleando cepas de *P. aeruginosa* no clínicas (Grosso-Becerra *et al.*, 2014; Qiao *et al.*, 2018; Bel Hadj Ahmed *et al.*, 2019; Crone *et al.*, 2020; Larsson & Flach, 2022).

La resistencia a los antimicrobianos es una preocupación destacada para la salud global que ejemplifica especialmente bien el enfoque *One Health* por la interconexión existente entre el uso de antibióticos tanto a nivel veterinario como humano, o la transmisión de genes de resistencia y bacterias entre diferentes ambientes. Además, existe un consenso cada vez mayor de que para comprender completamente la patogenicidad y la resistencia a los antibióticos de *P. aeruginosa* se debe adoptar una

perspectiva *One Health* que considere su presencia y permanencia en diversos ecosistemas. Así, dada la naturaleza ubicua de *P. aeruginosa* es crucial obtener una comprensión integral entre aislados de todos los entornos: humano, animal y ambiental (McEwen & Collignon, 2018; Hernando-Amado *et al.*, 2019; Bel Hadj Ahmed *et al.*, 2019; Aslam *et al.*, 2021, Laborda *et al.*, 2021; Sanz-García *et al.*, 2021).

Todas estas premisas marcan el contexto y el objetivo primordial de esta tesis, en la que se ha trabajado analizando la presencia de factores de virulencia, mecanismos de transferencia de patogenicidad, la resistencia a antibióticos y la diseminación clonal de *P. aeruginosa* desde un punto de vista centrado en su origen y atendiendo a las características propias de cada cepa.

1. Caracterización de cepas de *P. aeruginosa* de origen clínico y no-clínico.

En este capítulo se llevó a cabo una caracterización completa de 275 cepas de *P. aeruginosa* de la colección del Área de Microbiología Molecular del CIBIR. Se incluyeron todas las 144 cepas aisladas sin selección antibiótica de muestras no clínicas (individuos sanos, animales, alimentos y ambientales) del periodo 2010-2016; así como 68 cepas sensibles y 63 resistentes a carbapenémicos de origen clínico de los hospitales HCULB y HUSP. El análisis de esta colección ha supuesto un estudio comparativo con gran número de cepas de una amplia diversidad de orígenes. La adaptación a cada nicho en particular es uno de los pilares clave en la ubicuidad de esta especie microbiana (de Sousa *et al.*, 2021; Jurado-Martín *et al.*, 2021; Morin *et al.*, 2021).

La evaluación de la resistencia a antibióticos en las 275 cepas de *P. aeruginosa* de nuestro estudio, mostró una población en la que un 64% de las cepas resultaron sensibles a todos los antipseudomónicos testados. Del resto, un 15% se clasificaron como modR, un 18% MDR y un 3% XDR. Las cepas de *P. aeruginosa* mostraron diferentes fenotipos de resistencia en función del origen. Entre las cepas de origen no clínico, observamos un 90% de cepas con sensibilidad a todos los antibióticos testados, un 9% de cepas modR y un 1% de cepas MDR. Por el contrario, entre las cepas clínicas se

detectaron un 34% de cepas sensibles a todos los antibióticos, un 21% modR, un 37% de cepas MDR y un 7% XDR (fenotipo no detectado entre las cepas de origen no clínico). Al igual que se ha descrito en otros estudios previos (Ramsay *et al.*, 2019; Morales-Espinosa *et al.*, 2024; Gervasoni *et al.*, 2023), las cepas de *P. aeruginosa* no clínicas muestran en general gran sensibilidad a los antibióticos evaluados. Se conoce que la resistencia adquirida y adaptativa a menudo surge debido a la presión antimicrobiana del entorno bacteriano circundante o se adquiere por transferencia horizontal del material genético de otras comunidades bacterianas resistentes (Goren *et al.*, 2010; Breidenstein *et al.*, 2011; Slekovec *et al.*, 2012; Olivares *et al.*, 2013; Woolhouse & Ward, 2013). Por ello, la mayor presión selectiva de antibióticos a la que se ven sometidas las cepas de origen clínico contribuye a un mayor desarrollo de resistencias en este grupo. Estos hallazgos respaldan un modelo en el que las bacterias ambientales sensibles a los antibióticos infectan a los pacientes y son capaces de desarrollar resistencia durante una infección (Römling *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 2015).

Entre las 144 cepas no clínicas, destaca la resistencia a carbapenémicos (4% a imipenem y 3% al meropenem) y a aztreonam (3%), porcentajes similares a los detectados en estudios previos (Gharieb *et al.*, 2022; Morales-Espinosa *et al.*, 2024). Sin embargo, y teniendo en cuenta el criterio de selección de que un 48% de las 131 cepas clínicas eran resistentes a carbapenémicos, más de un 43% de las cepas clínicas analizadas fueron resistentes a ciprofloxacina o gentamicina y un alto porcentaje fueron MDR (37%). Según los últimos datos del ECDC, el porcentaje de cepas *P. aeruginosa* MDR ha pasado de 10,5% a 11,4% (informes del 2017 y 2021, respectivamente); aunque estos valores varían entre el 15 y el 27% en diferentes estudios realizados en España (Fernandez-Cuenca *et al.*, 2020; Sastre-Femenia *et al.*, 2023).

El serotipado se propone como un parámetro imprescindible a la hora de analizar la epidemiología de *P. aeruginosa*. El antígeno específico O (OSA o banda B), es la región más variable del lipopolisacárido (LPS) y juega un papel importante en la virulencia además de ser responsable de la especificidad de serogrupo (Anbo & Jelsbak, 2023). Se ha descrito, además, cierta correlación de serotipos con perfiles de resistencia y determinados STs pertenecientes a CAR (del Barrio-Tofiño *et al.*, 2019). El serotipo más frecuente en nuestro estudio fue el serotipo no tipable, encontrado en un 30% de las

cepas, porcentaje similar al encontrado en otros estudios (Nasrin *et al.*, 2022; Pirnary *et al.*, 2009). Este serotipo no tipable es mucho más frecuente en las cepas de origen clínico que en las no clínicas (48% vs. 13%) respaldando el hecho de que la pérdida de este marcador puede ser consecuencia de la adaptación de la bacteria a la infección. Además, si desglosamos las cepas pertenecientes a este serotipo, puede observarse que en su mayoría son de origen respiratorio, apoyando la idea de que la pérdida de este marcador forma parte del proceso adaptativo a infecciones crónicas, como en el caso de la FQ u otras enfermedades broncopulmonares (del Barrio-Tofiño *et al.*, 2019, Pirnay *et al.*, 2009).

Además del serotipo no tipable, los serotipos más comunes fueron O:6 (19%) y O:1 (12%), seguidos de O:3 y O:11 (8% cada uno). Todos estos serotipos suponen más del 75% de las cepas estudiadas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en diversos estudios, que también detectan los serotipos O:6, O:1 y O:11 de manera predominante (del Barrio-Tofiño *et al.*, 2019; Pirnay *et al.*, 2009; Nasrin *et al.*, 2022; Lu *et al.*, 2014; Maatallah *et al.*, 2011). El serotipo O:12 está frecuentemente asociado a cepas epidémicas y con un perfil de resistencia MDR/XDR; sin embargo, en esta tesis se detectó únicamente en dos cepas clínicas y MDR (1%). Por otro lado, los serotipos O:13 y O:14 no se encontraron en ninguna cepa y el serotipo O:8 únicamente en una cepa de origen alimentario. Estudios previos confirman la baja prevalencia de estos serotipos (del Barrio-Tofiño *et al.*, 2019, Pottier *et al.*, 2023, Kaszab *et al.*, 2021).

Si tenemos en cuenta el fenotipo de resistencia, podemos concluir que prácticamente la totalidad de cepas MDR/XDR se clasificaron como O:4, O:11 o no tipables, asociación que ya había sido descrita previamente (del Barrio-Tofiño *et al.*, 2019, Pirnay *et al.*, 2009, Maatallah *et al.*, 2011).

Todas las cepas fueron tipificadas molecularmente utilizando las técnicas de PFGE y MLST. En ambos casos, se ha encontrado una alta diversidad clonal.

Analizando la diversidad clonal mediante PFGE se obtuvieron 245 pulsotipos diferentes para las 275 cepas, detectándose 221 pulsotipos únicos, detectados en una única cepa, y 24 compartidos, que agruparon un total de 54 cepas. Estos datos demuestran la elevada variabilidad de esta población. Además, se observó que, de

manera general, aislados procedentes de diferentes orígenes no presentaron patrones iguales por PFGE, a excepción de un pulstipo que agrupó dos cepas medioambientales (G127 y G129) y una cepa clínica aislada de hemocultivo (G158). Esta alta variabilidad encontrada en la especie *P. aeruginosa* ha sido ampliamente descrita en aislados de origen clínico, pero principalmente no clínico (Morales-Espinosa *et al.*, 2024; Pirnay *et al.*, 2009; Botelho *et al.*, 2019), lo que demuestra que no existe una asociación entre un clon determinado y un hábitat (Pirnay *et al.*, 2009). Sin embargo, la transmisión de *P. aeruginosa* en el entorno hospitalario aumenta la prevalencia de clones particularmente adaptados, como los CAR (Oliver *et al.*, 2015). En los últimos años, el MLST se ha convertido en una herramienta esencial para el seguimiento de CAR, generalmente MDR/XDR y asociados a ambientes hospitalarios, que desempeñan un papel primordial en la expansión de la resistencia a nivel mundial (Del barrio-Tofiño *et al.*, 2020; Dufkova *et al.*, 2023).

La técnica de tipado MLST constituye un enfoque esencial para comprender la evolución del genoma, así como los procesos que dan lugar a la diversidad entre cepas. En principio, la estructura de *P. aeruginosa* se definió como panmítica (de apareamiento aleatorio), pero finalmente se ha llegado al consenso de que se trata de una estructura poblacional epidémica no clonal (Oliver *et al.*, 2015). Esto significa que la estructura poblacional de *P. aeruginosa* se compone de un número limitado de clones ampliamente distribuidos seleccionados a partir de un fondo de un gran número de genotipos raros y no relacionados que se recombinan con alta frecuencia (Pelegriin *et al.*, 2021). A fecha de 19 de diciembre de 2023 aparecen descritas en la web *Pseudomonas aeruginosa* MLST Database (<https://pubmlst.org/paeruginosa/>) un total de 4.893 secuencias tipo para *P. aeruginosa* y hay un total de 9.756 cepas incluidas en la misma.

En el análisis de las 275 cepas de *P. aeruginosa* de este trabajo se han encontrado 127 STs diferentes: 95 STs entre cepas no clínicas y 49 STs entre cepas clínicas. Se han detectado además 27 ST nuevos en 32 cepas (30 de origen no clínico y 2 de origen clínico). El elevado número de nuevos ST encontrados refleja la gran diversidad de poblaciones de *P. aeruginosa*, sobre todo entre las cepas no clínicas. Además, el número

de estudios realizados en cepas no clínicas es mucho menor en comparación con los de cepas de origen clínico (Lebreton *et al.*, 2021; Johnson *et al.*, 2007; Kidd *et al.*, 2012).

Los STs más prevalentes en este estudio fueron ST235 (11%), ST253 (5,5%), ST274 (5%), ST175 (4,7%), ST244 (3%), ST973 (3%), ST17 (2,5%), ST252 (2,5%) y ST395 (2,2%) coincidiendo con lo descrito en la literatura (Nageeb *et al.*, 2021; Lebreton *et al.*, 2021; Maatallah *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2019; del Barrio-Tofiño *et al.*, 2020). Sin embargo, entre estos 9 ST más prevalentes sólo se agrupan el 39% de las cepas estudiadas. Se encontraron 113 STs que incluían menos de cuatro cepas, observándose la presencia de una única cepa en 88 STs; es decir, el 89% de los STs detectados incluían menos de cuatro cepas, reforzando la idea de la elevada variabilidad genética y apoyando la descripción de una población epidémica no clonal en *P. aeruginosa* (Oliver *et al.*, 2015).

Algunos autores han propuesto que los aislados clínicos son indistinguibles de los aislados ambientales y que no existen clones específicos con una selección de hábitat específica (Maatallah *et al.*, 2011). En esta tesis, aunque se han detectado algunos ST específicos de cepas clínicas (ST235 o ST973) y otros de cepas de origen no clínico (ST313, ST1711 o ST217), se han observado hasta 17 STs compartidos entre ambos orígenes. Estos datos afianzan la necesidad del enfoque *One Health* para entender cómo han evolucionado o pueden evolucionar las cepas resistentes y adaptadas a determinados ambientes de infección.

Existen **clones de alto riesgo** (CAR) que se han diseminado exitosamente a nivel global y están asociados a mayor resistencia, especialmente a nivel hospitalario (del Barrio-Tofiño *et al.*, 2020; Oliver *et al.*, 2015; Oliver *et al.*, 2024). De entre los 10 CAR de *P. aeruginosa* más ampliamente distribuidos a nivel mundial (ST235, ST111, ST233, ST244, ST357, ST308, ST175, ST277, ST654 y ST298) (del Barrio-Tofiño *et al.*, 2020), se han detectado, en mayor o menor proporción, los clones ST235, ST111, ST244, ST357, ST175, ST277 y ST298 entre las cepas analizadas en esta tesis. Así mismo, hay varios STs donde se agrupan mayoritariamente las cepas MDR/XDR, destacando los CAR ST175, ST235 y ST244, el clon internacional ST274 y el clon local de alto riesgo ST973. La importancia clínica de los CAR considerados MDR/XDR radica en la capacidad que poseen para acumular y diseminar resistencias (Woodford *et al.*, 2011), causando brotes

epidémicos a nivel mundial asociados a una elevada morbilidad y mortalidad. Por lo que la detección y monitoreo de estos es importante.

Se ha observado una asociación entre algunos STs y el serotipo, destacando ST235-O:11; ST175-O:4; ST274-O:3; ST245-O:5, ST17-O:1 ó ST155-O:6, previamente descritos en otros trabajos (del Barrio-Tofiño *et al.*, 2019; del Barrio-Tofiño *et al.*, 2020; Anbo *et al.*, 2023; Oliver *et al.*, 2024). Sin embargo, en algunos casos, se puede observar una ausencia de vínculo entre el grupo OSA y el ST, como son ST244 con descripciones de serotipos O:2, O:5 y O:12; ST253 con los serotipos O:10 y O:12 o el clon ST111 con los serotipos O:4 y O:12 (Nageeb *et al.*, 2020; del Barrio-Tofiño *et al.*, 2019). Estos resultados concuerdan parcialmente con los encontrados en esta tesis, ya que para el ST244 se han detectado los serotipos O:5 y O:16, así como varias cepas no tipables; para el ST253 los serotipos O:10, O:16 y más del 60% no tipables, y la única cepa ST111 detectada en este trabajo resultó no tipable.

También se ha observado una relación entre ST y la presencia de los genes *exoS/exoU* (efectores de T3SS con mayor relevancia clínica). (Horna & Ruiz, 2021; Oliver *et al.*, 2024), destacando las cepas pertenecientes a los clones ST235, ST308 y ST253 que poseen el gen *exoU*, y cepas pertenecientes a los ST175, ST274, ST244, ST17, ST27, ST155, ST252 o ST395 el gen *exoS*. Es importante además destacar que cada secuencia tipo estaba exclusivamente asociado a uno de estos genes, es decir, en ningún caso se han encontrado ST con cepas con uno de los genes y cepas con otro.

Se ha propuesto que los CAR de *P. aeruginosa* representan linajes distintos con una elevada capacidad para adquirir y mantener genes de resistencia y/o los elementos genéticos móviles que contienen estos genes en comparación con la población general de *P. aeruginosa*. Sin embargo, el éxito de CAR de *P. aeruginosa* no resistentes a antibióticos tiende a estar poco investigado en la mayoría de los estudios, lo que, en consecuencia, requiere la evaluación de marcadores genéticos que subyacen al éxito clonal en un limitado número de CAR, tanto resistentes como sensibles.

Se analizó la presencia de diferentes determinantes de virulencia mediante amplificación por PCR en las 274 cepas estudiadas. En función de la presencia/ausencia

de los 14 genes implicados en virulencia y *quorum sensing* se encontraron 16 virulotipos diferentes.

El sistema de secreción de tipo III (T3SS) es el más relevante en la patogénesis de *P. aeruginosa* (Juan *et al.*, 2017; Horna & Ruiz, 2021; Lin *et al.*, 2022). En la mayoría de las cepas se detectaron los genes *exoT* y *exoY* (97 y 89%, respectivamente), al igual que la presencia mutuamente excluyente de los genes *exoS* y *exoU*. El 67% de las cepas presentaron el genotipo *exoS*⁺/*exoU*⁻ y el 28% el genotipo *exoS*⁻/*exoU*⁺. Nuestros hallazgos concuerdan con estudios previos que demuestran que *exoT* es el factor de virulencia más prevalente en *P. aeruginosa* y que la prevalencia del genotipo *exoU*⁺ oscila entre el 10-40% y es menos frecuente que el genotipo *exoS*⁺ (60-90%) entre las cepas de *P. aeruginosa* (Elmouaden *et al.*, 2019; Horna *et al.*, 2019; Jurado-Martín *et al.*, 2021; Horna & Ruiz, 2021; Feltman *et al.*, 2001). Estos porcentajes varían si tenemos en cuenta el origen de las cepas, ya que en las cepas de origen clínico la presencia de *exoS* y *exoU* fue del 63 y 37%, respectivamente, mientras que en las cepas no clínicas fue del 71 y 19%, porcentajes similares a los encontrados en otros trabajos de muestras no clínicas (Wu *et al.*, 2024; Bel Hadj Ahmed *et al.*, 2019). El elevado porcentaje del efector *exoU* detectado en las cepas de origen clínico es destacable si tenemos en cuenta que de las cuatro proteínas efectoras del T3SS (ExoS, ExoT, ExoU y ExoY), ExoU es la que se ha asociado a un peor pronóstico tanto en investigaciones clínicas como experimentales (Subedi *et al.*, 2018; Horna & Ruiz, 2021; Hardy *et al.*, 2021). Por otra parte, se detectaron otros genotipos menos comunes: *exoS*⁺/*exoU*⁺ y *exoS*⁻/*exoU*⁻ en un 1% y 4% de las cepas, respectivamente, todas ellas de origen no clínico.

La distribución de los genes que codifican estos efectores no es uniforme y particularmente *exoS* y *exoU* son casi siempre mutuamente excluyentes (Juan *et al.*, 2017; Feltman *et al.*, 2001; Hauser, 2009; Ozer *et al.*, 2019), probablemente porque estos genes proporcionan una mayor adaptación en distintos nichos ecológicos (Rutherford *et al.* 2018). Sin embargo, desde la primera detección de la presencia concomitante de ambos genes en dos cepas clínicas de *P. aeruginosa* en París en 1999, se han reportado un número significativo de aislados mayoritariamente clínicos en más de 12 países de Europa, América y Asia (Horna *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2023b). La prevalencia del genotipo *exoS*⁺/*exoU*⁺ es, en general, baja; de modo que aprovechando

la base de datos pública del NCBI, Song *et al.*, 2023b han estimado que este tipo de cepas podría representar el 2,5% (127/5177) de los aislados secuenciados accesibles a nivel mundial. Este dato es mayor al encontrado en nuestro trabajo (1%). Sin embargo, cabe destacar que, en nuestro estudio, todas las cepas con este genotipo *exoS*⁺/*exoU*⁺ eran de origen no clínico (dos aisladas en muestras de individuos sanos y una de agua de río), con fenotipo multiS, serotipo O:4 y pertenecientes a los ST2143, ST2222 y ST2547. Song *et al.*, 2023b determinaron que una cepa con genotipo *exoS*⁺/*exoU*⁺ es capaz de expresar ambos genes, dando lugar a una excesiva citotoxicidad y una muerte rápida en modelo murino. La detección de este tipo de cepas en ambientes no clínicos es un problema importante y sugiere la existencia de presiones específicas que facilitan la presencia estable de ambos genes y favorecen su diseminación concomitante. Un estudio más exhaustivo puede ayudar a comprender la epidemiología y evolución de estas cepas hiperpatógenas de *P. aeruginosa*.

Otro de los genotipos poco comunes en *P. aeruginosa* detectados en este trabajo ha sido *exoS*/*exoU* encontrado en 11 cepas, todas de origen no clínico. Nueve de ellas (aisladas de animales sanos, 6 y medioambiente, 3) carecían de todo el T3SS y poseían la exolisina ExIA. La presencia de cepas *ex/A* positivas aisladas de medioambiente ha sido reportada previamente (Quiroz-Morales *et al.*, 2022), sugiriendo que las cepas *ex/A* positivas son capaces de colonizar diferentes nichos ecológicos. Una vez más, los resultados obtenidos en esta tesis confirman que tanto personas sanas como animales o el medioambiente representan reservorios de bacterias portadoras, no sólo de genes de resistencia, si no de determinantes de virulencia que pueden movilizarse. Sin embargo, el número de estudios en este tipo de entornos es bajo y los relativos a la caracterización de la virulencia en *P. aeruginosa* de origen animal o medioambiental son aún menores.

ExIA pertenece al sistema de secreción de dos componentes ExIAB, que induce la formación de poros en las membranas de las células eucariotas provocando la muerte celular. Es importante destacar, que de las 9 cepas con exolisina, 5 resultaron positivas para el gen *exoA*, codificante de la exotoxina A, mientras que las otras 4 no albergaban este gen. Este dato pone de relieve la enorme plasticidad en cuanto a adquisición y/o pérdida de determinantes de virulencia de *P. aeruginosa*.

Por otro lado, 2 de las 11 cepas con genotipo *exoS⁻/exoU⁻* contenían los genes *exoY* y *exoT*, pero carecían de la exolisina ExIA. Se trata de la primera descripción de este tipo de cepas y serán necesarios más estudios, tanto de genómica, como de proteómica, para establecer cuál es el papel de este tipo de cepas que podrían representar en vínculo evolutivo entre las cepas del clado 1 (*exoS⁺/exoU⁻*) y las del clado 2 (*exoS⁻/exoU⁺*).

En cuanto a otros genes de virulencia analizados, los genes *lasA*, *lasB* y *aprA* que codifican para las elastasas A y B y la proteasa alcalina, respectivamente, se detectaron en todas las cepas. Otros trabajos también encuentran elevados porcentajes de prevalencia de estos determinantes de virulencia (Ghanem *et al.*, 2023; Qian *et al.*, 2020; Benie *et al.*, 2017; Dos Santos *et al.*, 2023). El gen *exoA* responsable de la codificación de la exotoxina A, una de las citotoxinas más virulentas que produce *P. aeruginosa*, se encontró en un 98% en línea con los datos obtenidos en otros estudios (Algammal *et al.*, 2000; Chand *et al.*, 2021; Behzadi *et al.*, 2022).

En *P. aeruginosa*, muchas funciones de adaptación, supervivencia y virulencia están reguladas por el sistema de comunicación bacteriana *quorum sensing* (QS) a través de 4 mecanismos, Las, Rhl, Pqs e IQS. En este trabajo, se han analizado los genes reguladores del QS de los dos mecanismos principales: el mecanismo Las, localizado en la cima de la jerarquía de la señalización, y Rhl involucrado principalmente en la regulación en condiciones de aumento de la densidad celular. La mayoría de las cepas de nuestro estudio (90%) resultaron positivas para los 4 genes analizados (*rhIR*, *rhII*, *lasI* y *lasR*). Sin embargo, se encontraron 45 cepas que tenían afectados o no amplificaron los genes del QS. En 17 cepas (virulotipos V2, V9 y V11), mayoritariamente de origen no clínico (65%) y pertenecientes a varios STs, se observó el gen *lasR* truncado por diferentes secuencias de inserción. Otra cepa (V12, clínica, ST3145) presentó ambos genes *lasR* y *rhIR* truncados por la *ISPa104*. El gen *lasR* no se amplificó en 11 cepas (V6) (8 cepas clínicas pertenecientes al ST973 y 3 ambientales ST217); ambos genes *lasR* y *lasI* no amplificaron en otras 3 cepas (V7) (todas ellas ST155 procedentes de alimentos) ni los genes *rhIR* y *rhII* en 13 cepas, todas pertenecientes al ST175. Estos resultados dan una idea de la variabilidad genética de *P. aeruginosa*, especialmente en la regulación de QS, lo cual facilita su adaptación a diferentes nichos y condiciones. Se han descrito varios trabajos demostrando la frecuencia de alteraciones en *lasI* y *lasR*, o la falta del gen *lasR*

entre aislados clínicos y ambientales para favorecer su adaptación o persistencia (Feltner *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2018; Morales *et al.*, 2017). De hecho, las cepas con LasR no funcional han sido ampliamente descritas y relacionadas con la adaptación a infecciones crónicas, como la fibrosis quística, e incluso relacionadas con un empeoramiento de la progresión de la enfermedad tanto en infecciones crónicas, como agudas (Mould *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2018). De este modo, estos mutantes defectivos en *lasR* parecen ser “seleccionados” y presentan ventajas a la hora de sobrevivir en este tipo de ambientes de infección (Zhao *et al.*, 2023; Feltner *et al.*, 2016; Groleau *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2018; Scribner *et al.*, 2022). Sin embargo, en nuestro estudio este tipo de cepas se han encontrado en muestras de orígenes variados, no sólo clínico, si no alimentario o medioambiental, destacando el papel de este tipo de ambientes como reservorios de cepas con un elevado potencial para causar infecciones graves. El QS, además de su papel en la activación de diferentes factores relacionados con patogenicidad, también está relacionado con el control del metabolismo. De este modo, estudios de evolución experimental muestran que el aumento de las cepas LasR-negativo se ve afectado por el entorno nutricional, que podría hacer de seleccionador de este tipo de cepas (O’Connor *et al.*, 2022).

En este trabajo se han analizado otros de los parámetros relacionados con la patogenicidad de *P. aeruginosa*, como la producción de biofilm, la actividad elastasa, o la producción de pigmentos.

La producción de biofilm fue testada mediante cristal violeta y diacetato de fluoresceína con el fin de determinar la biomasa del biofilm y la actividad metabólica del mismo respectivamente. Las cepas de origen no clínico producían más biofilm que las de origen clínico, especialmente las aisladas en animales o alimentos, dato que difiere de otros estudios comparativos que proponen unos resultados similares entre ambos grupos (Selezska *et al.*, 2012). Además, dentro de las cepas procedentes de infecciones, cabe destacar las de origen urinario, con valores de producción de biofilm más altos, similares a las no clínicas, aunque en estudios previos, las cepas procedentes de muestras de orina mostraban una baja producción de biofilm (de Sousa *et al.*, 2023). El análisis del biofilm según el fenotipo de resistencia, muestra que hay una tendencia que, a mayor perfil de resistencia, menor producción de biofilm, como se describió en

estudios anteriores (Mulet *et al.*, 2013; Hou *et al.*, 2012; Gajdács *et al.*, 2021; Hadadi-Fishani *et al.*, 2020; Mahmoud *et al.*, 2022) o contrario a lo que proponen otros autores (Azimi *et al.*, 2019; Mallikarjuna & Dhanashree, 2023).

La regulación de la formación de biofilm se produce mediante QS, principalmente mediante el sistema Las (Li *et al.*, 2022). Sin embargo, las cepas con *lasR* no funcional presentaron valores mayores de producción de biofilm (estadísticamente significativos en el caso de la cuantificación con FDA). No obstante, la deficiencia de LasR no siempre se relaciona con el correspondiente fenotipo ya que el sistema Rhl puede tomar el control de algunos factores, y además hay otros sistemas de QS, como Pqs o IQS, y/o reguladores globales, como MvaT, RpoN y RpoS capaces de sustituir la función de LasR para regular algunos factores de virulencia (Lee & Zhang, 2015; Moradali *et al.*, 2017; Cornelis, 2020; Jurado-Martín *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022). Por otro lado, se ha descrito que las cepas defectivas para LasR son capaces de usar los compuestos y sustratos que producen las cepas de *P. aeruginosa* salvajes, como los autoinductores, por lo que se podría observar un fenotipo de virulencia (Köhler *et al.*, 2009; Vincent *et al.*, 2017). Por este proceso reciben el nombre de “cheaters o tramposas”.

Se analizó asimismo la producción de los pigmentos piocianina, piorrubina y pioverdina en todas las *P. aeruginosa* de este trabajo. Es destacable que las cepas de origen no clínico presentaron una producción de piocianina significativamente mayor que las clínicas, lo cual apoya los resultados observados en estudios previos (Shouman *et al.*, 2023); mientras que la producción de piorrubina fue similar en las cepas de ambos orígenes. Se detectó un elevado número de cepas entre las no clínicas, especialmente las de origen ambiental, que mostraron una producción elevada de ambos pigmentos, similar a lo propuesto en estudios previos de cepas medioambientales (Bel Hadj Ahmed *et al.*, 2019) derivado de las condiciones ambientales como el pH, la tensión de oxígeno, la temperatura o el estrés oxidativo. Por el contrario, una mayoría de cepas de origen respiratorio presentaron elevados niveles de producción de piorrubina (>120%), pero bajos de piocianina (<40%).

Además, como ocurría en el caso de la producción de biofilm, la producción de piocianina parece ser inversamente proporcional al nivel de resistencia, como se ha descrito previamente (Finlayson & Brown, 2011; Fuse *et al.*, 2013), aunque esta relación

no se observa en la producción de piorrubina. Por otro lado, si atendemos a la presencia de genes reguladores de QS, la producción de piocianina parece no verse afectada, pero la de piorrubina es significativamente mayor en aquellas cepas con *lasR/rhlR* no funcional.

En este contexto, hay estudios que han descrito valores elevados de producción de piocianina en cepas con el gen *lasR* no funcional, debido a un posible papel del 3-oxo-C12-HSL en la configuración de las respuestas de la comunidad, de manera que proporcione un posible beneficio evolutivo. La cepa *lasR*-negativa es capaz de capturar las sustancias beneficiosas secretados por las células LasR⁺ dentro de la misma población, entre ellas, la piocianina, sin asumir el coste de producir esos factores de virulencia (Feltner *et al.*, 2016; Scribner *et al.*, 2022; de Oliveira Pereira *et al.*, 2023). Este hecho podemos observarlo en las cepas del clon ST2068, aisladas de una muestra de agua termal y que presentan un comportamiento similar en la producción de biofilm, serotipo y el fenotipo de resistencia. Sin embargo, en el caso de producción de piocianina, la cepa que presenta el gen *lasR* truncado tiene una producción muy elevada en comparación con la que tiene el gen WT.

En cuanto a la actividad elastasa (actividad de la proteasa LasB) las cepas no clínicas poseen una actividad significativamente mayor que las clínicas, siendo las cepas de origen alimentario y medioambiental las que presentaron una mayor actividad. Además, como en otros parámetros, se observó una relación inversamente proporcional con el fenotipo de resistencia, y una tendencia, aunque no estadísticamente significativa, de mayor actividad en las cepas con el QS intacto, lo que podría justificarse por la regulación de la proteasa LasB que produce principalmente mediante el sistema Las (Li *et al.*, 2022).

Como último parámetro biológico relacionado con la virulencia en *P. aeruginosa*, se analizó la motilidad, concretamente los fenómenos de swarming y swimming, en todas las cepas de la colección. La motilidad bacteriana es una de las estrategias microbianas para colonizar y persistir en diferentes nichos. En nuestro estudio se ha observado en general una elevada motilidad, significativamente mayor en cepas no clínicas, destacando que todas las cepas ambientales presentaban una motilidad máxima (6400mm²) y que las cepas procedentes de orina resultaron las menos motiles.

Como en otros parámetros de virulencia y al igual que lo propuesto en la bibliografía, se observó que esta motilidad era menor cuanto mayor era el nivel de resistencia de las cepas (Mallikarjuna *et al.*, 2022), y, además, las cepas con el QS afuncional fueron significativamente menos motiles. Por otro lado, se han detectado 23 cepas con fenotipo inmóvil, destacando que 12 de ellas pertenecen a los CAR ST175, ST235 y ST973, lo que ya había sido observado por Mulet *et al.* (2013) en cuyo trabajo detectaron un fenotipo de motilidad swimming defectuoso en los clones de alto riesgo MDR/XDR.

Podríamos concluir que, de manera general, las cepas de origen no clínico presentan una mayor producción de factores de virulencia como son la producción de biofilm, pigmentos, actividad elastasa y motilidad. Además, la presencia de determinantes de resistencia parece disminuir la producción de estos factores, probablemente por motivos de fitness asociados a la adaptación a diferentes entornos. Del mismo modo, hay una cierta asociación entre el QS y la producción de estos factores de virulencia, si bien es cierto que no ocurre de igual manera en todos los parámetros, ya que mientras unos se ven disminuidos, otros parecen retroalimentarse de tal modo que incrementan su producción por encima de las cepas “salvajes”.

Este hecho cambia el paradigma de la adaptación de *P. aeruginosa* al entorno y permite describir un escenario mucho más abierto, considerando los estudios desde un prisma *One Health* más global y generalizado y no estudiando únicamente el perfil clínico.

2. Análisis de la resistencia a fluoroquinolonas: papel del gen *crpP* y los elementos integrativos y conjugativos móviles (ICEs)

El uso intensivo de fluoroquinolonas ha impulsado la selección y propagación de patógenos resistentes tanto en entornos hospitalarios como en el medioambiente. Por eso, en este estudio se evaluó la resistencia a fluoroquinolonas y los mecanismos genéticos implicados en 56 cepas de *P. aeruginosa* provenientes tanto de pacientes clínicos, como de individuos sanos, animales, agua y alimentos. El 56% de las cepas, incluidas las cepas de referencia PAO1 y PA14, fueron sensibles a todas las

fluoroquinolonas analizadas (ciprofloxacina, levofloxacina, norfloxacina y ofloxacina). Sin embargo, alrededor del 37% mostró resistencia a al menos una fluoroquinolona, con un 22% siendo resistentes a todas las probadas. Estos porcentajes superaron ligeramente las tasas de resistencia encontradas en aislados invasivos en España (18,1%) y Europa (18,9%) (ECDC, 2023).

Mediante la secuenciación de genoma completo de estas 56 cepas se estudió la presencia de mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas y el resistoma mutacional analizando las mutaciones cromosómicas en 23 genes implicados en las dianas de fluoroquinolonas o relacionados con bombas de expulsión.

En cuanto a los cambios detectados en la región QRDR de GyrA, ParC, GyrB y ParE se encontraron dos sustituciones diferentes en GyrA (S83I y D87N) y en ParE (H461D y A473V) y tres cambios en GyrB (S466A, S466F y I529V) y ParC (S87W, S87L y L95Q). Se detectó por primera vez la sustitución L95Q en ParC y fue en una cepa clínica resistente a fluoroquinolonas (con cambios también en GyrA y ParE). Ninguna *P. aeruginosa* sensible a fluoroquinolonas mostró cambios en la QRDR de GyrA o ParC, pero se observó una correlación entre el número de cambios en las proteínas GyrA y ParC y el nivel de resistencia a las fluoroquinolonas, como ya se había descrito previamente (Bruchmann *et al.*, 2013; van der Putten *et al.*, 2019; Rehman *et al.*, 2021). Estos resultados apoyan la importancia de las interacciones gen-gen en la resistencia a la ciprofloxacina en las que se ha demostrado cómo una sola mutación en GyrA aumenta la CMI, pero no llegaría a conferir un fenotipo de resistencia si no hay otro mecanismo adicional (Rehman *et al.*, 2021). La predicción de CMI de ciprofloxacina en las cepas con solo el cambio S83I en GyrA sería 1 µg/ml. En cambio, la presencia de otras mutaciones en GyrB, ParE, ParC o NfxB aumenta la CMI sólo si la mutación GyrA está previamente presente, como se ha observado en esta tesis. Sin embargo, en nuestro trabajo también hemos encontrado tres cepas resistentes a ciprofloxacina (G150, G261, G262) sin mutaciones en GyrA y ParC; y las 9 cepas que muestran un amplio rango de CMI de ciprofloxacina (CMI 8-128 mg/ml) aunque albergaban las mismas sustituciones de aminoácidos (T83I en GyrA y S83L en ParC). La presencia de bombas de expulsión o mutaciones que afecten a otros genes reguladores han explicado estas situaciones en esta tesis.

La sobreexpresión de bombas de expulsión juega un papel destacado en la resistencia a múltiples fármacos de *P. aeruginosa*, incluidas las fluoroquinolonas. La sobreexpresión de bombas de expulsión se observó en las 38 cepas (68%) que redujeron la CMI de ciprofloxacina en más de dos veces en presencia de PA β N. Esta sobreexpresión de las bombas de expulsión generalmente se relaciona con la pérdida de función de genes represores (*mexR*, *nalC*, *nalD*, *nfxB*, *mexS*, *mvaT* y *mexZ*) o la ganancia de función de genes activadores (*mexT*) (Rehman *et al.*, 2019; Bruchmann *et al.*, 2013).

El resistoma mutacional de los genes implicados en las bombas de expulsión MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, y MexXY-OprM de *P. aeruginosa* y sus reguladores y activadores se analizó en las 59 cepas de nuestro estudio. Se observaron mutaciones no sinónimas, deleciones o inserciones en todos los genes. Sin embargo, muchas de estas variaciones se clasificaron como polimorfismos (Cortes-Lara *et al.*, 2021) o ya habían sido previamente descritas como no relacionadas con la resistencia a fluoroquinolonas, como los cambios V126E en MexR o G71E y S209R en NalC (Choudhury *et al.*, 2015; Horna *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2016; Suresh *et al.*, 2018). No se encontraron mutaciones previamente descritas que implicaran una actividad deficiente de NfxB o MexS o sobreexpresión de las bombas MexCD-OprJ y MexEF-OprN y relacionadas con altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas (Cortes-Lara *et al.*, 2021; Richardot *et al.*, 2015, 2016; Xu *et al.*, 2021). Respecto a las nueve cepas con las dos sustituciones en las dianas GyrA y ParC citadas anteriormente, se encontró que las cuatro cepas (G268, G269, G270, PA7) con las CMI más elevadas de ciprofloxacina mostraron codones de stop prematuros o deleciones en *mexZ* (represor de MexXY-OprM), y las cinco cepas restantes, a excepción de la cepa G157, (G265, G271, G272, G273) mostraron codones de stop prematuros o deleciones en *nalD* (represor de MexAB-OprM). Esas mutaciones darían lugar a proteínas defectuosas que no actuarían como represores. Estas bombas de expulsión se expresan constitutivamente en las cepas de tipo salvaje, pero la pérdida de función de los represores MexZ y NalD conduce a una sobreexpresión de las mismas, y contribuye a la resistencia clínica a las fluoroquinolonas (López-Causapé *et al.*, 2018; Sobel *et al.*, 2005).

Por otro lado, la cepa clínica G157 que redujo >233 veces la CMI de ciprofloxacina en presencia de PA β N, carecía de los genes *mexX*, *mexY* y *mexZ*. PA β N es un inhibidor

de bombas de expulsión de amplio espectro, pero también se ha descrito su actividad de permeabilización de la membrana a una concentración ≥ 16 mg/L en *P. aeruginosa*, siendo especialmente relevante en cepas deficientes en bombas de expulsión (Iino *et al.*, 2012; Lamers *et al.*, 2013; Lomovskaya *et al.*, 2001). La deficiencia de la bomba de expulsión MexXY relacionada con la capacidad de PA β N para permeabilizar las membranas podría explicar la reducción de la sensibilidad a ciprofloxacina en la cepa G157 y, hasta donde sabemos, esta es la primera detección de la capacidad permeabilizadora de PA β N en una cepa clínica de *P. aeruginosa* (no de laboratorio).

La presencia del gen *crpP* también se testó en este trabajo, encontrándose en el 73% de las cepas. Este porcentaje de presencia de *crpP* fue mayor que los obtenidos en estudios previos realizados con *P. aeruginosa* de origen clínico en Portugal (60%) (Hernández-García *et al.*, 2021), en India y Australia (63%) (Khan *et al.*, 2020) en Francia y Suiza (46%) (Ortiz de La Rosa *et al.*, 2020) o en China (25–54%) (Zhu *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2021b), pero inferiores a los descritos previamente en cepas clínicas de *P. aeruginosa* de España (85%) (Hernández-García *et al.*, 2021). En nuestro estudio se detectaron siete variantes diferentes de CrpP todas descritas previamente (Hernández-García *et al.*, 2021; Ruiz, 2019; Zhu *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2021b), excepto la variante CrpP-7, que se ha descrito por primera vez en este estudio.

Desde que se identificó por primera vez CrpP en México en 2018 (Chávez-Jacobo *et al.*, 2018), se han reportado más de 37 variantes en *Pseudomonas spp.* en al menos 16 países diferentes (Hernández-García *et al.*, 2021; Ruiz, 2019; Zhu *et al.*, 2021). Sin embargo, la presencia de *crpP* no siempre se asocia con resistencia. En esta tesis, casi la mitad de las cepas *crpP*-positivas (49%) fueron sensibles a todas las fluoroquinolonas analizadas. Lo cual concuerda con lo reportado en otros estudios (Hernández-García *et al.*, 2021; Khan *et al.*, 2020; Ortiz de La Rosa *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2021a, Xu *et al.*, 2021b), destacando un estudio donde rigurosos resultados experimentales evidenciaron que CrpP no es una enzima modificadora de ciprofloxacina ni confiere resistencia clínica a las fluoroquinolonas (Zubyk & Wright, 2021).

Independientemente del impacto sobre la sensibilidad a las fluoroquinolonas, se ha observado una amplia diseminación global de *crpP*, no sólo en *Pseudomonas spp.*, sino también en otras bacterias Gram-negativas en todo el mundo (Chávez-Jacobo *et al.*,

2019; Ruiz, 2019; Botelho *et al.*, 2020). Aunque inicialmente se identificó en el plásmido conjugativo pUM505 (Chávez-Jacobo *et al.*, 2018), las ICEs han sido identificadas como los principales reservorios del gen *crpP* en *P. aeruginosa* (Hernández-García *et al.*, 2021, Zhu *et al.*, 2021; Botelho *et al.*, 2020). Estas ICEs, además de contener el gen *crpP*, portan genes que codifican factores de virulencia o que están involucrados en la resistencia a metales pesados que pueden propagarse entre bacterias de diferentes entornos. El análisis de la localización genética de *crpP* en las cepas de *P. aeruginosa* de este trabajo reveló que este gen se ubicaba en ICEs en todas las cepas, siguiendo una estructura similar a la descrita previamente (Ortiz de La Rosa *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2021; Botelho *et al.*, 2020). Estos *crpP*-ICE se integraron siempre adyacentes a tRNAs en puntos específicos del genoma, denominados “hot-spots” (Khaledi *et al.*, 2020; Botelho *et al.*, 2020). Estos puntos de inserción se consideran regiones de plasticidad del genoma (Klockgether *et al.*, 2011) y son reconocidos específicamente por las integrasas XerC/XerD, presentes en estas ICEs (Klockgether *et al.*, 2011).

Entre las 43 cepas que contenían el gen *crpP* se detectaron 23 ICEs diferentes, cuya estructura estaba constituida por una parte conservada y otra variable. La región conservada contenía al gen *crpP*, el operón *pil*, entre otros, mientras que en la parte variable se detectó una gran versatilidad que incluía, entre otros: diferentes secuencias de inserción, los genes *cup*, el operon *mer* de resistencia a mercurio o bacterocinas como la piocina S5 o la S8.

La presencia de este arsenal de genes, junto con la capacidad de movilización de las ICEs pone de relieve el papel de estas *crpP*-ICEs en la diseminación de mecanismos de resistencia y virulencia que potenciarían la adaptación a diferentes nichos, incluido el ambiente hospitalario, tanto en *Pseudomonas spp.* como en otros géneros relevantes a los que podría expandirse.

3. Análisis del clon ST274

P. aeruginosa infecta los pulmones de pacientes con fibrosis quística (FQ), transitando desde la adquisición intermitente de cepas ambientales hasta una adaptación genética y fenotípica al entorno pulmonar. En la transición de patógeno pulmonar "agudo" a "crónico" en FQ, se observa la regulación negativa de factores de virulencia, morfotipo mucoide, incremento en la formación de biofilm y regulación positiva de la expresión de exopolisacáridos, acompañados de la reducción de vías de detección de quórum sensing. Una vez que se alcanza esta fase crónica, erradicar *P. aeruginosa* resulta prácticamente imposible (Malhotra *et al.*, 2019; Lozano *et al.*, 2018; Mauch *et al.*, 2018; Gabrielaite *et al.*, 2020).

No obstante, aunque se ha detectado una alta diversidad genética entre los aislados que infectan a pacientes con FQ (López-Causapé *et al.*, 2017), el clon ST274 se ha identificado junto con ST395 como clones endémicos en España, y, como epidémico en pacientes con FQ de Europa, América, Asia y Australia (López-Causapé *et al.*, 2017; Nageeb *et al.*, 2021; Ocampo-Sosa *et al.*, 2015; Fernández-Olmos *et al.*, 2013; Cortes-Lara *et al.*, 2021; Kos *et al.*, 2015; Bocharova *et al.*, 2021; Van Mansfeld *et al.*, 2009; Mitchelmore *et al.*, 2017). Por esta razón, la mayoría de los trabajos sobre ST274 se han llevado a cabo con cepas de origen clínico. Sin embargo, la investigación sobre *P. aeruginosa* del ST274, incluyendo origen, resistencia a antibióticos, virulencia, patogenicidad, tipificación molecular o adaptabilidad ambiental/infecciosa, es necesaria para conocer los marcadores moleculares y las características biológicas que podrían explicar el éxito clonal del clon ST274. Además, la evaluación de los marcadores genéticos y biológicos que subyacen al éxito clonal debe realizarse no sólo en una variedad de cepas resistentes y susceptibles, sino también en cepas clínicas y no clínicas. Por ello, en este trabajo, se incluyeron 11 cepas *P. aeruginosa* ST274, 5 de origen clínico y 6 no clínico.

Nueve fueron sensibles a todos los antibióticos testados (82%), una cepa resultó modR (9%) y la cepa restante fue XDR/ DTR (9%). Los clones de alto riesgo como el ST235, ST175 y ST111 suelen estar asociados con cepas clínicas MDR/XDR; sin embargo, como muestran nuestros resultados, y de acuerdo con estudios previos (Torres *et al.*, 2022;

Díaz Caballero *et al.*, 2023), estos fenotipos de resistencia no son tan frecuentes entre las cepas de *P. aeruginosa* no clínicas o pertenecientes al ST274.

La única cepa XDR/DTR (G179) de este estudio provenía de un hemocultivo, hiperproducía AmpC y poseía un resistoma mutacional diferente en comparación al resto de cepas ST274 estudiadas, mostrando cambios aminoacídicos que afectaban a las porinas y proteínas de membrana, a la expresión de bombas de expulsión de múltiples fármacos, a la biosíntesis del antígeno O, a dianas de quinolonas y a reguladores (tales como OprD, DacB/PBP4, GyrB, CapD, MexT, MexS, RpoC y RpoN), que probablemente explican el patrón de resistencia observado. Entre ellas, RpoN regula la asimilación de nitrógeno, la detección de quórum, la motilidad, la formación de biofilm y otros factores de virulencia, además de que su regulación también se ha relacionado con la tolerancia de *P. aeruginosa* a varios antibióticos (Lloyd *et al.*, 2019; Viducic *et al.*, 2007). La inserción de cuatro aminoácidos en RpoN de la cepa G179 probablemente indujo una pérdida parcial o total de la función de RpoN, que es un mecanismo relativamente común de patoadaptación al pulmón con FQ (Winstanley *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2006). Esta cepa también se clasificó como DTR, en referencia a la resistencia a todos los antibióticos de primera línea, incluidos los β -lactámicos y las fluoroquinolonas y que se asocia con una mayor mortalidad (Kadri *et al.*, 2018; Tamma *et al.*, 2022). Según las directrices internacionales (Tamma *et al.*, 2022), se recomienda el uso de ceftolozano-tazobactam, ceftazidima-avibactam o imipenem-relebactam para el tratamiento de DTR *P. aeruginosa*, a cuyos agentes fue sensible la cepa DTR G179.

Durante el proceso de infección, *P. aeruginosa* tiene que adaptarse a un nuevo escenario que incluye la respuesta inmune del huésped, antibióticos y un entorno y composición de sustrato diferentes. Existen múltiples referencias que analizan los procesos adaptativos de *P. aeruginosa* y comúnmente se observa la disminución gradual o pérdida de la función de muchos genes, generalmente asociada con el quórum bacteriano y la patogenicidad (Malhotra *et al.*, 2019; Lozano *et al.*, 2018; Smith *et al.*, 2006; Camus *et al.*, 2021; D'Argenio *et al.*, 2007). La colonización persistente y la infección crónica se asocian con la pérdida de función de muchos genes, con el desarrollo de resistencias antimicrobianas, pérdida de antígeno O, producción de biofilm y pérdida de factores de motilidad y virulencia (Malhotra *et al.*, 2019; Lozano *et*

al., 2018; Smith *et al.*, 2006; Camus *et al.*, 2021; D'Argenio *et al.*, 2007). Entre las 11 cepas analizadas del clon ST274, se observó un fenotipo de infección crónica en las cepas XDR, modR y la cepa con el gen *lasR* truncado, caracterizadas por la pérdida de antigenicidad específica del serotipo y baja motilidad. Además, las cepas XDR y modR presentaron baja producción de pigmentos y la producción de biofilm reducida. La proteína LasR mostró el cambio C79Y en la cepa modR; mientras que en la cepa con *lasR* truncada, aislada de un aspirado bronquial de un paciente con bronquitis crónica, el *lasR* estaba truncado por el elemento IS*Psp7*. Se observa con frecuencia que *P. aeruginosa* adquiere mutaciones en el gen *lasR* durante infecciones crónicas, incluidas las infecciones pulmonares crónicas por FQ (Kostylev *et al.*, 2019; Feltner *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2006), pero se ha detectado una alta prevalencia de *P. aeruginosa* con *lasR* defectuoso no solo en cepas clínicas, sino también de orígenes no clínicos (Vincent *et al.*, 2017; Ruiz-Roldan *et al.*, 2021). Este hecho podría sugerir que la pérdida de función de LasR brinda una ventaja patogénica selectiva y minimiza el “fitness cost” bacteriano incluso fuera del contexto clínico. Además, existen múltiples estudios de evolución que analizan el efecto *in vitro* e *in vivo* de los mutantes *lasR* y han detectado que incluso el ambiente nutricional es suficiente para seleccionar esos mutantes, y no todos implican un fenotipo LasR defectuoso (Feltner *et al.*, 2016; Groleau *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2018; Scribner *et al.*, 2022). Por lo tanto, los mutantes de *lasR* no son atípicos ni están restringidos a aislados clínicos y, además, la pérdida de *lasR* podría compensarse con otros sistemas interactivos de detección de quórum y/o reguladores globales, como MvaT, RpoN y RpoS.

Al comparar el genoma completo de las 25 *P. aeruginosa* ST274 observamos que no se detectaron los genes *vqsM* y *pldA/tleS* en ninguna de ellas. VqsM es un regulador transcripcional de la familia AraC que activa el sistema de detección de quórum *las* y la expresión del T3SS (Williams McMackin *et al.*, 2019). El gen *pldA/tleS* codifica una fosfolipasa D1 implicada en la patogénesis y persistencia bacteriana (Wilderman *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha descrito previamente que no todas las cepas de *P. aeruginosa* portan estos genes por lo que sus contribuciones a la infección parecen ser específicas de cada cepa (Williams McMackin *et al.*, 2019; Wilderman *et al.*, 2001).

Según el análisis filogenético del genoma core, todos los genomas de *P. aeruginosa* ST274 analizados aparecen intercalados y agrupados en dos clados filogenéticos independientemente de su origen o resistencia a los antimicrobianos, apoyando la idea de la ausencia de una barrera geográfica o de origen para la evolución del linaje.

La variación del genoma core entre los diferentes clones de *P. aeruginosa* es baja (Smith *et al.*, 2005). De hecho, los grupos de genes con el mayor nivel de diversidad son el locus de pioverdina, el regulón flagelar, los genes de biosíntesis de T4P, las proteínas efectoras de T3SS y el locus de biosíntesis del antígeno O. Cada grupo está presente en todas las cepas, pero los genes involucrados son muy diferentes entre las cepas. Este fenómeno podría ser el resultado de una “selección diversificada”, un tipo de selección que mantiene múltiples alelos en la población (Smith *et al.*, 2005). En esta línea, los genes implicados en los flagelos en las cepas estudiadas en este trabajo estaban en su mayoría altamente conservados y homólogos entre todas las cepas del clon ST274; sin embargo, los genes de biosíntesis de T4P y de los sideróforos (pioverdina y pioquelina) fueron muy divergentes en comparación con los de PAO1. En *P. aeruginosa*, las T4P están compuestas por una única pilina de tipo IVa (T4aP) codificada por el gen *pilA*, para la cual se han descrito cinco alelos de pilina distintos en *P. aeruginosa* (Grupos I-V) (Kus *et al.*, 2004; Burrows, 2012). La pilina de la cepa de referencia PAO1 es del grupo II, la de PA14 es del grupo III y todas las cepas ST274 de nuestro estudio presentaron la del grupo V. Las pilinas de los grupos III y V tienen una arquitectura inusual y divergen de un ancestro común (Kus *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2010). Las pilinas de los grupos I y II son las detectadas con mayor frecuencia en cepas de *P. aeruginosa* (Kus *et al.*, 2004; Asikyan *et al.*, 2008; Horna *et al.*, 2019), y entre las escasas descripciones en los aislados que albergan una pilina del grupo V no se han detectado diferencias específicas (Kus *et al.*, 2004; Horna *et al.*, 2019). Las pilinas 'menores' son un conjunto de proteínas similares a pilinas de baja abundancia codificadas por el grupo de genes *fimU/T/pilV/W/X/Y1/Y2/E* que en todas las cepas ST274 no se detectó en comparación con la secuencia PAO1, tal y como se describió previamente en otros trabajos (Kiyaga *et al.*, 2022). Sin embargo, también se ha descrito que los grupos III y V tienen genes de pilina menores idénticos, con una similitud menor al 75% con el operón del grupo II (Giltner *et al.*, 2010; Asikyan

et al., 2008]. Además, el tándem de tRNA ubicados entre los operones de las pilinas mayor y menor parecen proporcionar puntos calientes para la inserción genética. Esta información, junto con el hecho de que algunas pilinas de *P. aeruginosa* están más estrechamente relacionadas con pilinas de distintas especies bacterianas (p. ej., *Dichelobacter nodosus*, *Eikenella corrodens*, *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas campestris*) sugieren que la diversidad genética de las pilinas se generó a través de transferencia genética horizontal (Kus *et al.*, 2008; Kung *et al.*, 2010). Estudios adicionales podrían determinar la posible relación entre los diferentes grupos de pilinas, la motilidad y las características específicas de cada cepa.

En general, cada cepa de *P. aeruginosa* es capaz de producir uno de los tres tipos de pioverdina descritos (Meyer *et al.*, 1997; Cornelis *et al.*, 1989), y al analizar los 25 genomas de *P. aeruginosa* ST274 se observó que todos ellos presentaban la pioverdina de clase II (*fvpA_{II}*). El gen que codifica para el receptor de ferripioverdina, *fvpA*, es uno de los genes más divergentes del genoma de *P. aeruginosa*. Este tipo de receptores de membrana suele ser una vía de entrada común de fagos y/o piocinas. Las piocinas son bacteriocinas producidas por *P. aeruginosa* que matan cepas de la misma especie. Este es el caso de la piocina S3 que usa FpvAII como receptor, mientras que la piocina S5 formadora de poros utiliza el receptor de ferripioquelina FptA para ingresar a las células y matarlas (Baysse *et al.*, 1999; Behrens *et al.*, 2020). De hecho, las piocinas podrían desempeñar un papel particularmente importante durante la co-colonización del pulmón en pacientes con FQ por aislados de *P. aeruginosa* que poseen diferentes genes de piocina/inmunidad y favorecen la competencia de un clon particular de *P. aeruginosa*. Por tanto, la diversidad de sideróforos puede favorecer la persistencia de un clon particular además de ser también un mecanismo de resistencia frente a determinados fagos.

En resumen, en este capítulo se obtuvo información sobre la estructura poblacional de cepas de *P. aeruginosa* ST274 utilizando una combinación de técnicas de fenotipado y genotipado, y se han detectado ciertas asociaciones, como la presencia de los genes *bla_{OXA-486}* y *bla_{PDC-24}*, serotipo O:3, genotipo *exoS⁺/exoU⁻* del T3SS, Grupo V de T4P y locus de pyoverdina clase II. También se han observado otros marcadores o características moleculares generales vinculados a las cepas del clon ST274 analizado,

destacando la ausencia de los genes *vqsM* y *pldA/tleS* y la presencia del mismo patrón mutacional en genes implicados, por ejemplo, en los sistemas sensor-regulador de dos componentes PmrAB (sustituciones L71R y Y345H, respectivamente) y CreBD (E128G y A397V, respectivamente); la exotoxina A (deleciones A58 o G386 en ToxA); el quórum sensing RhII (S62G, D83E); el regulador de expresión de β -lactamasa AmpD (R11L, G148A, D183Y); la proteína transportadora de penicilina 1A (A615_D616insP); o el factor de alargamiento G FusA2 (G695A).

Los análisis de la secuencia del genoma completo proporcionan patrones genómicos detallados que podrían ser esenciales para caracterizar cepas de *P. aeruginosa* ST274; aunque es difícil y desafiante correlacionar las variaciones genotípicas con las fenotípicas. La secuenciación por sí sola no siempre puede predecir las diferencias fenotípicas, debido a la naturaleza multifactorial de *P. aeruginosa*. Entre las limitaciones de este estudio se deben considerar el reducido número de cepas y la variabilidad intraclonal de los parámetros analizados. Esta variabilidad podría estar relacionada con la activación de vías reguladoras específicas, ganancia o pérdida horizontal de material genético, o con mutaciones puntuales no detectadas que afectan los niveles de expresión final de genes clave.

Es necesario seguir trabajando para mejorar nuestra comprensión de las bases del éxito global de este y otros clones de alto riesgo. Una comprensión más profunda de la regulación de la virulencia de *Pseudomonas*, así como el uso de la transcriptómica de *P. aeruginosa*, permitiría identificar cientos de genes expresados específicamente *in vitro* o durante la adaptación a diferentes entornos. Sin embargo, este estudio podría servir como base para estudios más específicos que resulten útiles en el diseño de nuevos enfoques antimicrobianos, una mejor administración de los antibióticos y nuevos desarrollos terapéuticos.

4. Análisis comparativo de tres Clones de Alto Riesgo

P. aeruginosa presenta, en general, una notable diversidad clonal, con la mayoría de los aislamientos representados por genotipos únicos, como hemos visto en el capítulo 1 de esta tesis. Sin embargo, existen algunos clones particularmente comunes entre los aislados clínicos MDR/XDR, ampliamente diseminadas a nivel internacional y que se denominan CAR (Woodford *et al.*, 2011; Pelegrin *et al.*, 2021; del Barrio-Tofiño *et al.* 2020; Oliver *et al.*, 2024). Los CAR de *P. aeruginosa* incluyen cepas particularmente preocupantes debido a su capacidad para causar infecciones graves, su facilidad para acumular resistencias y su amplia distribución a nivel mundial, particularmente en el entorno hospitalario. Su presencia plantea desafíos, ya que suelen exhibir una mayor virulencia y una capacidad adaptativa que contribuye a su persistencia en entornos hospitalarios (Sánchez-Diener *et al.*, 2017; del Barrio-Tofiño *et al.*, 2020; Recio *et al.*, 2020; Oliver *et al.*, 2024). Conocer las razones del éxito de estos clones es importante para abordar estrategias en el tratamiento y control de las infecciones (Baquero *et al.*, 2011).

Los diez principales CAR de *P. aeruginosa* a nivel mundial, por orden de relevancia, son ST235, ST111, ST233, ST244, ST357, ST308, ST175, ST277, ST654 y ST298 (del Barrio-Tofiño *et al.*, 2020; Sastre-Femenia *et al.*, 2023). En esta tesis se decidió analizar y comparar las características biológicas y genómicas del clon ST235, que es el CAR más relevante a nivel mundial; el clon ST175, como CAR especialmente diseminado en España (Cabot *et al.*, 2016, del Barrio-Tofiño *et al.*, 2020, Yoon & Jeong, 2021) y el clon ST973, como clon endémico persistente en un hospital concreto (del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza) (Bellés *et al.*, 2018).

En este contexto, se decidió analizar todas las cepas de la colección de esta tesis resistentes a imipenem y pertenecientes a estos tres CAR, lo que incluyó un total de 25 cepas pertenecientes al ST235, 9 al ST175 y 8 al ST973, todos ellos de origen clínico.

El ST235 muestra una difusión mundial, encontrándose descripciones en países de los cinco continentes, no sólo en Europa (España, Grecia, Croacia, Bélgica, Portugal, etc), sino también en Japón, Rusia, Tailandia, EEUU o Brasil, entre otros (Kocsis *et al.*, 2021; Oliver *et al.*, 2024). Las 25 cepas pertenecientes al ST235 de nuestro trabajo aglutinaron mayoritariamente con el serotipo O:11 (32% de las cepas), aunque también

se encontraron los serotipos O:12, O:4 ó O:9, así como cepas no tipables; sin embargo, presentaban un serotipo O:11 empleando la herramienta PAST en el análisis bioinformático con los genomas, similar a lo descrito anteriormente para este CAR (del Barrio-Tofiño *et al.*, 2020). La mayoría de las cepas pertenecientes a este CAR presentaron un fenotipo MDR (72%), detectándose también cepas XDR (16%) y modR (12%); destacando que además de la resistencia a imipenem, más del 80% de las cepas eran resistentes a meropenem, doripenem, gentamicina, tobramicina y ciprofloxacina. Este CAR se ha asociado con más de 60 variantes diferentes de β -lactamasas, incluidas múltiples carbapenemasas de las clases A y B. De hecho, la asociación de ST235 con determinantes de resistencia adquiridos horizontalmente, incluidos en integrones, transposones y plásmidos, es abrumadora. Entre los genes codificantes de β -lactamasas que portan se encuentran: *bla*_{PER-1}, *bla*_{PSE-1}, *bla*_{GES-1}, *bla*_{GES-5}, *bla*_{GES-6}, *bla*_{GES-9}, *bla*_{GES-19}, *bla*_{BEL-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{KPC-2}, diferentes variantes de *bla*_{OXA} y genes codificantes de múltiples metalo- β -lactamasas como *bla*_{FIM-1}, *bla*_{IMP-2}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-4}, *bla*_{IMP-6}, *bla*_{IMP-7}, *bla*_{IMP-26}, *bla*_{IMP-31}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{VIM-4}, *bla*_{VIM-11} o *bla*_{VIM-47}, entre otras. Además, también se ha detectado este clon portando *bla*_{NDM-1} (Oliver *et al.*, 2015; Oliver *et al.*, 2024, Kocsis *et al.*, 2021, Kabic *et al.*, 2023). De todos éstos, *bla*_{VIM-2} ha sido catalogado por Pérez-Vázquez *et al.*, 2020 como de alta prevalencia en España siendo el más frecuente también en nuestro estudio, en el que entre las 19 cepas portadoras de carbapenemasas (76%), 18 portaban el gen *bla*_{VIM-2} y una el gen *bla*_{GES-5}.

Las cepas ST235 resultaron las más diversas en cuanto a genes adquiridos, todas ellas contenían *bla*_{PDC-35} y *bla*_{OXA-488}, *aphA-IIb*, *fosA1*, *catB7*, *qacE Δ 1* y *sul1*, y además, algunas de ellas contenían otros genes como *aacC1e*, *aacA4*, *aadA1b* o *aphA15*, entre otros, como previamente se ha reportado en otros trabajos (Treepong *et al.*, 2018). En cuanto al resistoma mutacional, todas presentaron el mismo patrón, con cambios en GyrA y ParC (T83I y S87L, respectivamente), MexB (G957D, S1041E, V1042A), MexR (V126E), NalC (G71E, Q153E, S209R), MexE (E2V, S8F, Q368R) o MexZ (L127Fs), entre otros. En el caso de la porina OprD, presentaron diferentes codones stop prematuros o secuencias de inserción y deleciones que truncaban o alteraban la proteína. Todos estos cambios están involucrados en resistencia, parecen ser característicos de este ST235, y

han sido detectados previamente en cepas de dicho CAR (Recio *et al.*, 2021; Treepong *et al.*, 2018).

Este CAR se caracteriza, además, por presentar una elevada virulencia y causar mayor mortalidad que la de otros CAR asociado no solo a su fenotipo de resistencia a antibióticos sino a la presencia del gen *exoU* (Recio *et al.*, 2020; Fischer *et al.*, 2020; Peña *et al.*, 2015), presente también en todas nuestras cepas ST235. Este CAR se ha caracterizado por presentar una producción media/baja de biofilm, pigmentos y elastasa, además de baja motilidad. Esta asociación de pigmentos y motilidad defectiva en ST235 también se describió previamente (Mulet *et al.*, 2013; Fischer *et al.*, 2020). En esta tesis se ha observado además que las cepas ST235 portan el cluster de pioverdina de clase II y el *pilA* del grupo 2 (*pilA_{II}*).

El clon ST235 se asocia con diseminación epidémica, fenotipos MDR/XDR, resistencia adquirida horizontalmente, mayor virulencia, pigmentos y motilidad defectiva, además de otros genotipos específicos que contribuyen al éxito de este clon a nivel global.

Otro de los CAR analizados en profundidad en esta tesis ha sido el ST175. Este clon es particularmente frecuente en Europa, especialmente en España y Francia. De hecho, es, con diferencia, el CAR más prevalente en España, representando entre el 40% y el 80% de todos los aislados XDR encontrados en diferentes estudios multicéntricos (Kocsis *et al.*, 2021; Viedma *et al.*, 2012, del Barrio-Tofiño *et al.*, 2017). Sin embargo, en España en los últimos años (2017-2022) se está imponiendo el clon ST235 (Sastre-Femenia *et al.*, 2023). El CAR ST175 está asociado con el serotipo O:4 (Recio *et al.*, 2020; del Barrio-Tofiño *et al.*, 2020), y así se detectó en las cepas ST175 de esta tesis mediante serotipado *in silico*; mientras que por aglutinación el 56% de las cepas era O:4 y el resto no tipables. Entre las 9 cepas estudiadas, 8 eran MDR (89%) y una XDR (11%). Además de la resistencia a imipenem, la mayoría de las cepas resultaron resistentes a meropenem, gentamicina, tobramicina y ciprofloxacina, destacando que todas eran sensibles a amikacina y netilmicina, y todas excepto dos (78%) sensibles a aztreonam, ceftazidima y piperacilina-tazobactam. Entre los genes adquiridos en estas cepas ST175, se incluyen *bla_{PDC-1}* y *bla_{OXA-50}*, además de los genes *aphA-IIb*, *aadB*, *catB7*, y *crpP-2*. Así mismo, este clon ST175, está estrechamente relacionado con una combinación de

mutaciones específicas que incluyen cambios en AmpR (G154R) que lleva a la sobreexpresión de AmpC, una mutación inactivante en OprD (Q142X), una mutación en MexZ (G195E) asociado con la sobreexpresión de MexXY y tres cambios en las regiones QRDR (GyrA T83I y D87N y ParC S87W) implicados en la resistencia a fluoroquinolonas (del Barrio-Tofiño *et al.*, 2020; Kocsis *et al.*, 2021), todos ellos detectados también en nuestras cepas. Además, la adquisición de genes de resistencia a carbapenemasas, particularmente las enzimas GES y VIM, también se han documentado en ST175. En nuestro estudio, tres de las cepas (33%) poseían la metalo- β -lactamasa VIM, siendo dos de ellas codificadas por el gen *bla*_{VIM-2} y la otra *bla*_{VIM-20}, esta última detectada en un integrón asociada a otros genes como *bla*_{OXA-2}. La presencia de este tipo de elementos debe ponernos en alerta y ser controlada porque concretamente en 2019 se identificó en España un caso clínico en el que de un mismo paciente se aisló una *P. aeruginosa* ST175 MDR con un integrón portando *bla*_{VIM-20} y *bla*_{OXA-2} y que tras tratamiento con agentes antipseudomónicos se aisló otra *P. aeruginosa* ST175 MDR con *bla*_{VIM-20} y *bla*_{OXA-681} en un integrón de clase 1 localizado en un plásmido (Arca-Suarez *et al.*, 2019). OXA-681 es una variante de OXA-2 capaz de hidrolizar cefalosporinas, incluido el ceftolozano, e induce resistencia cruzada a ceftolozano-tazobactam y ceftazidima-avibactam, pudiendo causar graves problemas clínicos, reduciendo el efecto de las nuevas combinaciones de agentes antipseudomónicos recomendadas para el tratamiento de infecciones MDR por *P. aeruginosa* (Kocsis *et al.*, 2021).

Este CAR muestra un genotipo de virulencia *exoS*⁺ /*exoU*⁻; así como pioverdina de clase I y el *pilA* del grupo 1 (*pilA*₁) encontrado en las 9 cepas ST175, de nuestro trabajo. En general la producción de biofilm, elastasa y pigmentos en las cepas ST175 es baja, aunque presentan una producción mayor de piorrubina y pioverdina que los otros CAR (aunque no es estadísticamente significativo), que puede estar asociada a la presencia de un sistema *rhl* defectivo (Allydice-Francis & Brown, 2012,). Así, aunque uno de los rasgos más característicos de *P. aeruginosa* es la producción de pigmentos, se ha descrito que los CAR están asociados con producción de pigmentos baja, así como motilidad defectiva (Mulet *et al.*, 2013). En el caso de la producción de biofilm, las cepas pertenecientes al ST175 presentan una baja producción, incluso menor que los otros CAR analizados (aunque no estadísticamente significativo). Este dato contrasta con lo

descrito por Mulet *et al.*, 2013. En cuyo trabajo detectan una elevada formación de biofilm en los CAR, especialmente para ST175 y ST111. Otros trabajos, en cambio también detectan una producción moderada-baja de biofilm en ST175 (Silva *et al.*, 2023). Dado que la formación de biofilm es una de las estrategias que tiene *P. aeruginosa* para colonizar casi todo tipo de entornos, y al hilo de lo descrito en el primer punto de esta tesis, puede que el origen de las cepas influya la cantidad de biofilm que producen, y en este aspecto, todas las cepas del trabajo de Mulet *et al.*, 2013 son aisladas de bacteriemias, mientras que las de nuestro trabajo proceden de orina y respiratorio, dos de los orígenes clínicos que presentaron mayor producción de biofilm (resultados-del capítulo 1).

El análisis del virulotipo del ST175 puso de manifiesto que todas nuestras cepas carecían de los genes *rhlI* y *rhlR*. En concreto carecían de la región completa del *rhl* desde la etiqueta PA3472 hasta PA3480 (según PAO1) incluyendo los genes *pheC*, *rhl*, *rhlR*, *rhlB* y *rhlA*. El análisis se amplió con 101 genomas más de las bases de datos, incluyendo así en el análisis un total de 109 genomas. Se detectó que esta región sólo estaba presente en 3 de las 109 *P. aeruginosa* ST175 cepas analizadas, entre ellas, la más antigua en las bases de datos, recogida en 1995 en EEUU (van Belkum *et al.*, 2015). En su lugar, aparece una secuencia de lectura abierta de 468 pb con un 46% de identidad con respecto al gen codificante de MadN (PA3474), una enzima málica dependiente de NAD. Esta es la primera descripción de ausencia del sistema de QS *rhl* en el clon ST175. Siendo las cepas más antiguas las únicas en las se ha detectado este sistema de QS, podría considerarse que se trate de una estrategia de evolución que ha aportado ventajas a este complejo clonal para su adaptación y persistencia. El sistema de QS *rhl* parece regular la producción de elastasa, tensioactivos ramnolípidos y el metabolito secundario tóxico piocianina. Sin embargo, y a diferencia de *lasR*, cuya deficiencia parece aportar una ventaja en la infección crónica, la presencia de mutaciones defectivas en *rhlR* es poco común (Mukherjee *et al.*, 2017). Por tanto, este hallazgo abre una vía de estudio que determine el posible papel de la pérdida de este sistema de QS en el éxito de este ST175.

Finalmente, el tercer complejo clonal analizado ha sido el ST973, por su persistencia como clon endémico en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, con fenotipo MDR/XDR, asociado con resistencia a carbapenémicos y

portador de *bla*_{VIM-2}. Todas las cepas pertenecientes a este CAR presentaron un fenotipo MDR (87.5%) o XDR (12.5%) y todas contenían el gen *bla*_{VIM-2}, en diferentes integrones de tipo 1, algunas de ellas con más de un integrón conteniendo este gen e incluso más de una copia de este gen dentro de un mismo integrón. Prácticamente todas las cepas resultaron resistentes a meropenem, doripenem, gentamicina, tobramicina, netilmicina y ciprofloxacina, destacando una cepa que únicamente resulto sensible a este último. Además de *bla*_{VIM-2}, todas las cepas de este ST contenían genes de resistencia adquiridos entre los que están: *bla*_{PDC-5} y *bla*_{OXA-50}, *aphA-IIb*, *aacA4* y *aadA1b*; así como los genes *qacEΔ1*, *sul1*, *fosA1*, *catB7* y *crpP-4*. Sin embargo, las mutaciones relacionadas con resistencia resultaron más variables dentro de este clon, aunque no se detectaron cambios en MexB, NalD, OprJ, o MexE .

En el CAR ST973 el serotipo predominante fue O:15, aunque se encontró un 63% de cepas no tipables. La predicción mediante análisis de WGS, usando PAST, mostró serotipo O:11, con muy baja cobertura, lo que nos llevó a un análisis más específico de la región que codifica para el serotipo O:15, encontrándose que todas las cepas ST973 contenían la secuencia definida por Huszczyński *et al.*, 2020 para el serotipo O:15, pero que no está incluida en la herramienta PAST. Este hecho debe tenerse en cuenta a la hora de hacer serotipado *in silico*, pues la ausencia de este serotipo en la herramienta del DTU puede conllevar resultados erróneos.

En línea con los resultados de los dos CAR anteriores, este ST973 presenta bajos niveles de producción de biofilm y pigmentos, siendo excepcionalmente bajos para el caso de la producción de elastasa y piocianina y para la motilidad, tanto tipo swarming como swimming. Estos resultados parecen indicar que este clon se comporta de manera similar a los otros dos CAR analizados.

Este clon presentó un genotipo *exoU*/*exoS*⁺. Además, la secuencia del gen *lasR* en las cepas ST973 reveló presencia de un codón stop prematuro dando lugar a una proteína LasR de 208 aminoácidos (N208*) en todas ellas. Como se ha comentado anteriormente, la pérdida del sistema *las* parece ser una ventaja adaptativa para infecciones crónicas. Las cepas de este clon portaban pioverdina de clase III y el *pilA* del grupo 2 (*pilA_{II}*)

Todas estas características encontradas en este ST973, el fenotipo MDR/XDR, la resistencia a carbapenémicos y la presencia de *bla_{VIM-2}*, junto con el hecho de su persistencia en el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, indican que el ST973 puede considerarse un CAR local, que presenta características similares al ST175 y a ST235, y podría expandirse globalmente. De hecho, filogenéticamente, la alineación concatenada de los SNPs muestra que las cepas del ST973 están más cercanas filogenéticamente al clon ST175 y a la cepa de referencia PAO1, mientras que las cepas pertenecientes al clon ST235 aparecen en otra rama, y por tanto más alejadas filogenéticamente. Todos estos resultados alertan de que este nuevo CAR debe ser monitorizado para su vigilancia epidemiológica.

El análisis de estos clones pone de relieve que los procesos adaptativos para la persistencia a largo plazo en la infección crónica y el éxito clonal global en el ambiente nosocomial parecen tener elementos comunes, como la pérdida de los sistemas de QS y la motilidad defectiva, tal vez a través varias redes regulatorias que conectan todos estos elementos, la motilidad, la producción de pigmentos, y formación de biofilm (Mulet *et al*, 2013).

A lo largo de este análisis de los tres clones de alto riesgo, ST175, ST235 y ST973, se han encontrado varios marcadores específicos para cada uno de ellos que podrían servir tanto para la detección y seguimiento de los mismos, como para futuras dianas terapéuticas. Estos marcadores serían:

- ST235: serotipo O:11, PDC-35, OXA-488, CrpP-1, *exoU*, *pilA_{II}*, pioverdina clase II.
- ST175: serotipo O:4, PDC-1, OXA-50, CrpP-2, *exoS*, *pilA_I*, pioverdina clase I, pérdida del sistema *rhl*.
- ST973: serotipo O:15, PDC-5, OXA-50, CrpP-4, *exoS*, *pilA_{II}*, pioverdina clase III, pérdida de *lasR*

El análisis de la *bla_{PDC}* asocia una variante a cada ST, *bla_{PDC-1}*/ST175 y *bla_{PDC-35}*/ST235, como se había descrito previamente (Fournier *et al.*, 2021) (Sid Ahmed *et al.*, 2022); así como *bla_{PDC-5}*/ST973 observado en este trabajo por primera vez.

Las pilinas del grupo I (cepas ST175) y grupo II (ST235 y ST973) son las más frecuentemente detectadas en T4P de *P. aeruginosa* (Kus *et al.*, 2004; Asikyan *et al.*,

2008; Horna *et al.*, 2019). Así, de los cinco alelos descritos en las pilinas del T4P, todos excepto uno (grupo II) están vinculados con uno o dos genes accesorios característicos, localizados cerca del gen de la pilina y que permiten su glicosilación. El equilibrio entre las características físicas y químicas de la superficie lateral del pilus y el sitio de colonización del huésped es un determinante importante en el éxito del patógeno, por lo que esta importante área de estudio debería examinarse en trabajos futuros.

Los CAR analizados presentaban los tres tipos de pioverdina: clase I las cepas ST175, clase II las ST235 y clase III las ST973. Entre las propiedades que aportan las distintas clases de pioverdina, cabe destacar la sensibilidad a la acción de la piocina S3 que presentan los aislados de *P. aeruginosa* que producen pioverdina clase II, frente a la resistencia ejercida por los aislados con pioverdinas clase I y III. La piocina S3 es una bacteriocina producida por *P. aeruginosa* con actividad antimicrobiana frente a cepas de la misma especie, que usa FpvAll como receptor para entrar y matarlas (Baysse *et al.*, 1999) De hecho, las piocinas podrían desempeñar un papel particularmente importante durante una co-colonización de aislados de *P. aeruginosa* que poseen diferentes genes de piocina/inmunidad y favorecer la competencia de un clon particular de *P. aeruginosa*. Por tanto, la diversidad de sideróforos puede ser también un mecanismo de resistencia que se debe estudiar en profundidad.

La elevada divergencia detectada en algunos genes dentro de una misma especie, como el locus de pioverdina, el regulón flagelar, T4P pilA, las proteínas efectoras T3SS y el locus de biosíntesis del antígeno O, puede ser un reflejo de las presiones de la competencia interbacteriana dentro de las infecciones. Esta selección parece apuntar a otros mecanismos competitivos similares, R-piocinas o T4SS, en aislados de infección en evolución.

La aparición y difusión de clones internacionales de alto riesgo de *P. aeruginosa* suponen un desafío en todo el mundo. Las cepas MDR y XDR de *P. aeruginosa* de alto riesgo son frecuentemente identificados en infecciones nosocomiales y causan infecciones difíciles de tratar, limitando enormemente las opciones de tratamiento. La identificación, detección y seguimiento de este tipo de clones, así como, la investigación en los mismos para detectar posibles dianas terapéuticas específicas es de vital importancia para el correcto control de los mismos.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Entre las 275 cepas de *P. aeruginosa* analizadas, un 64% fueron sensibles a todos los antipseudomónicos testados, un 15% modR, un 18% MDR y un 3% XDR, mostrando diferentes fenotipos de resistencia en función del origen.
2. Las 275 cepas de *P. aeruginosa* analizadas se clasificaron en 245 pulsotipos de PFGE (221 pulsotipos únicos) y en 127 STs de MLST (95 STs en las cepas no clínicas y 49 STs en las clínicas), siendo 27 STs nuevos y ST235 (11%), ST253 (5,5%), ST274 (5%), ST175 (4,7%), ST244 (3%) y ST973 (3%) los más prevalentes. El serotipo no tipable fue el más frecuente (30%), siendo más prevalente en cepas no clínicas.
3. El 67% de las cepas presentaron el genotipo *exoS*⁺/*exoU*⁻ y el 28% el genotipo *exoS*⁻/*exoU*⁺. Los genotipos menos comunes *exoS*⁺/*exoU*⁺ (1%) y *exoS*⁻/*exoU*⁻ (4%) se detectaron en cepas no clínicas. Nueve de ellas carecían de todo el T3SS y poseían la exolisina ExlA.
4. La caracterización de los parámetros biológicos mostró que las cepas no clínicas presentaban mayor producción de biofilm y pigmentos (piocianina principalmente), actividad elastasa y motilidad que las clínicas, inversamente proporcionales a la resistencia a antibióticos o a *quorum sensing* no funcionales.
5. El 22% de las 56 cepas seleccionadas para el estudio de la resistencia a fluoroquinolonas fueron resistentes a todas las fluoroquinolonas. Se observó una correlación entre el número de cambios en las proteínas GyrA y ParC y el nivel de resistencia, además de mutaciones o ausencia de genes, como *mexZ*, *mvaT* y *nalD*, implicados en la sobreexpresión de bombas de expulsión.
6. El gen *crpP* se detectó en 43 cepas (72.9%)(49% sensibles a fluoroquinolonas y 40% no clínicas), y codificó siete variantes diferentes de CrpP, incluyendo una nueva (CrpP-7). Este gen se localizó en 23 elementos móviles integrativos y conjugativos (ICEs) cromosómicos diferentes, insertados en dos “*hot spots*” del genoma precedidos de tRNA y que contenían otros elementos de interés como piocinas o determinantes de resistencia a metales.
7. Entre las 11 cepas del clon ST274 aisladas distintos orígenes, nueve fueron sensibles a todos los antibióticos testados (82%), una cepa modR y otra cepa XDR/ DTR (9%). Se observó un fenotipo de infección crónica en la cepa XDR/DTR,

- modR y la cepa con el gen *lasR* truncado, caracterizadas por la pérdida de antigenicidad específica del serotipo y baja motilidad. Las cepas XDR/DTR y modR presentaron una baja producción de pigmentos y formación de biofilm, mientras que fue muy alta en la cepa *lasR*-truncada.
8. El análisis de los genomas completos de las *P. aeruginosa* ST274 mostraron ciertas asociaciones, independientemente de su origen o resistencia a antibióticos, como la ausencia de *vqsM* y *pldA/tleS* y la presencia de los genes *bla_{OXA-486}* y *bla_{PDC-24}*, serotipo O:3, genotipo *exoS⁺/exoU⁻*, el grupo V de pili tipo IV, el locus de pioverdina clase II y patrones mutacionales en proteínas como PmrAB, ToxA, FusA2 o AmpD.
 9. Las características biológicas asociadas a los clones de alto riesgo ST175, ST235, y ST973 incluyen fenotipos MDR (72%), baja producción de pigmentos, de biofilm y de actividad elastasa, así como una motilidad defectiva.
 10. El análisis del clon ST175 ha puesto de manifiesto la ausencia de la región completa del *rhl*, concretamente de los genes *pheC*, *rhl*, *rhlR*, *rhlB* y *rhlA* en este clon, en 106 de los 109 genomas analizados, siendo las cepas más antiguas las únicas en las se ha detectado este sistema de *quorum sensing*.
 11. El análisis del genoma completo de estas cepas permitió la detección de ciertos marcadores específicos
 - a. ST175: serotipo O:4, PDC-1, OXA-50, CrpP-2, *exoS*, *pilA_I*, pioverdina clase I, pérdida del sistema *rhl*;
 - b. ST235: serotipo O:11, PDC-35, OXA-488, CrpP-1, *exoU*, *pilA_{II}*, pioverdina clase II;
 - c. ST973: serotipo O:15, PDC-5, OXA-50, CrpP-4, *exoS*, *pilA_{III}*, pioverdina clase III, pérdida de *lasR*.
 12. Esta tesis aporta datos de *P. aeruginosa* aportados que ponen de manifiesto la importancia de las cepas de orígenes diferentes al entorno clínico como posibles reservorios de determinantes de resistencia y virulencia, que deben considerarse y monitorizarse desde un enfoque “*One Health*”. Los resultados proporcionados podrían servir de base para estudios más específicos centrados en una mejor gestión de antibióticos y nuevos desarrollos terapéuticos.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Abby, S. S., Cury, J., Guglielmini, J., Néron, B., Touchon, M., & Rocha, E. P. C. (2016). Identification of protein secretion systems in bacterial genomes. *Scientific Reports*, *6*, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep23080>
- Abdelaziz, A. A., Kamer, A. M. A., Al-Monofy, K. B., & Al-Madboly, L. A. (2023). *Pseudomonas aeruginosa*'s greenish-blue pigment pyocyanin: its production and biological activities. *Microbial Cell Factories*, *22*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12934-023-02122-1/>
- Ajayi, T., Allmond, L. R., Sawa, T., & Wiener-Kronish, J. P. (2003). Single-nucleotide-polymorphism mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion toxins for development of a diagnostic multiplex PCR system. *Journal of Clinical Microbiology*, *41*(8), 3526–3531. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.8.3526-3531.2003>
- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T. Y., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A.-L. V., Cheng, A. A., Liu, S., Min, S. Y., Miroshnichenko, A., Tran, H.-K., Werfalli, R. E., Nasir, J. A., Oloni, M., Speicher, D. J., Florescu, A., Singh, B., ... McArthur, A. G. (2020). CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, *48*(D1), D517–D525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>
- Algammal, A. M., Mabrok, M., Sivaramasamy, E., Youssef, F. M., Atwa, M. H., El-Kholy, A. W., Hetta, H. F., & Hozzein, W. N. (2020). Emerging MDR-*Pseudomonas aeruginosa* in fish commonly harbor *oprL* and *toxA* virulence genes and *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, and *tetA* antibiotic-resistance genes. *Scientific Reports*, *10*(1), 15961. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72264-4>
- Alikhan, N.-F., Petty, N. K., Ben Zakour, N. L., & Beatson, S. A. (2011). BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics*, *12*, 402. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-402>
- Allydice-Francis, K., & Brown, P. D. (2012). Diversity of antimicrobial resistance and virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* associated with fresh vegetables. *International Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1155/2012/426241>
- Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *289*(1036), 321–331. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>
- Anantharajah, A., Buyck, J. M., Sundin, C., Tulkens, P. M., Mingeot-Leclercq, M.-P., & Van Bambeke, F. (2017). Salicylidene Acylhydrazides and Hydroxyquinolines Act as Inhibitors of Type Three Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa* by Distinct Mechanisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(6). <https://doi.org/10.1128/AAC.02566-16>
- Anbo, M., & Jelsbak, L. (2023). A bittersweet fate: detection of serotype switching in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Genomics*, *9*(1). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000919>
- Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023 - 2021 data. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control and World Health Organization; 2023.

- Arca-Suárez, J., Fraile-Ribot, P., Vázquez-Ucha, J. C., Cabot, G., Martínez-Gutián, M., Lence, E., González-Bello, C., Beceiro, A., Rodríguez-Iglesias, M., Galán-Sánchez, F., Bou, G., & Oliver, A. (2019). Challenging Antimicrobial Susceptibility and Evolution of Resistance (OXA-681) during Treatment of a Long-Term Nosocomial Infection Caused by a *Pseudomonas aeruginosa* ST175 Clone. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(10), e01110-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01110-19>
- Armitage, J. P., & Berry, R. M. (2020). Assembly and Dynamics of the Bacterial Flagellum. *Annual review of microbiology*, 74, 181–200. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093411>
- Asikyan, M. L., Kus, J. V., & Burrows, L. L. (2008). Novel proteins that modulate type IV pilus retraction dynamics in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 190(21), 7022–7034. <https://doi.org/10.1128/JB.00938-08>
- Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M. I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T. H., Rasool, M. H., Shahid, A., Xueshan, X., & Baloch, Z. (2021). Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>
- Azam, M. W., & Khan, A. U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*, 24(1), 350–359. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2018.07.003>
- Azimi, L., & Lari, A. R. (2019). Colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains with defective biofilm formation. *GMS Hygiene and Infection Control*, 14, Doc12. <https://doi.org/10.3205/dgkh000328>
- Balasubramanian, D., Schneper, L., Kumari, H., & Mathee, K. (2013). A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Research*, 41(1), 1–20. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1039>
- Balows A. (2003). Manual of clinical microbiology 8th edition. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 47(4), 625–626. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(03\)00160-3](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00160-3)
- Baquero, F., Coque, T. M., & de la Cruz, F. (2011). Ecology and evolution as targets: the need for novel eco-evo drugs and strategies to fight antibiotic resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(8), 3649–3660. <https://doi.org/10.1128/AAC.00013-11>
- Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. (2018). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. In *Drugs in Context* (Vol. 7). Bioexcel Publishing LTD. <https://doi.org/10.7573/dic.212527>
- Baysse, C., Meyer, J.-M., Plesiat, P., Geoffroy, V., Michel-Briand, Y., & Cornelis, P. (1999). Uptake of pyocin S3 occurs through the outer membrane ferripyoverdine type II receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 181(12), 3849–3851. <https://doi.org/10.1128/JB.181.12.3849-3851.1999>
- Beharry, Z., & Palzkill, T. (2005). Functional analysis of active site residues of the fosfomycin resistance enzyme FosA from *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(18), 17786–17791. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501052200>

- Behrens, H. M., Lowe, E. D., Gault, J., Housden, N. G., Kaminska, R., Weber, T. M., Thompson, C. M. A., Mislin, G. L. A., Schalk, I. J., Walker, D., Robinson, C. V., & Kleanthous, C. (2020). Pyocin S5 Import into *Pseudomonas aeruginosa* Reveals a Generic Mode of Bacteriocin Transport. *mBio*, 11(2), e03230-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.03230-19>
- Behzadi, P., Gajdács, M., Pallós, P., Ónodi, B., Stájer, A., Matusovits, D., Kárpáti, K., Burián, K., Battah, B., Ferrari, M., Doria, C., Caggiari, G., Khusro, A., Zanetti, S., & Donadu, M. G. (2022). Relationship between Biofilm-Formation, Phenotypic Virulence Factors and Antibiotic Resistance in Environmental *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/pathogens11091015>
- Bel Hadj Ahmed, A., Salah Abbassi, M., Rojo-Bezares, B., Ruiz-Roldán, L., Dhahri, R., Mehri, I., Sáenz, Y., & Hassen, A. (2019). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various environmental niches: New STs and occurrence of antibiotic susceptible “high-risk clones.” *International Journal of Environmental Health Research*. <https://doi.org/10.1080/09603123.2019.1616080>
- Bellés, A., Bueno, J., Rojo-Bezares, B., Torres, C., Javier Castillo, F., Sáenz, Y., & Seral, C. (2018). Characterisation of VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from lower tract respiratory infections in a Spanish hospital. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 37(10), 1847–1856. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3318-3>
- Benie, C. K. D., Dadié, A., Guessennd, N., N’gbesso-Kouadio, N. A., Kouame, N. D., N’golo, D. C., Aka, S., Dako, E., Dje, K. M., & Dosso, M. (2017). Characterization of Virulence Potential of *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Bovine Meat, Fresh Fish, and Smoked Fish. *European Journal of Microbiology & Immunology*, 7(1), 55–64. <https://doi.org/10.1556/1886.2016.00039>
- Bocharova, Y. A., Savinova, T. A., Lyamin, A. V., Kondratenko, O. V., Polikarpova, S. V., Zhilina, S. V., Fedorova, N. I., Semykin, S. Y., Chaplin, A. V., & Korostin, D. O. (2021). Genome features and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in patients with cystic fibrosis in the Russian Federation. *Klinicheskaja Laboratornaia Diagnostika*, 66(10), 629–634. <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-10-629-634>
- Bolivar-Vargas, A. F., Torres-Caycedo, M. I., & Sánchez-Neira, Y. (2021). Biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* como mecanismos de resistencia y tolerancia a antibióticos. Revisión narrativa. *Revista de La Facultad de Ciencias de La Salud Universidad Del Cauca*, 23(2), 47–57. <https://doi.org/10.47373/RFCs.2021.V23.1780>
- Botelho, J., Grosso, F., & Peixe, L. (2018). Unravelling the genome of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate belonging to the high-risk clone ST235 reveals an integrative conjugative element housing a bla_{GES-6} carbapenemase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(1), 77–83. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx337>
- Botelho, J., Grosso, F., & Peixe, L. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resistance Updates*, 44. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2019.07.002>
- Botelho, J., Grosso, F., & Peixe, L. (2020). ICEs Are the Main Reservoirs of the Ciprofloxacin-Modifying *crpP* Gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Genes*, 11(8), 1–12. <https://doi.org/10.3390/GENES11080889>

- Bouteiller, M., Dupont, C., Bourigault, Y., Latour, X., Barbey, C., Konto-ghiorghi, Y., & Merieau, A. (2021). *Pseudomonas* Flagella: Generalities and Specificities. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3337. <https://doi.org/10.3390/IJMS22073337>
- Breidenstein, E. B. M., de la Fuente-Núñez, C., & Hancock, R. E. W. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, 19(8), 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>
- Bruchmann, S., Dötsch, A., Nouri, B., Chaberny, I. F., & Häussler, S. (2013). Quantitative contributions of target alteration and decreased drug accumulation to *Pseudomonas aeruginosa* fluoroquinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(3), 1361–1368. <https://doi.org/10.1128/AAC.01581-12>
- Burdman, S., Bahar, O., Parker, J. K., & de la Fuente, L. (2011). Involvement of Type IV Pili in Pathogenicity of Plant Pathogenic Bacteria. *Genes* 2011, Vol. 2, Pages 706-735, 2(4), 706–735. <https://doi.org/10.3390/GENES2040706>
- Burrows, L. L. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annual Review of Microbiology*, 66, 493–520. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150055>
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Cabot, G., Ocampo-Sosa, A. A., Tubau, F., Macia, M. D., Rodríguez, C., Moya, B., Zamorano, L., Suárez, C., Peña, C., Martínez-Martínez, L., Oliver, A., & Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI) (2011). Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(5), 1906–1911. <https://doi.org/10.1128/AAC.01645-10>
- Cabot, G., Zamorano, L., Moyà, B., Juan, C., Navas, A., Blázquez, J., & Oliver, A. (2016). Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Antimicrobial Resistance and Fitness under Low and High Mutation Rates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(3), 1767–1778. <https://doi.org/10.1128/AAC.02676-15>
- Cabrera, R., Fernández-Barat, L., Vázquez, N., Alcaraz-Serrano, V., Bueno-Freire, L., Amaro, R., López-Aladid, R., Oscanoa, P., Muñoz, L., Vila, J., & Torres, A. (2022). Resistance mechanisms and molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with bronchiectasis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(6), 1600–1610. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac084>
- Camberlein, V., Jézéquel, G., Haupenthal, J., & Hirsch, A. K. H. (2022). The Structures and Binding Modes of Small-Molecule Inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* Elastase LasB. *Antibiotics* 2022, Vol. 11, Page 1060, 11(8), 1060. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11081060>
- Camus, L., Vandenesch, F., & Moreau, K. (2021). From genotype to phenotype: adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis environment. *Microbial Genomics*, 7(3). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000513>
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Møller Aarestrup, F., & Hasman, H. (2014). In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 3895–3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>

- Carriço, J. A., Rossi, M., Moran-Gilad, J., Van Domselaar, G., & Ramirez, M. (2018). A primer on microbial bioinformatics for nonbioinformaticians. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24(4), 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.12.015>
- Carver, T., Harris, S. R., Berriman, M., Parkhill, J., & McQuillan, J. A. (2012). Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(4), 464–469. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703>
- Casado-García, Á., Chichón, G., Domínguez, C., García-Domínguez, M., Heras, J., Inés, A., López, M., Mata, E., Pascual, V., & Sáenz, Y. (2021). MotilityJ: An open-source tool for the classification and segmentation of bacteria on motility images. *Computers in Biology and Medicine*, 136, 104673. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104673>
- Chadha, J., Harjai, K., & Chhibber, S. (2022). Revisiting the virulence hallmarks of *Pseudomonas aeruginosa*: a chronicle through the perspective of quorum sensing. *Environmental Microbiology*, 24(6), 2630–2656. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15784>
- Chand, Y., Khadka, S., Sapkota, S., Sharma, S., Khanal, S., Thapa, A., Rayamajhee, B., Khadka, D. K., Panta, O. P., Shrestha, D., & Poudel, P. (2021). Clinical Specimens are the Pool of Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Harboring *oprL* and *toxA* Virulence Genes: Findings from a Tertiary Hospital of Nepal. *Emergency Medicine International*, 2021, 4120697. <https://doi.org/10.1155/2021/4120697>
- Chang, Y.-S. T., Klockgether, J., & Forschergruppe, K. (2007). An intragenic deletion in *pilQ* leads to nonpiliation of a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from cystic fibrosis lung. *FEMS Microbiology Letters*, 270(2), 201–206. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00664.x>
- Chávez-Jacobo, V. M., Hernández-Ramírez, K. C., Romo-Rodríguez, P., Pérez-Gallardo, R. V., Campos-García, J., Gutiérrez-Corona, J. F., García-Merinos, J. P., Meza-Carmen, V., Silva-Sánchez, J., & Ramírez-Díaz, M. I. (2018). CrpP Is a Novel Ciprofloxacin-Modifying Enzyme Encoded by the *Pseudomonas aeruginosa* pUM505 Plasmid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(6). <https://doi.org/10.1128/AAC.02629-17>
- Chávez-Jacobo, V. M., Hernández-Ramírez, K. C., Silva-Sánchez, J., Garza-Ramos, U., Barrios-Camacho, H., Ortiz-Alvarado, R., Cervantes, C., Meza-Carmen, V., & Ramírez-Díaz, M. I. (2019). Prevalence of the *crpP* gene conferring decreased ciprofloxacin susceptibility in enterobacterial clinical isolates from Mexican hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(5), 1253–1259. <https://doi.org/10.1093/jac/dky562>
- Chen, Q., Dharmaraj, T., Cai, P. C., Burgener, E. B., Haddock, N. L., Spakowitz, A. J., & Bollyky, P. L. (2022). Bacteriophage and Bacterial Susceptibility, Resistance, and Tolerance to Antibiotics. *Pharmaceutics*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071425>
- Chernomor, O., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2016). Terrace Aware Data Structure for Phylogenomic Inference from Supermatrices. *Systematic Biology*, 65(6), 997–1008. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syw037>
- Choudhury, D., Talukdar, A. Das, Maurya, A. P., Choudhury, M. D., Dhar, D., Chakravarty, A., & Bhattacharjee, A. (2015). Contribution of efflux pumps in fluoroquinolone resistance in multi-drug

- resistant nosocomial isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a tertiary referral hospital in north east India. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 33(1), 84–86. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.148388>
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility. 28th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute; Wayne, PA, USA: 2018. CLSI Supplement M100.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility. 30th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute; Wayne, PA, USA: 2020. CLSI Supplement M100.
- Cornelis, P., Hohnadel, D., & Meyer, J.-M. (1989). Evidence for different pyoverdine-mediated iron uptake systems among *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Infection and Immunity*, 57(11), 3491–3497. <https://doi.org/10.1128/jai.57.11.3491-3497.1989>
- Cornelis, P. (2020). Putting an end to the *Pseudomonas aeruginosa* IQS controversy. *MicrobiologyOpen*, 9(2). <https://doi.org/10.1002/MBO3.962>
- Corredor, M., Patiño-Salazar, J. D., Castaño, D. C., & Muñoz-Gómez, A. (2023). The Pangenome of *Pseudomonas aeruginosa*. In A. P. O. M. Darwesh & D. I. Matter (Eds.), *Pseudomonas aeruginosa - New Perspectives and Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.108187>
- Cortes-Lara, S., del Barrio-Tofiño, E., López-Causapé, C., Oliver, A., Martínez-Martínez, L., Bou, G., Zamorano, L., Sánchez-Diener, I., Galán, F., & Gracia, I. (2021). Predicting *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility phenotypes from whole genome sequence resistome analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(11), 1631–1637. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.05.011>
- Couvin, D., Bernheim, A., Toffano-Nioche, C., Touchon, M., Michalik, J., Néron, B., Rocha, E. P. C., Vergnaud, G., Gautheret, D., & Pourcel, C. (2018). CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W246–W251. <https://doi.org/10.1093/nar/gky425>
- Crone, S., Vives-Flórez, M., Kvich, L., Saunders, A. M., Malone, M., Nicolaisen, M. H., Martínez-García, E., Rojas-Acosta, C., Catalina Gomez-Puerto, M., Calum, H., Whiteley, M., Kolter, R., & Bjarnsholt, T. (2020). The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS*, 128(3), 220–231. <https://doi.org/10.1111/apm.13010>
- Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T., & Dowson, C. G. (2004). Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5644–5649. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004>
- Cury, J., Jové, T., Touchon, M., Néron, B., & Rocha, E. P. (2016). Identification and analysis of integrons and cassette arrays in bacterial genomes. *BioRxiv*, 030866. <https://doi.org/10.1101/030866>
- D’Argenio, D. A., Wu, M., Hoffman, L. R., Kulasekara, H. D., Déziel, E., Smith, E. E., Nguyen, H., Ernst, R. K., Larson Freeman, T. J., Spencer, D. H., Brittnacher, M., Hayden, H. S., Selgrade, S., Klausen, M., Goodlett, D. R., Burns, J. L., Ramsey, B. W., & Miller, S. I. (2007). Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients. *Molecular Microbiology*, 64(2), 512–533. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2007.05678.X>

- Darling, A. C. E., Mau, B., Blattner, F. R., & Perna, N. T. (2004). Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research*, 14(7), 1394–1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>
- de Oliveira Pereira, T., Groleau, M.-C., & Déziel, E. (2023). Surface growth of *Pseudomonas aeruginosa* reveals a regulatory effect of 3-oxo-C(12)-homoserine lactone in the absence of its cognate receptor, LasR. *MBio*, 14(5), e0092223. <https://doi.org/10.1128/mbio.00922-23>
- De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3). <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>
- de Sousa, T., Hébraud, M., Enes Dapkevicius, M. L. N., Maltez, L., Pereira, J. E., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Igrejas, G., & Poeta, P. (2021). Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12892. <https://doi.org/10.3390/IJMS222312892>
- de Sousa, T., Hébraud, M., Alves, O., Costa, E., Maltez, L., Pereira, J. E., Martins, Â., Igrejas, G., & Poeta, P. (2023). Study of Antimicrobial Resistance, Biofilm Formation, and Motility of *Pseudomonas aeruginosa* Derived from Urine Samples. *Microorganisms*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051345>
- del Barrio-Tofiño, E., López-Causapé, C., Cabot, G., Rivera, A., Benito, N., Segura, C., Montero, M. M., Sorlí, L., Tubau, F., Gómez-Zorrilla, S., Tormo, N., Durá-Navarro, R., Viedma, E., Resino-Foz, E., Fernández-Martínez, M., González-Rico, C., Alejo-Cancho, I., Martínez, J. A., Labayru-Echverría, C., Dueñas, C., ... Oliver, A. (2017). Genomics and Susceptibility Profiles of Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Spain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(11), e01589-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01589-17>
- del Barrio-Tofiño, E., Sánchez-Diener, I., Zamorano, L., Cortes-Lara, S., López-Causapé, C., Cabot, G., Bou, G., Martínez-Martínez, L., & Oliver, A. (2019). Association between *Pseudomonas aeruginosa* O-antigen serotypes, resistance profiles and high-risk clones: Results from a Spanish nationwide survey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(11), 3217–3220. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz346>
- del Barrio-Tofiño, E., López-Causapé, C., & Oliver, A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with horizontally-acquired β -lactamases: 2020 update. In *International Journal of Antimicrobial Agents*, 56 (6), Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106196>
- Denning, D. W. (1998). Invasive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases*, 26(4), 781–805. <https://doi.org/10.1086/513943/2/26-4-781.PDF.GIF>
- Díaz Caballero, J., Wheatley, R. M., Kapel, N., López-Causapé, C., Van der Schalk, T., Quinn, A., Shaw, L. P., Ogunlana, L., Recanatini, C., Xavier, B. B., Timbermont, L., Kluytmans, J., Ruzin, A., Esser, M., Malhotra-Kumar, S., Oliver, A., & MacLean, R. C. (2023). Mixed strain pathogen populations accelerate the evolution of antibiotic resistance in patients. *Nature Communications*, 14(1), 4083. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39416-2>

- Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). Microbe profile: *Pseudomonas aeruginosa*: Opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology (United Kingdom)*, 166(1), 30–33. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000860>
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881–890. <https://doi.org/10.3201/EID0809.020063>
- Dos Santos, P. A. S., Rodrigues, Y. C., Marcon, D. J., Lobato, A. R. F., Cazuzu, T. B., Gouveia, M. I. M., Silva, M. J. A., Souza, A. B., Lima, L. N. G. C., Quaresma, A. J. P. G., Brasiliense, D. M., & Lima, K. V. B. (2023). Endemic High-Risk Clone ST277 Is Related to the Spread of SPM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa* during the COVID-19 Pandemic Period in Northern Brazil. *Microorganisms*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082069>
- Dufkova, K., Bezdicek, M., Nykrynova, M., Kocmanova, I., Kubackova, P., Hanslikova, J., Fejkova, K., Mayer, J., & Lengerova, M. (2023). Rapid Identification of *Pseudomonas aeruginosa* International High-Risk Clones Based on High-Resolution Melting Analysis. *Microbiology Spectrum*, 11(1), e0357122. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03571-22>
- ECDC. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023 - 2021 data. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control and World Health Organization; 2023.
- Elmouaden, C., Laglaoui, A., Ennane, L., Bakkali, M., & Abid, M. (2019). Virulence genes and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in the Northwestern of Morocco. *Journal of Infection in Developing Countries*, 13(10), 892–898. <https://doi.org/10.3855/jidc.10675>
- Elsen, S., Huber, P., Bouillot, S., Couté, Y., Fournier, P., Dubois, Y., Timsit, J.-F., Maurin, M., & Attrée, I. (2014). A type III secretion negative clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* employs a two-partner secreted exolysin to induce hemorrhagic pneumonia. *Cell Host & Microbe*, 15(2), 164–176. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.003>
- Estepa, V., Rojo-Bezares, B., Azcona-Gutiérrez, J. M., Olarte, I., Torres, C., & Sáenz, Y. (2017). Characterisation of carbapenem-resistance mechanisms in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered in a Spanish hospital. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English Edition)*, 35(3), 141–147. <https://doi.org/10.1016/J.EIMCE.2017.02.001>
- Estepa, V., Rojo-Bezares, B., Torres, C., & Sáenz, Y. (2014). Faecal carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in healthy humans: Antimicrobial susceptibility and global genetic lineages. *FEMS Microbiology Ecology*, 89(1), 15–19. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12301>
- Estepa, V., Rojo-Bezares, B., Torres, C., & Sáenz, Y. (2015). Genetic Lineages and Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas* spp. Isolates Recovered from Food Samples. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(6), 486–491. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1928>
- Etymologia: *Pseudomonas*. (2012). In *Emerging Infectious Diseases*, 18 (8), 1241. <https://doi.org/10.3201/eid1808.ET1808>
- Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P., & Spratt, B. G. (2004). eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology*, 186(5), 1518–1530. <https://doi.org/10.1128/JB.186.5.1518-1530.2004>

- Feltman, H., Schulert, G., Khan, S., Jain, M., Peterson, L., & Hauser, A. R. (2001). Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)*, 147(10), 2659–2669. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-10-2659>
- Feltner, J. B., Wolter, D. J., Pope, C. E., Groleau, M.-C., Smalley, N. E., Greenberg, E. P., Mayer-Hamblett, N., Burns, J., Déziel, E., Hoffman, L. R., & Dandekar, A. A. (2016). LasR Variant Cystic Fibrosis Isolates Reveal an Adaptable Quorum-Sensing Hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio*, 7(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01513-16>
- Feng, W., Huang, Q., Wang, Y., Yuan, Q., Li, X., Xia, P., & Sun, F. (2021). Changes in the resistance and epidemiological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* during a ten-year period. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 54(2), 261–266.. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.08.017>
- Fernández F, S., Alonso, G., & Toro A, E. S. (2004). Estructura de mosaico del cromosoma bacteriano: Islas patogénicas. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 35, 20–31. Scielon.
- Fernández-Cuenca, F., Martínez-Martínez, L., & Pascual, Á. (2020). Evolution of the antimicrobial resistance rates in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* causing invasive infections in the south of Spain. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 38(4), 150–154. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.06.009>
- Fernández-Olmos, A., García-Castillo, M., Alba, J. M., Morosini, M. I., Lamas, A., Romero, B., Galán, J. C., del Campo, R., & Cantón, R. (2013). Population structure and antimicrobial susceptibility of both nonpersistent and persistent *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(8), 2761–2765. <https://doi.org/10.1128/JCM.00802-13>
- Ferri, M., Ranucci, E., Romagnoli, P., & Giaccone, V. (2017). Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 2857–2876. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077192>
- Finck-Barbançon, V., Yahr, T. L., & Frank, D. W. (1998). Identification and characterization of SpcU, a chaperone required for efficient secretion of the ExoU cytotoxin. *Journal of Bacteriology*, 180(23), 6224–6231. <https://doi.org/10.1128/JB.180.23.6224-6231.1998>
- Finlayson, E. A., & Brown, P. D. (2011). Comparison of antibiotic resistance and virulence factors in pigmented and non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. *The West Indian Medical Journal*, 60(1), 24–32.
- Fischer, S., Dethlefsen, S., Klockgether, J., & Tümmler, B. (2020). Phenotypic and Genomic Comparison of the Two Most Common ExoU-Positive *Pseudomonas aeruginosa* Clones, PA14 and ST235. *mSystems*, 5(6), e01007-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.01007-20>
- Fournier, D., Carrière, R., Bour, M., Grisot, E., Triponney, P., Muller, C., Lemoine, J., Jeannot, K., Plésiat, P., & GERPA Study Group (2021). Mechanisms of Resistance to Ceftolozane/Tazobactam in *Pseudomonas aeruginosa*: Results of the GERPA Multicenter Study. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 65(2), e01117-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01117-20>

- Fraile-Ribot, P. A., Zamorano, L., Orellana, R., Del Barrio-Tofiño, E., Sánchez-Diener, I., Cortes-Lara, S., López-Causapé, C., Cabot, G., Bou, G., Martínez-Martínez, L., & Oliver, A. (2020). Activity of Imipenem-Relebactam against a Large Collection of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates and Isogenic β -Lactam-Resistant Mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(2). <https://doi.org/10.1128/AAC.02165-19>
- Frank, D. W. (1997). The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 26(4), 621–629. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.6251991.x>
- Freschi, L., Vincent, A. T., Jeukens, J., Emond-Rheault, J. G., Kukavica-Ibrulj, I., Dupont, M. J., Charette, S. J., Boyle, B., & Levesque, R. C. (2019). The *Pseudomonas aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on Its Population Structure, Horizontal Gene Transfer, and Pathogenicity. *Genome Biology and Evolution*, 11(1), 109–120. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy259>
- Fuse, K., Fujimura, S., Kikuchi, T., Gomi, K., Iida, Y., Nukiwa, T., & Watanabe, A. (2013). Reduction of virulence factor pyocyanin production in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 19(1), 82–88. <https://doi.org/10.1007/s10156-012-0457-9>
- Gabriel, C., A., O.-S. A., Fe, T., D., M. M., Cristina, R., Bartolomé, M., Laura, Z., Cristina, S., Carmen, P., Luis, M.-M., & Antonio, O. (2011). Overexpression of AmpC and Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Bloodstream Infections: Prevalence and Impact on Resistance in a Spanish Multicenter Study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(5), 1906–1911. <https://doi.org/10.1128/aac.01645-10>
- Gabrielaite, M., Johansen, H. K., Molin, S., Nielsen, F. C., & Marvig, R. L. (2020). Gene loss and acquisition in lineages of *Pseudomonas aeruginosa* evolving in cystic fibrosis patient airways. *mBio*, 11(5), e02359-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02359-20>
- Gajdács, M., Baráth, Z., Kárpáti, K., Szabó, D., Usai, D., Zanetti, S., & Donadu, M. G. (2021). No Correlation between Biofilm Formation, Virulence Factors, and Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Results from a Laboratory-Based In Vitro Study. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091134>
- Geiser, T. K., Kazmierczak, B. I., Garrity-Ryan, L. K., Matthay, M. A., & Engell, J. N. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT inhibits in vitro lung epithelial wound repair. *Cellular Microbiology*, 3(4), 223–236. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00107.x>
- Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 67 (3), 159–173. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>
- Gervasoni, L. F., Peixoto, I. C., Imperador, A. C., De Oliveira, L. B., Correia, L. F., de Oliveira Vieira, K. C., Saeki, E. K., da Silva Lima, P. E., Mareco, E. A., Pereira, V. C., & Winkelströter Eller, L. K. (2023). “Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, virulence factors and source of origin of *Pseudomonas aeruginosa* environmental isolates with regard to the presence of metallo- β -lactamase-encoding genes”. *Microbial Pathogenesis*, 182, 106223. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106223>
- Ghanem, S. M., Abd El-Baky, R. M., Abourehab, M. A. S., Fadl, G. F. M., & Gamil, N. G. F. M. (2023). Prevalence of Quorum Sensing and Virulence Factor Genes Among *Pseudomonas aeruginosa*

- Isolated from Patients Suffering from Different Infections and Their Association with Antimicrobial Resistance. *Infection and Drug Resistance*, 16, 2371–2385. <https://doi.org/10.2147/IDR.S403441>
- Ghariieb, R., Saad, M., Khedr, M., El Gohary, A., & Ibrahim, H. (2022). Occurrence, virulence, carbapenem resistance, susceptibility to disinfectants and public health hazard of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from animals, humans and environment in intensive farms. *Journal of Applied Microbiology*, 132(1), 256–267. <https://doi.org/10.1111/JAM.15191>
- Ghssein, G., & Ezzeddine, Z. (2022). A Review of *Pseudomonas aeruginosa* Metallophores: Pyoverdine, Pyochelin and Pseudopaline. *Biology* 2022, 11(12), 1711. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY11121711>
- Giltner, C. L., Rana, N., Lunardo, M. N., Hussain, A. Q., & Burrows, L. L. (2011). Evolutionary and functional diversity of the *Pseudomonas* type IVa pilin island. *Environmental Microbiology*, 13(1), 250–264.
- Gloag, E. S., Turnbull, L., Huang, A., Vallotton, P., Wang, H., Nolan, L. M., Mililli, L., Hunt, C., Lu, J., Osvath, S. R., Monahan, L. G., Cavaliere, R., Charles, I. G., Wand, M. P., Gee, M. L., Prabhakar, R., & Whitchurch, C. B. (2013). Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(28), 11541–11546. https://doi.org/10.1073/PNAS.1218898110/SUPPL_FILE/SM05.MOV
- Goren, M. G., Carmeli, Y., Schwaber, M. J., Chmelnitsky, I., Schechner, V., & Navon-Venezia, S. (2010). Transfer of carbapenem-resistant plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST258 to *Escherichia coli* in patient. *Emerging Infectious Diseases*, 16(6), 1014–1017. <https://doi.org/10.3201/eid1606.091671>
- Goure, J., Pastor, A., Faudry, E., Chabert, J., Dessen, A., & Attree, I. (2004). The V Antigen of *Pseudomonas aeruginosa* Is Required for Assembly of the Functional PopB/PopD Translocation Pore in Host Cell Membranes. *Infection and immunity*, 72(8), 4741–4750. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.8.4741-4750.2004>
- Groleau, M.-C., Taillefer, H., Vincent, A. T., Constant, P., & Déziel, E. (2022). *Pseudomonas aeruginosa* isolates defective in function of the LasR quorum sensing regulator are frequent in diverse environmental niches. *Environmental Microbiology*, 24(3), 1062–1075. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15745>
- Grosso-Becerra, M.-V., Santos-Medellín, C., González-Valdez, A., Méndez, J.-L., Delgado, G., Morales-Espinosa, R., Servín-González, L., Alcaraz, L.-D., & Soberón-Chávez, G. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC Genomics*, 15(1), 318. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-318>
- Gupta, S. K., Padmanabhan, B. R., Diene, S. M., Lopez-Rojas, R., Kempf, M., Landraud, L., & Rolain, J.-M. (2014). ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 212–220. <https://doi.org/10.1128/AAC.01310-13>
- Gutiérrez, O., Juan, C., Cercenado, E., Navarro, F., Bouza, E., Coll, P., Pérez, J. L., & Oliver, A. (2007). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(12), 4329–4335. <https://doi.org/10.1128/AAC.00810-07>

- Hadadi-Fishani, M., Khaledi, A., & Fatemi-Nasab, Z. S. (2020). Correlation between biofilm formation and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: a meta-analysis. *Le Infezioni in Medicina*, 28(1), 47–54.
- Halat, D. H., & Moubareck, C. A. (2022). The Intriguing Carbapenemases of *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Genetic Profile, and Global Epidemiology. *The Yale journal of biology and medicine*, 95(4), 507–515.
- Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A. J., Forbes, A., Perkins, A. V., Davey, A. K., Chess-Williams, R., Kiefel, M. J., Arora, D., & Grant, G. D. (2016). Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 8 (8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/toxins8080236>
- Hardy, K. S., Tessmer, M. H., Frank, D. W., & Audia, J. P. (2021). Perspectives on the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System Effector ExoU and Its Subversion of the Host Innate Immune Response to Infection. *Toxins*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/toxins13120880>
- Hauser, A. R. (2009). The Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by Injection. *Nature Reviews. Microbiology*, 7(9), 654. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO2199>
- Heras, J., Domínguez, C., Mata, E., Pascual, V., Lozano, C., Torres, C., & Zarazaga, M. (2015). GelJ--a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC bioinformatics*, 16, 270. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0703-0>
- Herbert J. Bernstein. (2009). *RasMol*. Retrieved from <http://www.rasmol.org/>
- Hernández-García, M., García-Castillo, M., García-Fernández, S., López-Mendoza, D., Díaz-Regañón, J., Romano, J., Pássaro, L., Paixão, L., & Cantón, R. (2021). Presence of Chromosomal *crpP*-like Genes Is Not Always Associated with Ciprofloxacin Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates Recovered in ICU Patients from Portugal and Spain. *Microorganisms*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020388>
- Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F., & Martínez, J. L. (2019). Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. In *Nature Microbiology*, 4(9), 1432–1442. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>
- Hilliam, Y., Kaye, S., & Winstanley, C. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* and microbial keratitis. *Journal of Medical Microbiology*, 69(1), 3–13. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.001110>
- Hocquet, D., Vogne, C., El Garch, F., Vejux, A., Gotoh, N., Lee, A., Lomovskaya, O., & Plésiat, P. (2003). MexXY-OprM efflux pump is necessary for a adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(4), 1371–1375. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1371-1375.2003>
- Holliman, F. G. (1969). Pigments of *Pseudomonas* species. Structure and synthesis of aeruginosin A. *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 1*, 18(19), 2514–2516. <https://doi.org/10.1039/J39690002514>
- Horna, G., & Ruiz, J. (2021). Type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological Research*, 246, 126719. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126719>

- Horna, G., López, M., Guerra, H., Saénz, Y., & Ruiz, J. (2018). Interplay between MexAB-OprM and MexEF-OprN in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 8(1), 16463.
- Horna, G., Amaro, C., Palacios, A., Guerra, H., & Ruiz, J. (2019). High frequency of the *exoU+/exoS+* genotype associated with multidrug-resistant “high-risk clones” of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Peruvian hospitals. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47303-4>
- Hou, W., Sun, X., Wang, Z., & Zhang, Y. (2012). Biofilm-forming capacity of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* from ocular infections. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(9), 5624–5631. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-9114>
- Howe, M., & Berg, D. E. (1989). Mobile DNA. *Amer Soc Microbiol, Washington DC*.
- Huber, P. (2022). ExlA: A New Contributor to *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 929150. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.929150>
- Huszczynski, S. M., Lam, J. S., & Khursigara, C. M. (2019). The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. *Pathogens*, 9(1), 6. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010006>
- Iino, R., Nishino, K., Noji, H., Yamaguchi, A., & Matsumoto, Y. (2012). A microfluidic device for simple and rapid evaluation of multidrug efflux pump inhibitors. *Frontiers in Microbiology*, 3, 18175. <https://doi.org/10.1128/mBio.02359-12>
- Jayaseelan, S., Ramaswamy, D., & Dharmaraj, S. (2014). Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 30(4), 1159–1168. <https://doi.org/10.1007/S11274-013-1552-5>
- Jennings, L. K., Storek, K. M., Ledvina, H. E., Coulon, C., Marmont, L. S., Sadovskaya, I., Secor, P. R., Tseng, S., Scian, M., Filloux, A., Wozniak, D. J., Howell, P. L., & Parsek, M. R. (2015). Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(36), 11353–11358. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503058112>
- Johnson, J. K., Arduino, S. M., Stine, O. C., Johnson, J. A., & Harris, A. D. (2007). Multilocus sequence typing compared to pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(11), 3707–3712. <https://doi.org/10.1128/JCM.00560-07>
- Johnson, C. M., & Grossman, A. D. (2015). Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. *Annual Review of Genetics*, 49, 577–601. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-055018>
- Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome open research*, 3, 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
- Juan, C., Peña, C., & Oliver, A. (2017). Host and pathogen biomarkers for severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Journal of Infectious Diseases*, 215, 44–51. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw299>

- Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. In *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (6), 1–37. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
- Kaas, R. S., Leekitcharoenphon, P., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2014). Solving the Problem of Comparing Whole Bacterial Genomes across Different Sequencing Platforms. *PLoS ONE*, 9(8), e104984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104984>
- Kabic, J., Fortunato, G., Vaz-Moreira, I., Kekic, D., Jovicevic, M., Pesovic, J., Ranin, L., Opavski, N., Manai, C. M., & Gajic, I. (2023). Dissemination of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Serbian Hospital Settings: Expansion of ST235 and ST654 Clones. *International journal of molecular sciences*, 24(2), 1519. <https://doi.org/10.3390/ijms24021519>
- Kadri, S. S., Adjemian, J., Lai, Y. L., Spaulding, A. B., Ricotta, E., Prevots, D. R., Palmore, T. N., Rhee, C., Klompas, M., Dekker, J. P., Powers, J. H. 3rd, Suffredini, A. F., Hooper, D. C., Fridkin, S., & Danner, R. L. (2018). Difficult-to-Treat Resistance in Gram-negative Bacteremia at 173 US Hospitals: Retrospective Cohort Analysis of Prevalence, Predictors, and Outcome of Resistance to All First-line Agents. *Infectious Diseases Society of America*, 67(12), 1803–1814. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy378>
- Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., & Thurnheer, T. (2020). Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends in Microbiology*, 28(8), 668–681. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2020.03.016/ATTACHMENT/AA5EFAE2-0D6E-495D-95B6-95548F78D4AD/MMC1.DOCX>
- Kaszab, E., Radó, J., Kriszt, B., Pászti, J., Lesinszki, V., Szabó, A., Tóth, G., Khaledi, A., & Szoboszlay, S. (2021). Groundwater, soil and compost, as possible sources of virulent and antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Environmental Health Research*, 31(7), 848–860. <https://doi.org/10.1080/09603123.2019.1691719>
- Kessler, E., Safrins, M., Olson, J. C., & Ohman, D. E. (1993). Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* Is a Staphylolytic Protease. *Journal of biological chemistry*, 268(10), 7503–7508. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)53203-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)53203-8)
- Khaledi, A., Weimann, A., Schniederjans, M., Asgari, E., Kuo, T.-H., Oliver, A., Cabot, G., Kola, A., Gastmeier, P., Hogardt, M., Jonas, D., Mofrad, M. R., Bremges, A., McHardy, A. C., & Häussler, S. (2020). Predicting antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* with machine learning-enabled molecular diagnostics. *EMBO Molecular Medicine*, 12(3), e10264. <https://doi.org/10.15252/emmm.201910264>
- Khan, A. A., & Cerniglia, C. E. (1994). Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10), 3739–3745. <https://doi.org/10.1128/aem.60.10.3739-3745.1994>
- Khan, M., Summers, S., Rice, S. A., Stapleton, F., Willcox, M. D. P., & Subedi, D. (2020). Acquired fluoroquinolone resistance genes in corneal isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 85, 104574. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104574>

- Kidd, T. J., Ritchie, S. R., Ramsay, K. A., Grimwood, K., Bell, S. C., & Rainey, P. B. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Exhibits Frequent Recombination, but Only a Limited Association between Genotype and Ecological Setting. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044199>
- Kim, S. K., & Lee, J. H. (2016). Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiology*, 54(2), 71–85. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-5528-7>
- King, J. D., Kocíncová, D., Westman, E. L., & Lam, J. S. (2009). Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*, 15(5), 261–312. <https://doi.org/10.1177/1753425909106436>
- Kiratisin, P., Tucker, K. D., & Passador, L. (2002). LasR, a transcriptional activator of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes, functions as a multimer. *Journal of Bacteriology*, 184(17), 4912–4919. <https://doi.org/10.1128/JB.184.17.4912-4919.2002>
- Kiyaga, S., Kyany'a, C., Muraya, A. W., Smith, H. J., Mboowa, G., & Musila, L. (2022). Genetic diversity, distribution, and genomic characterization of antibiotic resistance and virulence of clinical *Pseudomonas aeruginosa* Strains in Kenya. *Frontiers in Microbiology*, 13, 835403. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.835403>
- Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C. F., & Tümmler, B. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Frontiers in Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00150>
- Kocsis, B., Gulyás, D., & Szabó, D. (2021). Diversity and Distribution of Resistance Markers in *Pseudomonas aeruginosa* International High-Risk Clones. *Microorganisms*, 9(2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9020359>
- Köhler, T., Buckling, A., & van Delden, C. (2009). Cooperation and virulence of clinical *Pseudomonas aeruginosa* populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(15), 6339–6344. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811741106>
- Köhler, T., Michéa-Hamzehpour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L. K., & Pechère, J. C. (1997). Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 23(2), 345–354. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.2281594.x>
- Kos, V. N., Déraspe, M., McLaughlin, R. E., Whiteaker, J. D., Roy, P. H., Alm, R. A., Corbeil, J., & Gardner, H. (2015). The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(1), 427–436. <https://doi.org/10.1128/AAC.03954-14>
- Kostylev, M., Kim, D. Y., Smalley, N. E., Salukhe, I., Greenberg, E. P., & Dandekar, A. A. (2019). Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing hierarchy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(14), 7027–7032. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819796116>
- Kothari, A., Kumar, S. K., Singh, V., Kumar, P., Kaushal, K., Pandey, A., Jain, N., & Omar, B. J. (2022). Association of multidrug resistance behavior of clinical *Pseudomonas aeruginosa* to pigment coloration. *European Journal of Medical Research*, 27(1), 120. <https://doi.org/10.1186/S40001-022-00752-6>

- Kottara, A., Hall, J. P. J., Harrison, E., & Brockhurst, M. A. (2018). Variable plasmid fitness effects and mobile genetic element dynamics across *Pseudomonas* species. *FEMS Microbiology Ecology*, *94*(1). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix172>
- Kulasekara, B. R., Kulasekara, H. D., Wolfgang, M. C., Stevens, L., Frank, D. W., & Lory, S. (2006). Acquisition and Evolution of the *exoU* Locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *188*(11), 4037. <https://doi.org/10.1128/JB.02000-05>
- Kung, V. L., Ozer, E. A., & Hauser, A. R. (2010). The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *74*(4), 621–641. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00027-10>
- Kus, J., Tullis, D., Cvitkovitch, D., & Burrows, L. (2004). Significant differences in type IV pilin allele distribution among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis (CF) versus non-CF patients. *Microbiology (Reading, England)*, *150*, 1315–1326. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26822-0>
- Kus, J. V., Kelly, J., Tessier, L., Harvey, H., Cvitkovitch, D. G., & Burrows, L. L. (2008). Modification of *Pseudomonas aeruginosa* Pa5196 type IV Pilins at multiple sites with D-Araf by a novel GT-C family Arabinosyltransferase, TfpW. *Journal of Bacteriology*, *190*(22), 7464–7478. <https://doi.org/10.1128/JB.01075-08>
- Laarman, A. J., Bardoel, B. W., Ruyken, M., Fernie, J., Milder, F. J., van Strijp, J. A. G., & Rooijackers, S. H. M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease Blocks Complement Activation via the Classical and Lectin Pathways. *The Journal of Immunology*, *188*(1), 386–393. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1102162>
- Laborda, P., Sanz-García, F., Hernando-Amado, S., & Martínez, J. L. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: an antibiotic resilient pathogen with environmental origin. *Current Opinion in Microbiology*, *64*, 125–132. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2021.09.010>
- Laborda, P., Hernando-Amado, S., Martínez, J. L., & Sanz-García, F. (2022). Antibiotic Resistance in *Pseudomonas*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1386*, 117–143. https://doi.org/10.1007/978-3-031-08491-1_5/COVER
- Lam, J. S., Taylor, V. L., Islam, S. T., Hao, Y., & Kocíncová, D. (2011). Genetic and functional diversity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Frontiers in Microbiology*, *2*. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2011.00118>
- Lamers, R. P., Cavallari, J. F., & Burrows, L. L. (2013). The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PAβN) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria. *PLoS One*, *8*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060666>
- Lanza, V. F., de Toro, M., Garcillán-Barcia, M. P., Mora, A., Blanco, J., Coque, T. M., & de la Cruz, F. (2014). Plasmid flux in *Escherichia coli* ST131 sublineages, analyzed by plasmid constellation network (PLACNET), a new method for plasmid reconstruction from whole genome sequences. *PLoS Genetics*, *10*(12), e1004766. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004766>
- Larsson, D. G. J., & Flach, C. F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. In *Nature Reviews Microbiology*, *20* (5), 257–269. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>

- Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., & Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. In *Trends in Molecular Medicine*, 10 (12), 599–606. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.10.002>
- Lebreton, F., Snesrud, E., Hall, L., Mills, E., Galac, M., Stam, J., Ong, A., Maybank, R., Kwak, Y. I., Johnson, S., Julius, M., Ly, M., Swierczewski, B., Waterman, P. E., Hinkle, M., Jones, A., Lesho, E., Bennett, J. W., & McGann, P. (2021). A panel of diverse *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates for research and development. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 3(4),179. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab179>
- Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, 6(1), 26–41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
- Lee, K., & Yoon, S. S. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27 (6), 1053–1064. <https://doi.org/10.4014/jmb.1611.11056>
- Lee, D. J., Jo, A. R., Jang, M. C., Nam, J., Choi, H. J., Choi, G.-W., Sung, H. Y., Bae, H., Ku, Y.-G., & Chi, Y.-T. (2018). Analysis of two quorum sensing-deficient isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*, 119, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.014>
- Lerminiaux, N. A., & Cameron, A. D. S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(1), 34–44. <https://doi.org/10.1139/CJM-2018-0275>
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(1), 293–296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Li, Q., Mao, S., Wang, H., & Ye, X. (2022). The Molecular Architecture of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Inhibitors. *Marine Drugs*, 20(8). <https://doi.org/10.3390/MD20080488>
- Lin, J., Huang, S., Liu, M., Lin, L., Gu, J., & Duan, F. (2022). Endophthalmitis Caused by *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Characteristics, Outcomes, and Antibiotics Sensitivities. *Journal of Ophthalmology*, 2022, 1265556. <https://doi.org/10.1155/2022/1265556>
- Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 582–610. <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>
- Liu, B., Zheng, D., Jin, Q., Chen, L., & Yang, J. (2019). VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D687–D692. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1080>
- Llamas, M. A., & Sánchez-Jiménez, A. (2022). Iron Homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*: Targeting Iron Acquisition and Storage as an Antimicrobial Strategy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1386, 29–68. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-08491-1>
- Lloyd, M. G., Vossler, J. L., Nomura, C. T., & Moffat, J. F. (2019). Blocking RpoN reduces virulence of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients and increases antibiotic sensitivity in a laboratory strain. *Scientific Reports*, 9(1), 6677. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43060-6>

- Lomholt, J. A., Poulsen, K., & Kilian, M. (2001). Epidemic population structure of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a clone that is pathogenic to the eye and that has a distinct combination of virulence factors. *Infection and Immunity*, 69(10), 6284–6295. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6284-6295.2001>
- Lomovskaya, O., Warren, M. S., Lee, A., Galazzo, J., Fronko, R., Lee, M., Blais, J., Cho, D., Chamberland, S., Renau, T., Leger, R., Hecker, S., Watkins, W., Hoshino, K., Ishida, H., & Lee, V. J. (2001). Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(1), 105–116. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.1.105-116.2001>
- López-Causapé, C., de Dios-Caballero, J., Cobo, M., Escribano, A., Asensio, Ó., Oliver, A., Del Campo, R., Cantón, R., Solé, A., Cortell, I., Asensio, O., García, G., Martínez, M. T., Cols, M., Salcedo, A., Vázquez, C., Baranda, F., Girón, R., Quintana, E., ... Cantón, R. (2017). Antibiotic resistance and population structure of cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a Spanish multi-centre study. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 50(3), 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.03.034>
- López-Causapé, C., Cabot, G., Del Barrio-Tofiño, E., & Oliver, A. (2018). The Versatile Mutational Resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 685. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00685>
- Lorusso, A. B., Carrara, J. A., Barroso, C. D. N., Tuon, F. F., & Faoro, H. (2022). Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (24). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms232415779>
- Lozano, C., Azcona-Gutiérrez, J. M., Van Bambeke, F., & Sáenz, Y. (2018). Great phenotypic and genetic variation among successive chronic *Pseudomonas aeruginosa* from a cystic fibrosis patient. *PLoS One*, 13(9), e0204167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204167>
- Lu, Q., Eggimann, P., Luyt, C.-E., Wolff, M., Tamm, M., François, B., Mercier, E., Garbino, J., Laterre, P.-F., Koch, H., Gafner, V., Rudolf, M. P., Mus, E., Perez, A., Lazar, H., Chastre, J., & Rouby, J.-J. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes. *Critical Care*, 18(1), 17. <https://doi.org/10.1186/cc13697>
- Maatallah, M., Cheriaa, J., Backhrouf, A., Iversen, A., Grundmann, H., Do, T., Lanotte, P., Mastouri, M., Elghmati, M. S., Rojo, F., Mejdi, S., & Giske, C. G. (2011). Population Structure of *Pseudomonas aeruginosa* from Five Mediterranean Countries: Evidence for Frequent Recombination and Epidemic Occurrence of CC235. *PLOS ONE*, 6(10), e25617. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025617>
- Maeda, H., & Yamamoto, T. (1996). Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 377(4), 217–226. <https://doi.org/10.1515/BCHM3.1996.377.4.217>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

- Mahillon, J., & Chandler, M. (1998). Insertion sequences. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 62(3), 725–774. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.725-774.1998>
- Mahmoud, S. F., Fayez, M., Swelum, A. A., Alswat, A. S., Alkafafy, M., Alzahrani, O. M., Alsunaini, S. J., Almuslem, A., Al Amer, A. S., & Yusuf, S. (2022). Genetic Diversity, Biofilm Formation, and Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Cow, Camel, and Mare with Clinical Endometritis. *Veterinary Sciences*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/vetsci9050239>
- Malhotra, S., Hayes Jr, D., & Wozniak, D. J. (2019). Cystic fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the host-microbe interface. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(3), 10–1128.
- Mallikarjuna, P. V., & Dhanashree, B. (2023). Phenotypic and genotypic characterization of clinical *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 18(3), 480–487. <https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2022.10.012>
- Martínez, J. L. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, 321(5887), 365–367. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1159483>
- Maseda, H., Sawada, I., Saito, K., Uchiyama, H., Nakae, T., & Nomura, N. (2004). Enhancement of the *mexAB-oprM* efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the *mexEF-oprN* efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(4), 1320–1328. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.4.1320-1328.2004>
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., & Nishino, T. (2000). Contribution of the MexX-MexY-oprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(9), 2242–2246. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.9.2242-2246.2000>
- Mateu-Borrás, M., Zamorano, L., González-Alsina, A., Sánchez-Diener, I., Doménech-Sánchez, A., Oliver, A., & Albertí, S. (2022). Molecular Analysis of the Contribution of Alkaline Protease A and Elastase B to the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 816356. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.816356/BIBTEX>
- Matilla, M. A., Velando, F., Monteagudo-Cascales, E., & Krell, T. (2022). Flagella, Chemotaxis and Surface Sensing. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1386, 185–221. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-08491-1>
- Matsumoto, K. (2004). Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis. *Biological Chemistry*, 385(11), 1007–1016. <https://doi.org/10.1515/BC.2004.131>
- Mauch, R. M., Jensen, P. Ø., Moser, C., Levy, C. E., & Høiby, N. (2018). Mechanisms of humoral immune response against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 17(2), 143–152.
- McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology Spectrum*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017>
- Meyer, J.-M., Stintzi, A., De Vos, D., Cornelis, P., Tappe, R., Taraz, K., & Budzikiewicz, H. (1997). Use of siderophores to type pseudomonads: the three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology*, 143(1), 35–43. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-1-35>

- Mitchelmore, P. J., Randall, J., Bull, M. J., Moore, K. A., O'Neill, P. A., Paszkiewicz, K., Mahenthiralingam, E., Scotton, C. J., Sheldon, C. D., & Withers, N. J. (2018). Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in an unsegregated bronchiectasis cohort sharing hospital facilities with a cystic fibrosis cohort. *Thorax*, 73(7), 677–679. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-209889>
- Moradali, M. F., Donati, I., Sims, I. M., Ghods, S., & Rehm, B. H. A. (2015). Alginate Polymerization and Modification Are Linked in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio*, 6(3), 1–17. <https://doi.org/10.1128/MBIO.00453-15>
- Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>
- Morales, E., González-Valdez, A., Servín-González, L., & Soberón-Chávez, G. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing response in the absence of functional LasR and LasI proteins: the case of strain 148, a virulent dolphin isolate. *FEMS Microbiology Letters*, 364(12). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx119>
- Morales-Espinosa, R., Delgado, G., Espinosa-Camacho, F., Flores-Alanis, A., Rodriguez, C., Mendez, J. L., & Cravioto, A. (2024). *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from animal with high virulence genes content and highly sensitive to antimicrobials. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.02.023>
- Morin, C. D., Déziel, E., Gauthier, J., Levesque, R. C., & Lau, G. W. (2021). An Organ System-Based Synopsis of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Virulence*, 12(1), 1469–1507. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1926408>
- Mould, D. L., Finger, C. E., Botelho, N., Stuu, S. E., & Hogan, D. A. (2023). Citrate cross-feeding between *Pseudomonas aeruginosa* genotypes supports *lasR* mutant fitness. In *bioRxiv: the preprint server for biology*. <https://doi.org/10.1101/2023.05.30.542962>
- Moya, B., Dötsch, A., Juan, C., Blázquez, J., Zamorano, L., Haussler, S., & Oliver, A. (2009). Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS Pathogens*, 5(3), e1000353. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000353>
- Mukherjee, S., Moustafa, D., Smith, C. D., Goldberg, J. B., & Bassler, B. L. (2017). The RhIR quorum-sensing receptor controls *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and biofilm development independently of its canonical homoserine lactone autoinducer. *PLoS pathogens*, 13(7), e1006504. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006504>
- Mulet, X., Cabot, G., Ocampo-Sosa, A. A., Domínguez, M. A., Zamorano, L., Juan, C., Tubau, F., Rodríguez, C., Moyà, B., Peña, C., Martínez-Martínez, L., & Oliver, A. (2013). Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(11), 5527–5535. <https://doi.org/10.1128/AAC.01481-13>
- Woodford, N., Turton, J. F., & Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2011 Sep;35(5):736-55. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>

- Naas, T., Oueslati, S., Bonnin, R. A., Dabos, M. L., Zavala, A., Dortet, L., Retailleau, P., & Iorga, B. I. (2017). Beta-lactamase database (BLDB) - structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 917–919. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235>
- Nadal Jimenez, P., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., & Quax, W. J. (2012). The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(1), 46–65. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05007-11>
- Nageeb, W., Amin, D. H., Mohammedsaleh, Z. M., & Makharita, R. R. (2021). Novel molecular markers linked to *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antibiotics*, 10(1), 35.
- Najeeb, R., Masoodi, T., Muneer, K., Ommid, M., & Hussain, I. (2021). Effects of Awake Prone Positioning in Non-intubated Spontaneously Breathing COVID-19 Patients Requiring High Flow Oxygen Therapy in High Dependency Unit (HDU): An Observational Study. *Romanian Journal of Anaesthesia and Intensive Care*, 28(2), 91–97. <https://doi.org/10.2478/rjaic-2021-0016>
- Nasrin, S., Hegerle, N., Sen, S., Nkeze, J., Sen, S., Permala-Booth, J., Choi, M., Sinclair, J., Tapia, M. D., Johnson, J. K., Sow, S. O., Thaden, J. T., Fowler, V. G., Krogfelt, K. A., Brauner, A., Protonotariou, E., Christaki, E., Shindo, Y., Kwa, A. L., ... Tennant, S. M. (2022). Distribution of serotypes and antibiotic resistance of invasive *Pseudomonas aeruginosa* in a multi-country collection. *BMC Microbiology*, 22(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02427-4>
- Neoh, H. min, Tan, X. E., Sapri, H. F., & Tan, T. L. (2019). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 74. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2019.103935>
- Nguyen, Y., Jackson, S. G., Aidoo, F., Junop, M., & Burrows, L. L. (2010). Structural characterization of novel *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilins. *Journal of Molecular Biology*, 395(3), 491–503. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.10.070>
- Nicolau, C. J., & Oliver, A. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(1), 19–28. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70004-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70004-5)
- O'Connor, K., Zhao, C. Y., Mei, M., & Diggle, S. P. (2022). Frequency of quorum-sensing mutations in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different environments. *Microbiology (Reading, England)*, 168(12). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001265>
- O'Neill, J. (2014). Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on Antimicrobial Resistance*.
- Ocampo-Sosa, A. A., Fernández-Martínez, M., Cabot, G., Peña, C., Tubau, F., Oliver, A., & Martínez-Martínez, L. (2015). Draft Genome Sequence of the Quorum-Sensing and Biofilm-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Strain Pae221, Belonging to the Epidemic High-Risk Clone Sequence Type 274. *Genome Announcements*, 3(1). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01343-14>
- Ogunnariwo, J., & Hamilton Miller, J. M. T. (1975). Brown and red pigmented *Pseudomonas aeruginosa*: differentiation between melanin and pyorubrin. *Journal of Medical Microbiology*, 8(1), 199–203. <https://doi.org/10.1099/00222615-8-1-199>

- Olivares, J., Bernardini, A., Garcia-Leon, G., Corona, F., B Sanchez, M., & Martinez, J. L. (2013). The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 4, 103. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00103>
- Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C., & Juan, C. (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. In *Drug Resistance Updates*, 21–22, 41–59. Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.08.002>
- Oliver, A., Rojo-Molinero, E., Arca-Suarez, J., Bešli, Y., Bogaerts, P., Cantón, R., Cimen, C., Croughs, P. D., Denis, O., Giske, C. G., Graells, T., Daniel Huang, T.-D., Iorga, B. I., Karatuna, O., Kocsis, B., Kronenberg, A., López-Causapé, C., Malhotra-Kumar, S., Martínez, L. M., ... Jeannot, K. (2024). *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial susceptibility profiles, resistance mechanisms and international clonal lineages: update from ESGARS-ESCMID/ISARPAE Group. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 30(4), 469–480. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.12.026>
- Ortiz de la Rosa, J. M., Nordmann, P., & Poirel, L. (2020). PGI-associated CrpP-like fluoroquinolone-modifying enzymes among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* <https://doi.org/10.1128/AAC.00489-20>
- Ozer, E. A., Nnah, E., Didelot, X., Whitaker, R. J., & Hauser, A. R. (2019). The Population Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Is Characterized by Genetic Isolation of *exoU+* and *exoS+* Lineages. *Genome Biology and Evolution*, 11(1), 1780–1796. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz119>
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(22), 3691–3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>
- Palleroni, N.J. (1984) Genus *Pseudomonas*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1, 141–199. Krieg, N.R., Holt, J.G. (eds.) Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA.
- Palleroni, N. J. (2010). The *Pseudomonas* story. *Environmental Microbiology*, 12(6), 1377–1383. <https://doi.org/10.1111/J.1462-2920.2009.02041.X>
- Pan, Y., Xu, Y., Wang, Z., Fang, Y., & Shen, J. (2016). Overexpression of MexAB-OprM efflux pump in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Microbiology*, 198, 565–571.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. In *Biotechnology Advances*, 37 (1), 177–192. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Paredes Salido, F., & Roca Fernández, J. J. (2004). Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Offman*, 23(3), 116–124. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13070731>
- Partridge, S. R., Tsafnat, G., Coiera, E., & Iredell, J. R. (2009). Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(4), 757–784. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00175.x>

- Pearson, J. P., Pesci, E. C., & Iglewski, B. H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *Journal of bacteriology*, 179(18), 5756–5767. <https://doi.org/10.1128/jb.179.18.5756-5767.1997>
- Peeters, E., Nelis, H. J., & Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of microbiological methods*, 72(2), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.010>
- Pelegriñ, A. C., Palmieri, M., Mirande, C., Oliver, A., Moons, P., Goossens, H., & van Belkum, A. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: a clinical and genomics update. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(6). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab026>
- Peña, C., Cabot, G., Gómez-Zorrilla, S., Zamorano, L., Ocampo-Sosa, A., Murillas, J., Almirante, B., Pomar, V., Aguilar, M., Granados, A., Calbo, E., Rodríguez-Baño, J., Rodríguez-López, F., Tubau, F., Martínez-Martínez, L., Oliver, A., & Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI) (2015). Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 60(4), 539–548. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu866>
- Pérez-Vázquez, M., Sola-Campoy, P. J., Zurita, Á. M., Ávila, A., Gómez-Bertomeu, F., Solís, S., López-Urrutia, L., González-Barberá, E. M., Cercenado, E., Bautista, V., Lara, N., Aracil, B., Oliver, A., Campos, J., & Oteo-Iglesias, J. (2020). Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Spain: interregional dissemination of the high-risk clones ST175 and ST244 carrying *bla_{VIM-2}*, *bla_{VIM-1}*, *bla_{IMP-8}*, *bla_{VIM-20}* and *bla_{KPC-2}*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 56(1), 106026. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106026>
- Petit, S. M.-C., Lavenir, R., Colinon-Dupuich, C., Boukerb, A. M., Cholley, P., Bertrand, X., Freney, J., Doléans-Jordheim, A., Nazaret, S., Laurent, F., & Cournoyer, B. (2013). Lagooning of wastewaters favors dissemination of clinically relevant *Pseudomonas aeruginosa*. *Research in Microbiology*, 164(8), 856–866. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.06.007>
- Pirnay, J. P., Bilocq, F., Pot, B., Cornelis, P., Zizi, M., Van Eldere, J., Deschaght, P., Vaneechoutte, M., Jennes, S., Pitt, T., & De Vos, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS ONE*, 4(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007740>
- Poole, K. (2005). Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 479–487. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.479-487.2005>
- Poole, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the max. *Frontiers in Microbiology*, 2(4). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00065>
- Pottier, M., Castagnet, S., Gravey, F., Leduc, G., Sévin, C., Petry, S., Giard, J. C., Le Hello, S., & Léon, A. (2023). Antimicrobial Resistance and Genetic Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Equine and Other Veterinary Samples. *Pathogens*, 12(1), 64. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010064>
- Qian, Z., Hui, P., Han, L., Ling-Zhi, Y., Bo-Shun, Z., Jie, Z., Wan-Li, G., Nan, W., Shi-Jin, J., & Zhi-Jing, X. (2020). Serotypes and virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from mink and its pathogenicity in mink. *Microbial Pathogenesis*, 139, 103904. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103904>

- Qiao, M., Ying, G. G., Singer, A. C., & Zhu, Y. G. (2018). Review of antibiotic resistance in China and its environment. *Environment International*, *110*, 160–172. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2017.10.016>
- Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *7* (1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>
- Quiroz-Morales, S. E., García-Reyes, S., Ponce-Soto, G. Y., Servín-González, L., & Soberón-Chávez, G. (2022). Tracking the Origins of *Pseudomonas aeruginosa* Phylogroups by Diversity and Evolutionary Analysis of Important Pathogenic Marker Genes. *Diversity*, *14*(5). <https://doi.org/10.3390/d14050345>
- Quiroz-Morales, S. E., Muriel-Millán, L. F., Ponce-Soto, G. Y., González-Valdez, A., Castillo-Juárez, I., Servín-González, L., & Soberón-Chávez, G. (2023). *Pseudomonas aeruginosa* strains belonging to phylogroup 3 frequently exhibit an atypical quorum sensing response: the case of MAZ105, a tomato rhizosphere isolate. *Microbiology*, *169*(10). <https://doi.org/10.1099/mic.0.001401>
- Ramírez-Mata, A., Fernández-Domínguez, I. J., Nuñez-Reza, K. J., Xiqui-Vázquez, M. L., & Baca, B. E. (2014). Networks involving quorum sensing, cyclic-di-GMP and nitric oxide on biofilm production in bacteria. *Revista Argentina de Microbiología*, *46*(3), 242–255. [https://doi.org/10.1016/s0325-7541\(14\)70079-3](https://doi.org/10.1016/s0325-7541(14)70079-3)
- Ramsay, K., Wardell, S., Patrick, W., Brockway, B., Reid, D., Winstanley, C., Bell, S., & Lamont, I. (2019). Genomic and phenotypic comparison of environmental and patient-derived isolates of *Pseudomonas aeruginosa* suggest that antimicrobial resistance is rare within the environment. *BioRxiv*, 663674. <https://doi.org/10.1101/663674>
- Rattanachak, N., Weawsiangsang, S., Daowtak, K., Thongsri, Y., Ross, S., Ross, G., Nilsri, N., Baldock, R. A., Pongcharoen, S., Jongjitvimol, T., & Jongjitwimol, J. (2022). High-Throughput Transcriptomic Profiling Reveals the Inhibitory Effect of Hydroquinine on Virulence Factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*, *11*(10). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11101436>
- Recio, R., Sánchez-Diener, I., Viedma, E., Meléndez-Carmona, M. Á., Villa, J., Orellana, M. Á., Mancheño, M., Juan, C., Zamorano, L., Lora-Tamayo, J., Chaves, F., & Oliver, A. (2020). Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia isolates in a high-endemicity setting for ST175 and ST235 high-risk clones. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, *39*(4), 671–678. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03780-z>
- Recio, R., Viedma, E., González-Bodí, S., Villa, J., Orellana, M. Á., Mancheño-Losa, M., Lora-Tamayo, J., & Chaves, F. (2021). Clinical and bacterial characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* affecting the outcome of patients with bacteraemic pneumonia. *International journal of antimicrobial agents*, *58*(6), 106450. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106450>
- Rehman, A., Patrick, W. M., & Lamont, I. L. (2019). Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: new approaches to an old problem. *Journal of medical microbiology*, *68*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000873>

- Rehman, A., Jeukens, J., Levesque, R. C., & Lamont, I. L. (2021). Gene-Gene Interactions Dictate Ciprofloxacin Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and Facilitate Prediction of Resistance Phenotype from Genome Sequence Data. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(7), e0269620. <https://doi.org/10.1128/AAC.02696-20>
- Rello, J., Kalwaje Eshwara, V., Lagunes, L., Alves, J., Wunderink, R. G., Conway-Morris, A., Rojas, J. N., Alp, E., & Zhang, Z. (2019). A global priority list of the TOP TEn resistant Microorganisms (TOTEM) study at intensive care: a prioritization exercise based on multi-criteria decision analysis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 38(2), 319–323. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3428-y>
- Rice, L. B. (2008). Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESCAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(8), 1079–1081. <https://doi.org/10.1086/533452>
- Rice, L. B., & Bonomo, R. A. (2011). *Mechanisms of resistance to antibacterial agents*. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:82201340>
- Richardot, C., Plésiat, P., Fournier, D., Monlezun, L., Broutin, I., & Llanes, C. (2015). Carbapenem resistance in cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa* as a result of amino acid substitutions in porin OprD. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45(5), 529–532. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.12.029>
- Richardot, C., Juarez, P., Jeannot, K., Patry, I., Plésiat, P., & Llanes, C. (2016). Amino acid substitutions account for most MexS alterations in clinical *nfxC* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(4), 2302–2310. <https://doi.org/10.1128/AAC.02622-15>
- Rietsch, A., Vallet-Gely, I., Dove, S. L., & Mekalanos, J. J. (2005). ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(22), 8006. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0503005102>
- Rodríguez-Martínez, J.-M., Poirel, L., & Nordmann, P. (2009). Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5), 1766–1771. <https://doi.org/10.1128/AAC.01410-08>
- Rojo-Bezares, B., Estepa, V., de Toro, M., Undabeitia, E., Olarte, I., Torres, C., & Sáenz, Y. (2011). A novel class 1 integron array carrying blaVIM-2 genes and a new insertion sequence in a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a Spanish hospital. In *Journal of medical microbiology*, 60 (7), 1053–1054. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.030973-0>
- Rojo-Bezares, B., Estepa, V., Cebollada, R., de Toro, M., Somalo, S., Seral, C., Castillo, F. J., Torres, C., & Sáenz, Y. (2014). Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital: Characterization of metallo-beta-lactamases, porin OprD and integrons. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(3–4), 405–414. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.01.001>
- Rojo-Bezares, B., Casado, C., Cenicerros, T., López, M., Chichón, G., Lozano, C., Ruiz-Roldán, L., & Sáenz, Y. (2024). *Pseudomonas aeruginosa* from river water: antimicrobial resistance, virulence and molecular typing. *FEMS Microbiology Ecology*. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae028>

- Römling, U., Fiedler, B., Bosshammer, J., Grothues, D., Greipel, J., von der Hardt, H., & Tümmler, B. (1994). Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 170(6), 1616–1621. <https://doi.org/10.1093/infdis/170.6.1616>
- Roy, P. H., Tetu, S. G., Larouche, A., Elbourne, L., Tremblay, S., Ren, Q., Dodson, R., Harkins, D., Shay, R., Watkins, K., Mahamoud, Y., & Paulsen, I. T. (2010). Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS ONE*, 5(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008842>
- Ruhal, R., Antti, H., Rzhepishevskaya, O., Boulanger, N., Barbero, D., Wai, S., Uhlin, B. E., & Ramstedt, M. (2015). Im formation by lipopolysaccharide mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.01.030>
- Ruiz, J. (2019). CrpP, a passenger or a hidden stowaway in the *Pseudomonas aeruginosa* genome? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(11), 3397–3399. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz316>
- Ruiz-Roldán, L., Bellés, A., Bueno, J., Azcona-Gutiérrez, J. M., Rojo-Bezares, B., Torres, C., Castillo, F. J., Sáenz, Y., & Seral, C. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Spanish Children: Occurrence in Faecal Samples, Antimicrobial Resistance, Virulence, and Molecular Typing. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8060178>
- Ruiz-Roldán, L., Rojo-Bezares, B., de Toro, M., López, M., Toledano, P., Lozano, C., Chichón, G., Alvarez-Erviti, L., Torres, C., & Sáenz, Y. (2020). Antimicrobial resistance and virulence of *Pseudomonas* spp. among healthy animals: concern about exolysin ExlA detection. *Scientific Reports*, 10(1), 11667. <https://doi.org/10.1038/S41598-020-68575-1>
- Ruiz-Roldán, L., Rojo-Bezares, B., Lozano, C., López, M., Chichón, G., Torres, C., & Sáenz, Y. (2021). Occurrence of *Pseudomonas* spp. in Raw Vegetables: Molecular and Phenotypical Analysis of Their Antimicrobial Resistance and Virulence-Related Traits. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312626>
- Rutherford, V., Yom, K., Ozer, E. A., Pura, O., Hughes, A., Murphy, K. R., Cudzilo, L., Mitchell, D., & Hauser, A. R. (2018). Environmental reservoirs for exoS⁺ and exoU⁺ strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology Reports*, 10(4), 485–492. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12653>
- Sánchez-Diener, I., Zamorano, L., López-Causapé, C., Cabot, G., Mulet, X., Peña, C., Del Campo, R., Cantón, R., Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., Arcos, S. C., Navas, A., & Oliver, A. (2017). Interplay among Resistance Profiles, High-Risk Clones, and Virulence in the *Caenorhabditis elegans* *Pseudomonas aeruginosa* Infection Model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(12), e01586-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01586-17>
- Sánchez-Jiménez, A., Lorente, M. A. L., & Marcos-Torres, F. J. (2023). *Transcriptional regulators controlling virulence in Pseudomonas aeruginosa*. <https://doi.org/10.3390/ijms241511895>
- Sanz-García, F., Gil-Gil, T., Laborda, P., Ochoa-Sánchez, L. E., Martínez, J. L., & Hernando-Amado, S. (2021). Coming from the wild: Multidrug resistant opportunistic pathogens presenting a primary, not human-linked, environmental habitat. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15). <https://doi.org/10.3390/ijms22158080>

- Sastre-Femenia, M. À., Fernández-Muñoz, A., Gomis-Font, M. A., Taltavull, B., López-Causapé, C., Arca-Suárez, J., Martínez-Martínez, L., Cantón, R., Larrosa, N., Oteo-Iglesias, J., Zamorano, L., Oliver, A., Galán-Sánchez, F., Gracia-Ahufinger, I., Liébana-Martos, C., Roldán, C., Sánchez-Calvo, J. M., Clavijo, E., Mora-Navas, L., ... Barrios-Andrés, J. L. (2023). *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic susceptibility profiles, genomic epidemiology and resistance mechanisms: a nation-wide five-year time lapse analysis. *The Lancet Regional Health. Europe*, 34. <https://doi.org/10.1016/J.LANEPE.2023.100736>
- Sawa, T., Yahr, T. L., Ohara, M., Kurahashi, K., Gropper, M. A., Wiener-Kronish, J. P., & Fkank, D. W. (1999). Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nature Medicine* 1999 5:4, 5(4), 392–398. <https://doi.org/10.1038/7391>
- Sawa, T., Shimizu, M., Moriyama, K., & Wiener-Kronish, J. P. (2014). Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. *Critical Care*, 18(6), 668. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0668-9>
- Sawa, T., Momiyama, K., Mihara, T., Kainuma, A., Kinoshita, M., & Moriyama, K. (2020). Molecular epidemiology of clinically high-risk *Pseudomonas aeruginosa* strains: Practical overview. In *Microbiology and Immunology*, 64 (5), 331–344. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12776>
- Schaber, J. A., Carty, N. L., McDonald, N. A., Graham, E. D., Cheluvappa, R., Griswold, J. A., & Hamood, A. N. (2004). Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 53 (9), 841–853. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45617-0>
- Schalk, I. J., & Perraud, Q. (2023). *Pseudomonas aeruginosa* and its multiple strategies to access iron. *Environmental Microbiology*, 25(4), 811–831. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16328>
- Schuster, M., & Greenberg, E. P. (2007). Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. *BMC genomics*, 8, 287. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-287>
- Scribner, M. R., Stephens, A. C., Huang, J. L., Richardson, A. R., & Cooper, V. S. (2022). The Nutritional Environment Is Sufficient To Select Coexisting Biofilm and Quorum Sensing Mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 204(3), e0044421. <https://doi.org/10.1128/JB.00444-21>
- Seemann T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* (Oxford, England), 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Seemann, T. (2015). Snippy: rapid haploid variant calling and core SNP phylogeny. GitHub. Available at: github.com/tseemann/snippy.
- Selezska, K., Kazmierczak, M., Müsken, M., Garbe, J., Schobert, M., Häussler, S., Wiehlmann, L., Rohde, C., & Sikorski, J. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited under environmental focus: impact of water quality and phage pressure. *Environmental Microbiology*, 14(8), 1952–1967. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02719.x>
- Selim, H., Tharwat, ·, Radwan, E. E., Amany, ·, & Reyad, M. (2022). Regulation of T3SS synthesis, assembly and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. 204, 468. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03068-5>

- Shen, D.-K., Quenee, L., Bonnet, M., Kuhn, L., Derouazi, M., Lamotte, D., Toussaint, B., & Polack, B. (2008). Orf1/SpcS chaperones ExoS for type three secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomedical and Environmental Sciences: BES*, 21(2), 103–109. [https://doi.org/10.1016/S0895-3988\(08\)60014-8](https://doi.org/10.1016/S0895-3988(08)60014-8)
- Shouman, H., Said, H. S., Kenawy, H. I., & Hassan, R. (2023). Molecular and biological characterization of pyocyanin from clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Cell Factories*, 22(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02169-0>
- Sid Ahmed, M. A., Khan, F. A., Hadi, H. A., Skariah, S., Sultan, A. A., Salam, A., Al Khal, A. L., Söderquist, B., Ibrahim, E. B., Omrani, A. S., & Jass, J. (2022). Association of *bla*_{VIM-2}, *bla*_{PDC-35}, *bla*_{OXA-10}, *bla*_{OXA-488} and *bla*_{VEB-9} β -Lactamase Genes with Resistance to Ceftazidime-Avibactam and Ceftolozane-Tazobactam in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(2), 130. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020130>
- Silva, A., Silva, V., López, M., Rojo-Bezares, B., Carvalho, J. A., Castro, A. P., Sáenz, Y., Igrejas, G., & Poeta, P. (2023). Antimicrobial Resistance, Genetic Lineages, and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Human Infections: An Emerging One Health Concern. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(8), 1248. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12081248>
- Slekovec, C., Plantin, J., Cholley, P., Thouverez, M., Talon, D., Bertrand, X., & Hocquet, D. (2012). Tracking Down Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in a Wastewater Network. *PLOS ONE*, 7(12), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049300>
- Smith, E. E., Sims, E. H., Spencer, D. H., Kaul, R., & Olson, M. V. (2005). Evidence for diversifying selection at the pyoverdine locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 187(6), 2138–2147. <https://doi.org/10.1128/JB.187.6.2138-2147.2005>
- Smith, E. E., Buckley, D. G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., Miller, S. I., Ramsey, B. W., Speert, D. P., Moskowitz, S. M., Burns, J. L., Kaul, R., & Olson, M. V. (2006). Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(22), 8487. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0602138103>
- Sobel, M. L., Hocquet, D., Cao, L., Plesiat, P., & Poole, K. (2005). Mutations in PA3574 (*nalD*) lead to increased MexAB-OprM expression and multidrug resistance in laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 1782–1786. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1782-1786.2005>
- Song, L., Yang, H., Meng, X., Su, R., Cheng, S., Wang, H., Bai, X., Guo, D., Lü, X., Xia, X., & Shi, C. (2023a). Inhibitory Effects of Trans-Cinnamaldehyde Against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *Foodborne Pathogens and Disease*, 20(2), 47–58. <https://doi.org/10.1089/fpd.2022.0073>
- Song, Y., Mu, Y., Wong, N.-K., Yue, Z., Li, J., Yuan, M., Zhu, X., Hu, J., Zhang, G., Wei, D., Wang, C., Wu, W., Bai, F., & Feng, J. (2023b). Emergence of hypervirulent *Pseudomonas aeruginosa* pathotypically armed with co-expressed T3SS effectors ExoS and ExoU. *HLife*, 1(1), 44–56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hlife.2023.02.001>
- Stevens, A. M., Schuster, M., & Rumbaugh, K. P. (2012). *Working Together for the Common Good: Cell-Cell Communication in Bacteria MEETING REVIEW*. <https://doi.org/10.1128/JB.00143-12>

- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowallk, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., ... Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959–964. <https://doi.org/10.1038/35023079>
- Subedi, D., Vijay, A. K., Kohli, G. S., Rice, S. A., & Willcox, M. (2018). Comparative genomics of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different geographic sites. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34020-7>
- Sullivan, M. J., Petty, N. K., & Beatson, S. A. (2011). Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(7), 1009–1010. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr039>
- Suresh, M., Nithya, N., Jayasree, P. R., Vimal, K. P., & Manish Kumar, P. R. (2018). Mutational analyses of regulatory genes, *mexR*, *nalC*, *nalD* and *mexZ* of *mexAB-oprM* and *mexXY* operons, in efflux pump hyperexpressing multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 34(6), 83. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2465-0>
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., ... Magrini, N. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet. Infectious Diseases*, 18(3), 318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Tamma, P. D., Aitken, S. L., Bonomo, R. A., Mathers, A. J., Van Duin, D., & Clancy, C. J. (2022). Infectious Diseases Society of America 2022 Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β -lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-*P. aeruginosa*). *Clinical Infectious Diseases*, 75(2), 187–212. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac268>
- Tenover, F. C., Nicolau, D. P., & Gill, C. M. (2022). Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*—an emerging challenge. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2048972>
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. In *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (22), 1–25). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>
- Thrane, S. W., Taylor, V. L., Lund, O., Lam, J. S., & Jelsbak, L. (2016). Application of Whole-Genome Sequencing Data for O-Specific Antigen Analysis and In Silico Serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(7), 1782–1788. <https://doi.org/10.1128/JCM.00349-16>
- Tielen, P., Strathmann, M., Jaeger, K.-E., Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2005). Alginate acetylation influences initial surface colonization by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological Research*, 160, 165–176. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.11.003>
- Torres, R. T., Cunha, M. V, Ferreira, H., Fonseca, C., & Palmeira, J. D. (2022). A high-risk carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone detected in red deer (*Cervus elaphus*) from Portugal. *The Science of the Total Environment*, 829, 154699. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154699>

- Treepong, P., Kos, V. N., Guyeux, C., Blanc, D. S., Bertrand, X., Valot, B., & Hocquet, D. (2018). Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24(3), 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.018>
- Urbanowski, M. L., Lykken, G. L., & Yahr, T. L. (2005). A secreted regulatory protein couples transcription to the secretory activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(28), 9930. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0504405102>
- Urbanowski, M. L., Brutinel, E. D., & Yahr, T. L. (2007). Translocation of ExsE into Chinese Hamster Ovary Cells Is Required for Transcriptional Induction of the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System. *Infection and Immunity*, 75(9), 4432. <https://doi.org/10.1128/IAI.00664-07>
- van Belkum, A., Soriaga, L. B., LaFave, M. C., Akella, S., Veyrieras, J. B., Barbu, E. M., Shortridge, D., Blanc, B., Hannum, G., Zambardi, G., Miller, K., Enright, M. C., Mugnier, N., Brami, D., Schicklin, S., Felderman, M., Schwartz, A. S., Richardson, T. H., Peterson, T. C., Hubby, B., ... Cady, K. C. (2015). Phylogenetic Distribution of CRISPR-Cas Systems in Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, 6(6), e01796-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01796-15>
- van der Putten, B. C. L., Remondini, D., Pasquini, G., Janes, V. A., Matamoros, S., & Schultsz, C. (2019). Quantifying the contribution of four resistance mechanisms to ciprofloxacin MIC in *Escherichia coli*: a systematic review. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(2), 298–310. <https://doi.org/10.1093/jac/dky417>
- Van Mansfeld, R., Willems, R., Brimicombe, R., Heijerman, H., Van Berkhout, F. T., Wolfs, T., van der Ent, C., & Bonten, M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* genotype prevalence in Dutch cystic fibrosis patients and age dependency of colonization by various *P. aeruginosa* sequence types. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(12), 4096–4101. <https://doi.org/10.1128/JCM.01462-09>
- Venkateswaran, P., Vasudevan, S., David, H., Shaktivel, A., Shanmugam, K., Neelakantan, P., & Solomon, A. P. (2023). Revisiting ESKAPE Pathogens: virulence, resistance, and combating strategies focusing on quorum sensing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2023.1159798>
- Viducic, D., Ono, T., Murakami, K., Katakami, M., Susilowati, H., & Miyake, Y. (2007). *rpoN* gene of *Pseudomonas aeruginosa* alters its susceptibility to quinolones and carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1455–1462. <https://doi.org/10.1128/AAC.00348-06>
- Viedma, E., Juan, C., Villa, J., Barrado, L., Orellana, M. A., Sanz, F., Otero, J. R., Oliver, A., & Chaves, F. (2012). VIM-2-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 clone, Spain. *Emerging infectious diseases*, 18(8), 1235–1241. <https://doi.org/10.3201/eid1808.111234>
- Vielva, L., de Toro, M., Lanza, V. F., & de la Cruz, F. (2017). PLACNETw: a web-based tool for plasmid reconstruction from bacterial genomes. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 33(23), 3796–3798. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx462>
- Vincent, A. T., Freschi, L., Jeukens, J., Kukavica-Ibrulj, I., Emond-Rheault, J.-G., Leduc, A., Boyle, B., Jean-Pierre, F., Groleau, M.-C., Déziel, E., Barbeau, J., Charette, S. J., & Levesque, R. C. (2017). Genomic characterisation of environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dental unit waterlines

- revealed the insertion sequence ISPa11 as a chaotropic element. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(9). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix106>
- Walasek, P., & Honek, J. F. (2005). Nonnatural amino acid incorporation into the methionine 214 position of the metzincin *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease. *BMC Biochemistry*, 6, 21. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-6-21>
- Wang, Y., Gao, L., Rao, X., Wang, J., Yu, H., Jiang, J., Zhou, W., Wang, J., Xiao, Y., Li, M., Zhang, Y., Zhang, K., Shen, L., & Hua, Z. (2018). Characterization of *lasR*-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30813-y>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(1), 296–303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Wattam, A. R., Brettin, T., Davis, J. J., Gerdes, S., Kenyon, R., Machi, D., Mao, C., Olson, R., Overbeek, R., Pusch, G. D., Shukla, M. P., Stevens, R., Vonstein, V., Warren, A., Xia, F., & Yoo, H. (2018). Assembly, Annotation, and Comparative Genomics in PATRIC, the All Bacterial Bioinformatics Resource Center. *Methods in Molecular Biology*, 1704, 79–101. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7463-4_4
- Wei, Q., Tarighi, S., Dötsch, A., Häussler, S., Müsken, M., Wright, V. J., Cámara, M., Williams, P., Haenen, S., Boerjan, B., Bogaerts, A., Vierstraete, E., Verleyen, P., Schoofs, L., Willaert, R., De Groote, V. N., Michiels, J., Vercammen, K., Crabbé, A., & Cornelis, P. (2011). Phenotypic and genome-wide analysis of an antibiotic-resistant small colony variant (SCV) of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, 6(12), e29276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029276>
- Weldhagen, G. F., Poirel, L., & Nordmann, P. (2003). Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(8), 2385–2392. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.8.2385-2392.2003>
- Whiteley, M., Lee, K. M., & Greenberg, E. P. (1999). Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 13904. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.24.13904>
- Wilderman, P. J., Vasil, A. I., Johnson, Z., & Vasil, M. L. (2001). 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. *Molecular Microbiology*, 39(2), 291–303. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02282.x>
- Williams McMackin, E. A., Djagne, L., Corley, J. M., & Yahr, T. L. (2019). Fitting Pieces into the Puzzle of *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System Gene Expression. *Journal of Bacteriology*, 201(13). <https://doi.org/10.1128/JB.00209-19>
- Williams, D., Evans, B., Haldenby, S., Walshaw, M. J., Brockhurst, M. A., Winstanley, C., & Paterson, S. (2015). Divergent, coexisting *Pseudomonas aeruginosa* lineages in chronic cystic fibrosis lung infections. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 191(7), 775–785. <https://doi.org/10.1164/rccm.201409-1646OC>

- Winsor, G. L., Griffiths, E. J., Lo, R., Dhillon, B. K., Shay, J. A., & Brinkman, F. S. L. (2016). Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D646-53. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1227>
- Winstanley, C., O'Brien, S., & Brockhurst, M. A. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. *Trends in Microbiology*, 24(5), 327-337. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.008>
- Woolhouse, M. E. J., & Ward, M. J. (2013). Microbiology. Sources of antimicrobial resistance. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6153), 1460-1461. <https://doi.org/10.1126/science.1243444>
- Wu, W., Jin, Y., Bai, F., & Jin, S. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Medical Microbiology*, 753-767. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00041-X>
- Wu, T., Zhang, Z., Li, T., Dong, X., Wu, D., Zhu, L., Xu, K., & Zhang, Y. (2024). The type III secretion system facilitates systemic infections of *Pseudomonas aeruginosa* in the clinic. *Microbiology Spectrum*, 12(1), e0222423. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02224-23>
- Xu, C., Pan, X., Bai, F., Wu, W., & Jin, Y. (2021a). Mechanisms for development of ciprofloxacin resistance in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 598291. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.598291>
- Xu, Y., Zhang, Y., Zheng, X., Yu, K., Sun, Y., Liao, W., Jia, H., Xu, C., Zhou, T., & Shen, M. (2021b). The prevalence and functional characteristics of CrpP-like in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from China. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 40(12), 2651-2656. <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04287-2>
- Yahr, T. L., Barbieri, J. T., & Frank, D. W. (1996). Genetic relationship between the 53- and 49-kilodalton forms of exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 178(5), 1412. <https://doi.org/10.1128/JB.178.5.1412-1419.1996>
- Yahr, T. L., & Wolfgang, M. C. (2006). Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Molecular Microbiology*, 62(3), 631-640. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2006.05412.X>
- Yin, R., Cheng, J., Wang, J., Li, P., & Lin, J. (2022). Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infectious biofilms: Challenges and strategies. *Frontiers in Microbiology*, 13, 955286. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.955286>
- Yoon, E.-J., & Jeong, S. H. (2021). Mobile Carbapenemase Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.614058>
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F. M., & Larsen, M. V. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2640-2644. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>
- Zeng, L., & Jin, S. (2003). Is under the Positive Control of Surrogate Regulator HpaA. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(12), 3867-3876. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.12.3867-3876.2003>

- Zhao, K., Tseng, S., Beckerman, B., Jin, F., Gibiansky, M. L., Harrison, J. J., Luijten, E., Parsek, M. R., & Wong, G. C. L. (2013). Psl trails guide exploration and microcolony formation in early *P. aeruginosa* biofilms HHS Public Access. *Nature*, 497(7449), 388–391. <https://doi.org/10.1038/nature12155>
- Zhao, Y., Chen, D., Ji, B., Zhang, X., Anbo, M., & Jelsbak, L. (2023). Whole-genome sequencing reveals high-risk clones of *Pseudomonas aeruginosa* in Guangdong, China. *Front. Microbiol.* 14, 1117017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1117017>
- Zhu, H., Bandara, R., Conibear, T. C. R., Thuruthyil, S. J., Rice, S. A., Kjelleberg, S., Givskov, M., & Willcox, M. D. P. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* with lasI quorum-sensing deficiency during corneal infection. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(6), 1897–1903. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-0980>
- Zhu, Z., Yang, H., Yin, Z., Jing, Y., Zhao, Y., Fu, H., Du, H., & Zhou, D. (2021). Diversification and prevalence of the quinolone resistance *crpP* genes and the *crpP*-carrying Tn6786-related integrative and conjugative elements in *Pseudomonas aeruginosa*. *Virulence*, 12(1), 2162–2170. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1962160>
- Zolfaghar, I., Evans, D. J., & Fleiszig, S. M. J. (2003). Twitching Motility Contributes to the Role of Pili in Corneal Infection Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity*, 71(9), 5389–5393. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.5389-5393.2003>
- Zubyk, H. L., & Wright, G. D. (2021). CrpP Is Not a Fluoroquinolone-Inactivating Enzyme. In *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 65 (8), e0077321. <https://doi.org/10.1128/AAC.00773-21>

Article

Spread of *Pseudomonas aeruginosa* ST274 Clone in Different Niches: Resistome, Virulome, and Phylogenetic Relationship

Gabriela Chichón ¹, María López ^{1,*}, María de Toro ², Lidia Ruiz-Roldán ³, Beatriz Rojo-Bezares ¹
and Yolanda Sáenz ^{1,*}

¹ Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), C/Piqueras 98, 26006 Logroño, Spain

² Plataforma de Genómica y Bioinformática, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), C/Piqueras 98, 26006 Logroño, Spain

³ Joint Research Unit "Infection and Public Health" FISABIO-University of Valencia, Institute for Integrative Systems Biology I2SysBio (CSIC-UV), Av. de Catalunya 21, 46020 Valencia, Spain

* Correspondence: mlopezm@riojasalud.es (M.L.); ysaenz@riojasalud.es (Y.S.); Tel.: +34-941-27-88-68 (Y.S.); Fax: +34-941-27-88-87 (Y.S.)

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa* ST274 is an international epidemic high-risk clone, mostly associated with hospital settings and appears to colonize cystic fibrosis (CF) patients worldwide. To understand the relevant mechanisms for its success, the biological and genomic characteristics of 11 ST274-*P. aeruginosa* strains from clinical and non-clinical origins were analyzed. The extensively drug-resistant (XDR/DTR), the non-susceptible to at least one agent (modR), and the *lasR*-truncated (by *ISPsp7*) strains showed a chronic infection phenotype characterized by loss of serotype-specific antigenicity and low motility. Furthermore, the XDR/DTR and modR strains presented low pigment production and biofilm formation, which were very high in the *lasR*-truncated strain. Their whole genome sequences were compared with other 14 ST274-*P. aeruginosa* genomes available in the NCBI database, and certain associations have been primarily detected: *bla*_{OXA-486} and *bla*_{PDC-24} genes, serotype O:3, *exoS*⁺/*exoU*⁻ genotype, group V of type IV pili, and pyoverdine locus class II. Other general molecular markers highlight the absence of *vqsM* and *pldA/tleS* genes and the presence of the same mutational pattern in genes involving two-component sensor-regulator systems PmrAB and CreBD, exotoxin A, quorum-sensing RhlI, beta-lactamase expression regulator AmpD, PBP1A, or FusA2 elongation factor G. The proportionated ST274-*P. aeruginosa* results could serve as the basis for more specific studies focused on better antibiotic stewardship and new therapeutic developments.

Keywords: ST274; whole genome sequencing; resistome; virulence; motility; pigment; biofilm; *lasR*; cystic fibrosis



Citation: Chichón, G.; López, M.; de Toro, M.; Ruiz-Roldán, L.; Rojo-Bezares, B.; Sáenz, Y. Spread of *Pseudomonas aeruginosa* ST274 Clone in Different Niches: Resistome, Virulome, and Phylogenetic Relationship. *Antibiotics* **2023**, *12*, 1561. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12111561>

Academic Editor: Maria Luisa Mangoni

Received: 3 October 2023

Revised: 18 October 2023

Accepted: 19 October 2023

Published: 24 October 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous Gram-negative microorganism that is adaptable and metabolically versatile and has been found in a wide variety of habitats. This species is a relevant opportunistic pathogen and one of the most frequent causes of acute nosocomial infections [1–3]. The increasing prevalence of multidrug-resistant (MDR) *P. aeruginosa* strains makes this bacterium difficult to treat, and it is consequently associated with a high risk of mortality.

P. aeruginosa strains have the capacity to develop resistance to antibiotics by the selection of genomic mutations and by exchange of transferable resistance determinants [4]. Additionally, their pathogenicity is associated with the expression of multiple virulence factors that enable evasion of the host response, such as lipases, proteases, rhamnolipids, pyocyanin, pyoverdine, catalases, and exopolysaccharides, as well as biofilm production. Most of them are under the control of quorum-sensing (QS) systems (including Las, Rhl, QsCR, Pqs, and Iqs), with LasIR and RhlIR being the most dominant regulatory circuits [5,6].

P. aeruginosa commonly infects the lungs of cystic fibrosis (CF) patients, and the infections typically progress from the intermittent acquisition of single environmental strains to an extensive genetic and phenotypic adaptation to the lung environment. The characteristics associated with the transition from “acute” to a “chronic” pulmonary pathogen in CF include the downregulation of some virulence factors (motility and production of pigments, rhamnolipids, and proteases), mucoid morphotype, increased biofilm formation, and upregulation of exopolysaccharide expression, as well as the reduced quorum-sensing pathways [5,7]. Therefore, *P. aeruginosa* is practically impossible to eradicate in the chronic phase of infection [8,9].

Some specific sequence types (ST) of *P. aeruginosa* have been commonly found associated with certain antibiotic resistance, virulence, or infective characteristics [10]. In previous epidemiological CF Spanish studies, the genetic background of obtained *P. aeruginosa* isolates showed high genetic variability, and ST395 and ST274 were identified as endemic clones [2]. Moreover, whole genome sequence analyses have revealed the emergence of CF-adapted epidemic clones, which may result from a limited number of specific mutations with pleiotropic effects [11].

The international epidemic high-risk clone ST274 and its clonal complex (CC274) are mostly associated with hospital settings and appear to colonize CF patients worldwide [10,12–19]. Thus, the majority of studies focus on characterizing globally disseminated clones in clinical settings, but few on non-clinical strains [15,20,21]. The aim of this work was to analyze the biological and genomic characteristics of ST274-*P. aeruginosa* strains from different origins, to set the path in understanding the relevant mechanisms for its success in the CF setting.

2. Results

2.1. Resistance Phenotype

Nine of 11 ST274-*P. aeruginosa* strains were susceptible to all anti-pseudomonal agents tested (classified as multiS in this work). One non-clinical strain, recovered from a fecal sample of a healthy volunteer, showed intermediate resistance to ceftazidime and imipenem and was classified as modR. The remaining clinical strain showed non-susceptible phenotypes to piperacillin–tazobactam, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, doripenem, gentamicin, ciprofloxacin, levofloxacin, and aztreonam, and it was classified as extensively drug-resistant (XDR) and difficult-to-treat resistant (DTR) strain (Table 1 and Supplementary Materials Table S1). All strains were susceptible to colistin, ceftiderocol, ceftazidime–avibactam, and ceftolozane–tazobactam. No isolate showed class A carbapenemase, extended-spectrum beta-lactamase (ESBL), or metallo-beta-lactamase (MBL) phenotypes. AmpC hyperproduction was observed in two strains (Table 1 and Supplementary Materials Table S1).

2.2. Serotyping and Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Table 1 presents the serotypes determined by agglutination, with the O:3 serotype found in all strains except four non-typeable strains.

Nine PFGE patterns were observed among the 11 ST274-*P. aeruginosa* strains studied (Figure 1 and Table 1). An indistinguishable pattern was found between two strains from river water samples that were closely related (more than 90% of identity) to the XDR-clinical strain. No association was detected by origin or resistance phenotype.

2.3. Detection of Virulence and Quorum-Sensing Genes

The definition of virulotypes was based on the detection of the 14 genes involved in virulence or quorum-sensing (*exoS*, *exoU*, *exlA*, *exoY*, *exoT*, *exoA*, *lasA*, *lasB*, *aprA*, *rhlAB*, *rhlI*, *rhlR*, *lasI*, and *lasR* genes). Two virulotypes were detected (Table 1). All strains harbored *exoS*, *exoY*, *exoT*, *exoA*, *lasA*, *lasB*, *aprA*, *rhlAB*, *rhlI*, *rhlR*, *lasI*, and *lasR* genes, whereas the strain G245 had the *lasR* gene truncated by the ISPsp7 element, an IS30-family insertion sequence. The *exoU* and *exlA* genes were absent in all of the strains.

Table 1. Characteristics of the 11 *P. aeruginosa* ST274 from different origins selected for this study.

Strain	Sample	Origin ^a	PFGE Pattern	Serotype ^b	Resistance Phenotype ^c	MIC (mg/L) ^c											Virulotype ^d	
						PTZ	CAZ	FEP	IMP	MER	DOR	GEN	TOB	CIP	LEV	CT		ATM
G42	Healthy volunteer	NC	P2	O:3	multiS	≤8	4	4	2	≤1	≤1	4	≤2	≤0.5	≤1	≤2	8	V1
G44	Healthy volunteer	NC	P4	PoliA	modR	≤8	16	4	4	≤1	≤1	4	≤2	≤0.5	≤1	≤2	8	V1
G73	Vegetable (lettuce)	NC	P5	O:3	multiS	≤8	2	4	≤1	≤1	≤1	4	≤2	≤0.5	≤1	≤2	4	V1
G92	Vegetable (chard)	NC	P6	O:3	multiS	≤8	2	4	≤1	≤1	≤1	4	≤2	≤0.5	≤1	≤2	8	V1
G105	River water	NC	P9b	O:3	multiS	≤8	2	4	≤1	≤1	≤1	4	≤2	≤0.5	≤1	≤2	8	V1
G115	River water	NC	P9b	O:3	multiS	≤8	2	4	≤1	≤1	≤1	4	≤2	≤0.5	≤1	≤2	8	V1
G148	Blood	C	P7	O:3	multiS	≤8	2	4	≤1	≤1	≤1	4	≤2	≤0.5	≤1	≤2	4	V1
G178	Blood	C	P8	AutoA	multiS	≤8	2	4	≤1	≤1	≤1	4	≤2	≤0.5	≤1	≤2	4	V1
G179 ^e	Blood	C	P9a	AutoA	XDR, DTR	>64	>16	>16	>8	8	>4	8	≤2	2	4	≤2	>16	V1
G224	Respiratory	C	P3	O:3	multiS	16	2	2	≤1	≤1	≤1	4	≤2	≤0.5	≤1	≤2	8	V1
G245 ^e	Respiratory	C	P1	PoliA	multiS	≤8	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤2	≤2	≤0.5	≤1	≤2	≤1	V2

^a NC, non-clinical; C, clinical origin. ^b PoliA, polyagglutination; AutoA, autoagglutination. ^c multiS, susceptible to all tested antipseudomonal agents; modR, non-susceptible to at least one agent in 1 or 2 categories; XDR, non-susceptible to all but 1 or 2 categories; DTR, difficult-to-treat resistance. MIC, minimal inhibitory concentration; PTZ, piperacillin–tazobactam; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; IMP, imipenem; MER, meropenem; DOR, doripenem; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; CIP, ciprofloxacin; LEV, levofloxacin; CT, colistin; ATM, aztreonam. Resistance values according to CLSI breakpoints (2022) [22] are marked with dark grey shadows, and the intermediate resistance values in light grey shadows. ^d Definition of virulotypes was based on the detection of *exoS*, *exoU*, *exlA*, *exoY*, *exoT*, *exoA*, *lasA*, *lasB*, *aprA*, *rhlAB*, *rhlI*, *rhlR*, *lasI*, and *lasR* genes. Virulotype V1: the strains amplified *exoS*, *exoY*, *exoT*, *exoA*, *lasA*, *lasB*, *aprA*, *rhlAB*, *rhlI*, *rhlR*, *lasI*, and *lasR* genes. Virulotype V2: this strain showed the virulotype V1 but with *lasR* truncated by *ISPsp7* (*lasRΔISPsp7*). ^e AmpC hyperproducer strains.

Table 1 presents the serotypes determined by agglutination, with the O:3 serotype found in all strains except four non-typeable strains.

Nine PFGE patterns were observed among the 11 ST274-*P. aeruginosa* strains studied (Figure 1 and Table 1). An indistinguishable pattern was found between two strains from river water samples that were closely related (more than 90% of identity) to the XDR-clinical strain. No association was detected by origin or resistance phenotype.

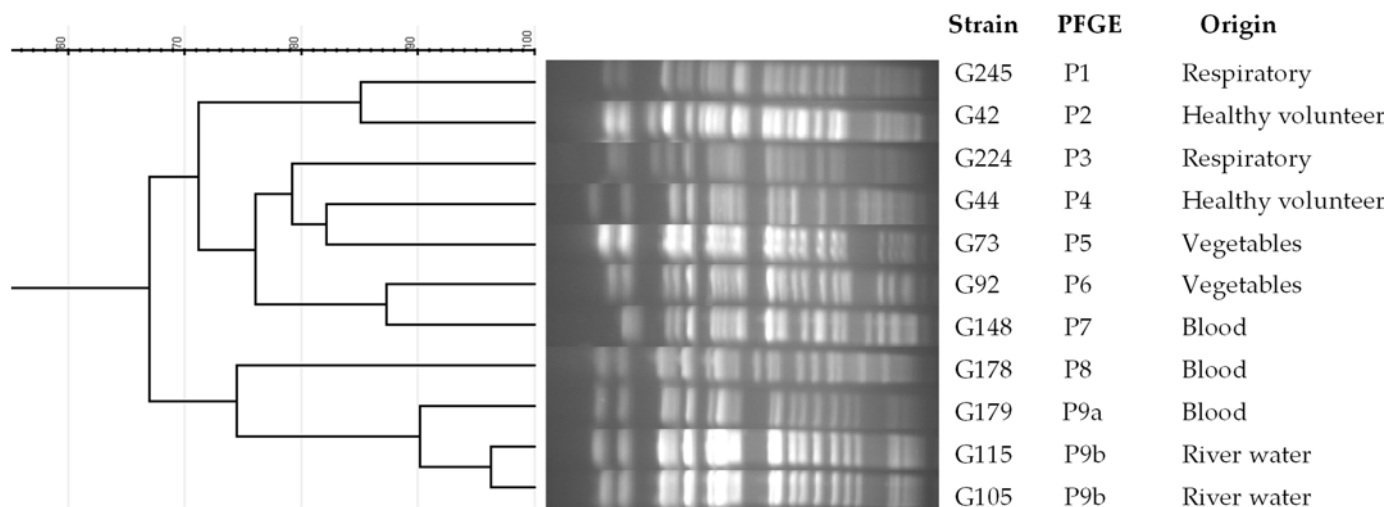


Figure 1. Dendrogram of PFGE patterns in ST274-*P. aeruginosa* strains from different origins. PFGE patterns were analyzed by GelJ v2 program, using the Dice coefficient.

2.4. Biofilm Formation

2.3. Detection of Virulence and Quorum-Sensing Genes

The production of biofilm biomass (crystal violet (CV) method) and the quantification of bacterial metabolic activity (fluorescein diacetate (FDA) method) were measured in virulence or quorum-sensing (*exoS*, *exoU*, *exlA*, *exoY*, *exoL*, *exoA*, *lasA*, *lasB*, *aprA*, *rhlAB*, *rhlI*, *rhlK*, *lasI*, and *lasK* genes). Two virulotypes were detected (Table 1). All strains harbored *exoS*, *exoY*, *exoL*, *exoA*, *lasA*, *lasB*, *aprA*, *rhlAB*, *rhlI*, *rhlK*, *lasI*, and *lasK* genes, whereas the strain G245 had the *lasK* gene truncated by the IS_{Spn7} element of an IS30 family insertion sequence. The *exoU* and *exlA* genes were absent in all of the strains, whereas the *lasK*-truncated strain had very high biofilm production (78% in CV and 753% in FDA).

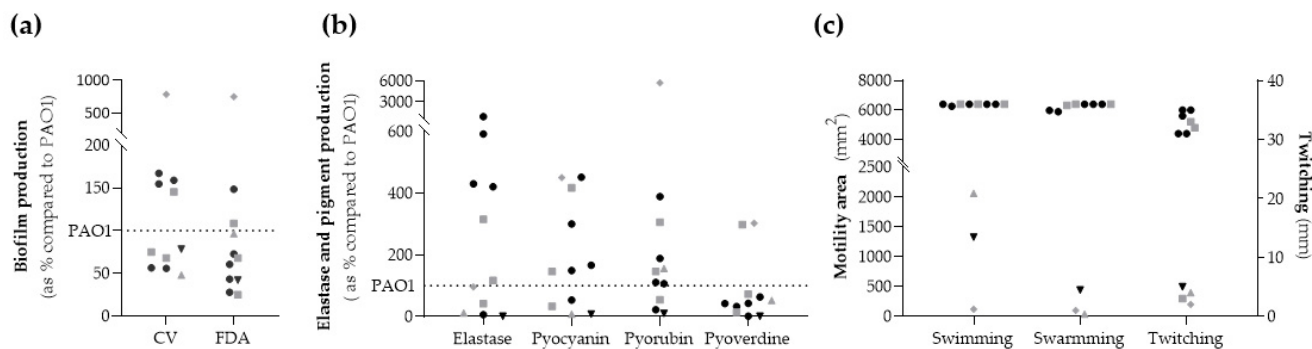


Figure 2. Phenotypic assays of biological parameters. (a) Biofilm production: biofilm biomass (CV) and metabolic activity inside the biofilm (FDA) (b) Elastase and pigment production: biofilm biomass (CV) and metabolic activity inside the biofilm (FDA) (c) Motility activity: swimming and swarming in mm² and twitching in mm (right axis). The dotted line represents reference strain *P. aeruginosa* PAO1 value = 100%. Black symbol (dots and triangle) represents non-clinical strains, and grey symbols (squares, triangle and rhombus) represent clinical strains. The grey triangle corresponds to the XDR strain, the black triangle to the modR strain, and the grey rhombus to the *lasK*-truncated strain.

2.5. Elastase Activity and Pigment Production

2.5. Elastase Activity and Pigment Production

Results obtained for elastase and pigment production are summarized in Figure 2b and Supplementary Table S1. The elastase production was higher than PAO1 in six strains (55%). The non-clinical *P. aeruginosa* strains produced more than 100%, except for both strains from healthy volunteers whose productions were lower than 7%. Additionally, the XDR strain had a low elastase production compared to PAO1 (11%).

Seven (64%) and eight (73%) strains showed higher pyocyanin and pyorubin production than PAO1, respectively. However, only two strains (G178 and G245) had a higher pyoverdine production than PAO1 (18%). The XDR strain exhibited a low production of pyocyanin pigment (8%), and the modR strain showed a very low production

Seven (64%) and eight (73%) strains showed higher pyocyanin and pyoverdine production than PAO1, respectively. However, only two strains (G178 and G245) had a higher pyoverdine production than PAO1 (18%). The XDR strain exhibited a low production of pyocyanin pigment (8%), and the modR strain showed a very low production for all pigments. On the other hand, the *lasR*-truncated strain showed exceptionally high pyoverdine (5714.29%), pyocyanin (450%), and pyoverdine (302%) production.

2.6. Motility

High swimming and swarming (area ranges 5892–6400 mm²) and twitching motility (diameter ranges 31–35 mm) were found in all ST274-*P. aeruginosa* strains except for three. These three strains were modR, XDR, and *lasR*-truncated ones that showed low motility values (area \leq 2500 mm² ranged from 34 to 2100 mm², and twitching diameter \leq 5 mm). G178 strain showed high swimming and swarming values (6400 mm²) but low twitching motility (3 mm) (Figure 2c and Supplementary Materials Table S1).

2.7. Genome Properties of ST274-*P. aeruginosa* Strains from Different Origins

The genome properties of the 11 studied ST274-*P. aeruginosa* strains and their assembly parameters are detailed in Table 2. Genome sizes ranged from 6,241,882 to 6,805,979 bp with 66.04–66.54% GC content. The total number of contigs ranged between 46 and 109, and the number of genes oscillated from 5734 to 6267.

Table 2. General features of the genomes of the 11 studied ST274-*P. aeruginosa* strains.

Strains	Reads	Assembly Parameters				Genetic Elements						
		Number of Contigs	Contig Maximum Length (bp)	Total Bases in Contigs > 1 kb	N50 (bp)	Genome Size (bp)	GC Content (%)	CDS	Genes	rRNA	tRNA	tmRNA
G42	5,890,730	87	726,697	6,748,134	353,893	6,757,744	66.04	6166	6241	3	71	1
G44	5,143,091	76	739,379	6,550,288	612,825	6,556,612	66.29	6000	6076	3	72	1
G73	4,765,846	66	1,027,638	6,349,927	704,215	6,355,219	66.47	5786	5861	3	71	1
G92	6,001,411	68	1,029,741	6,402,390	726,878	6,410,342	66.42	5840	5913	3	69	1
G105	5,647,144	46	768,785	6,241,289	621,817	6,241,882	66.54	5659	5734	3	71	1
G115	5,060,730	62	768,777	6,302,900	621,730	6,309,215	66.43	5741	5816	3	71	1
G148	5,581,661	69	931,567	6,423,973	695,550	6,430,217	66.35	5856	5934	6	71	1
G178	17,116,583	59	1,439,870	6,404,614	606,103	6,412,019	66.43	5825	5901	4	71	1
G179	7,309,267	78	729,747	6,244,365	427,443	6,251,772	66.53	5662	5739	3	73	1
G224	5,613,901	61	1,454,566	6,350,601	804,729	6,356,169	66.48	5821	5896	3	71	1
G245	11,589,531	109	726,712	6,794,368	409,397	6,805,979	66.07	6192	6267	3	71	1

2.7.1. Phylogenetic Analysis

Phylogenetic analysis was performed with a total of 27 *P. aeruginosa* strains, comparing our 11 studied ST274-*P. aeruginosa* strains with 14 reference ST274-*P. aeruginosa* genomes downloaded from the NCBI database, and the genomes of control strains *P. aeruginosa* PAO1 and PA14 (Supplementary Materials Table S2). The core genome and the SNP distance depended on the addition of PA14 and PAO1 genomes. Thus, the core genome of these 27 *P. aeruginosa* strains included 4,538 CDS with 90% homology and 90% coverage. By analyzing the SNPs, a range of 1 to 29,065 SNPs was detected among the 27 sequences; within the range, there were 1 to 4204 SNPs among all 25 ST274-*P. aeruginosa* sequences and from 1 to 3665 among the 11 ST274-*P. aeruginosa* sequences in this work (Supplementary Materials Table S3).

The core genome alignment was used to generate a phylogenetic tree (Figure 3), which showed no differences among strains from different origins or geographical areas. This representation can determine that ST274 is phylogenetically closer to PAO1 than to PA14 control strain. It is also remarkable to observe that the three PFGE-related strains (G105, G115, and G179) are clustered in the same clade, which is close to G178 and the reference env193 (isolated from the horse water trough, USA), AZPAE14971 (intra-abdominal tract infection, China), and AUS603 (CF, Australia) genomes.

Antibiotics 2023, 12, x FOR PEER REVIEW, independently of the resistance phenotype of the strains, in PA1797, OprD, MexX, PdxB, and MexQ proteins.

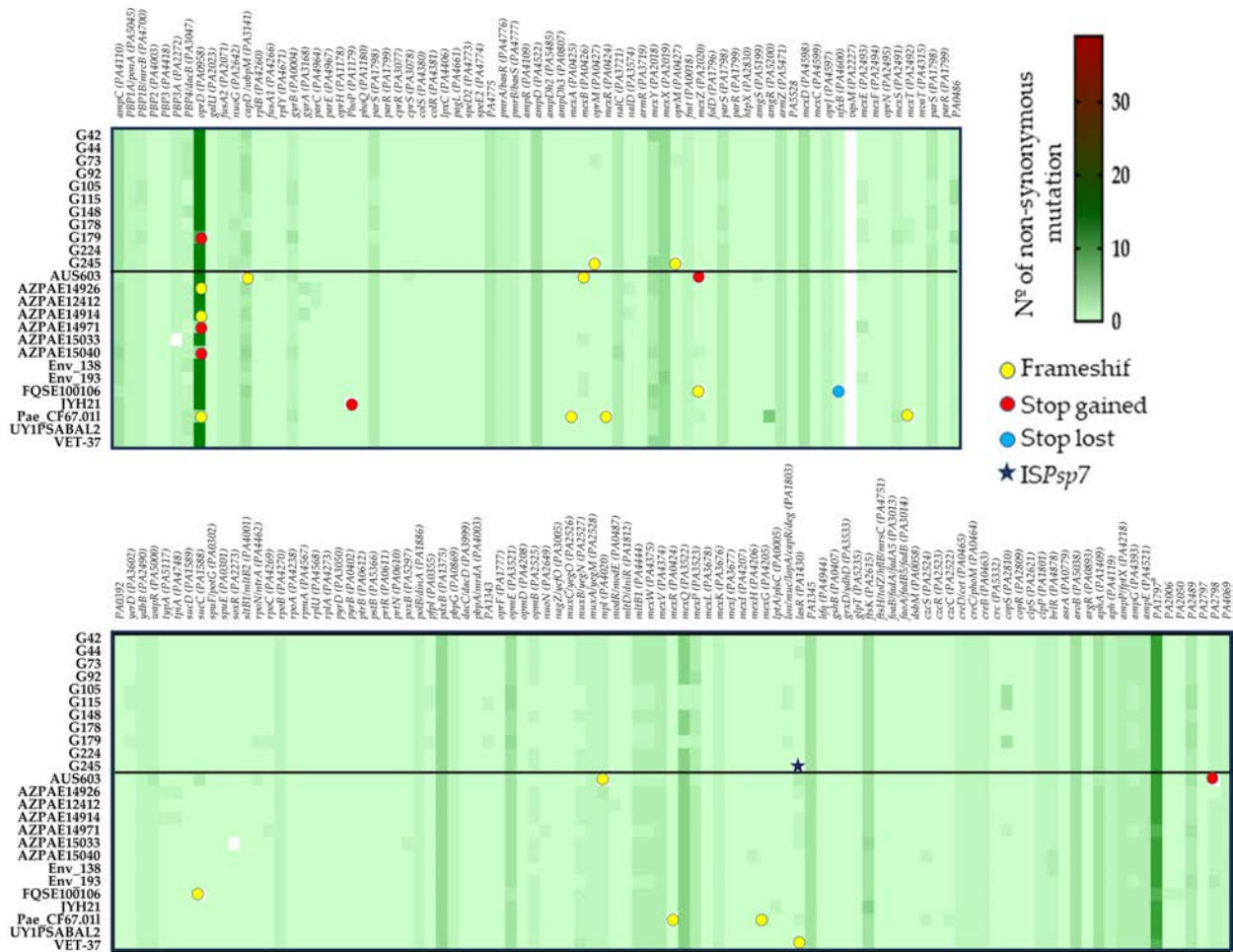


Figure 4. Heatmap generated with GraphPad Prism 8 represents the mutational resistance (non-synonymous mutations) in 170 genes involved in antibiotic resistance in the studied ST274-*P. aeruginosa* strains and the 14 reference ST274-*P. aeruginosa* genomes. The color scale represents the number of mutational events with respect to the PAO1 genome, except *mexT*, which was compared to PA14.

The results highlight the absence of *vsm* gene and the presence of the same change/s in 26 genes (15.3%) of all ST274-*P. aeruginosa* strains, antimicrobial susceptible and resistant. The serotype O:3 was detected in all ST274-*P. aeruginosa* strains using in silico serotyping with PAST f.0. The presence and alterations of a dataset of 247 virulence genes of PAO1, *exoU* gene of PA14, and *exlA* and *exlB* genes of PA7 (supplementary Table S9) were analyzed in the 170 studied strains and the 14 reference ST274-*P. aeruginosa* genomes. The presence of the penicillin-binding protein 1A (A615G, D616S, P714P), the elongation factor G5-FusA2 (G65A) (Figure 5 and Supplementary Materials Table S10) and our 11 ST274-*P. aeruginosa* strains (XDR, Suppl. Table S11) showed 81 different resistance mutations in comparison to our reference ST274-*P. aeruginosa* and our 14 reference ST274-*P. aeruginosa* strains. The differences were detected in 8 of the 167 studied proteins: OprD porin (9 substitutions and a premature stop codon at position W277) implicated in carbapenem resistance; DacB/PBP4 (deletion of 12 amino acids, N454_L465del) involved in beta-lactam resistance; GyrB (S466F) related to quinolone resistance; CapD (T27S; S51G; T507A) involved in O-antigen biosynthesis and previously related with aminoglycoside resistance; MexT (T157S) and MexS (D249N; G275S) multidrug efflux pump MexEF-OprN regulators; RpoC (E386K) a DNA-directed RNA polymerase beta chain; and RpoN (insertion of 4 amino acids, I180insSLEE) the RNA polymerase sigma-54 factor that regulates many virulence genes and is linked to antibiotic resistance

(Supplementary Materials Table S7). In addition, the same changes in 16 proteins were only detected in the XDR strain and its two closely related strains (G105 and G115) (Figure 4), with the exception of those substitutions in MexE, MltB1, MexW, AmpG, PA2489, and PA4069 proteins that were also detected in G178 and the reference env193, AZPAE14971, and AUS603 genomes.

The *lasR*-truncated strain (*P. aeruginosa* G245) showed unique amino acid changes in NuoG (T484A, S527N) and OprM (T173fs).

Concerning the mutome panel (Supplementary Materials Table S8), the wild type of *mutS* and *mutL* genes was detected in all 25 ST274 studied. On the other hand, the amino acidic change D61N in MutY protein was detected in 19 strains (76%), the E236D in MutT of 18 strains (72%), and D876E in PolA of all but VET-37 strain (96%).

According to the PlasmidFinder database, none of the strains harbored plasmids.

2.7.3. Detection of Virulence and Quorum-Sensing Genes

The serotype O:3 was detected in all ST274-*P. aeruginosa* strains using in silico serotyping with PAST 1.0.

The presence and alterations of a dataset of 247 virulence genes of PAO1, *exoU* gene of PA14, and *exlA* and *exlB* genes of PA7 (Supplementary Table S9) were analyzed in the 11 ST274-*P. aeruginosa* strains and the 14 reference ST274-*P. aeruginosa* genomes. Figure 5 shows the comparison of the virulence genes between PAO1 and our 11 ST274-*P. aeruginosa* strains. Supplementary Table S10 summarizes the complete results obtained with the 25 ST274-*P. aeruginosa* genomes.

Antibiotics 2023, 12, x FOR PEER REVIEW

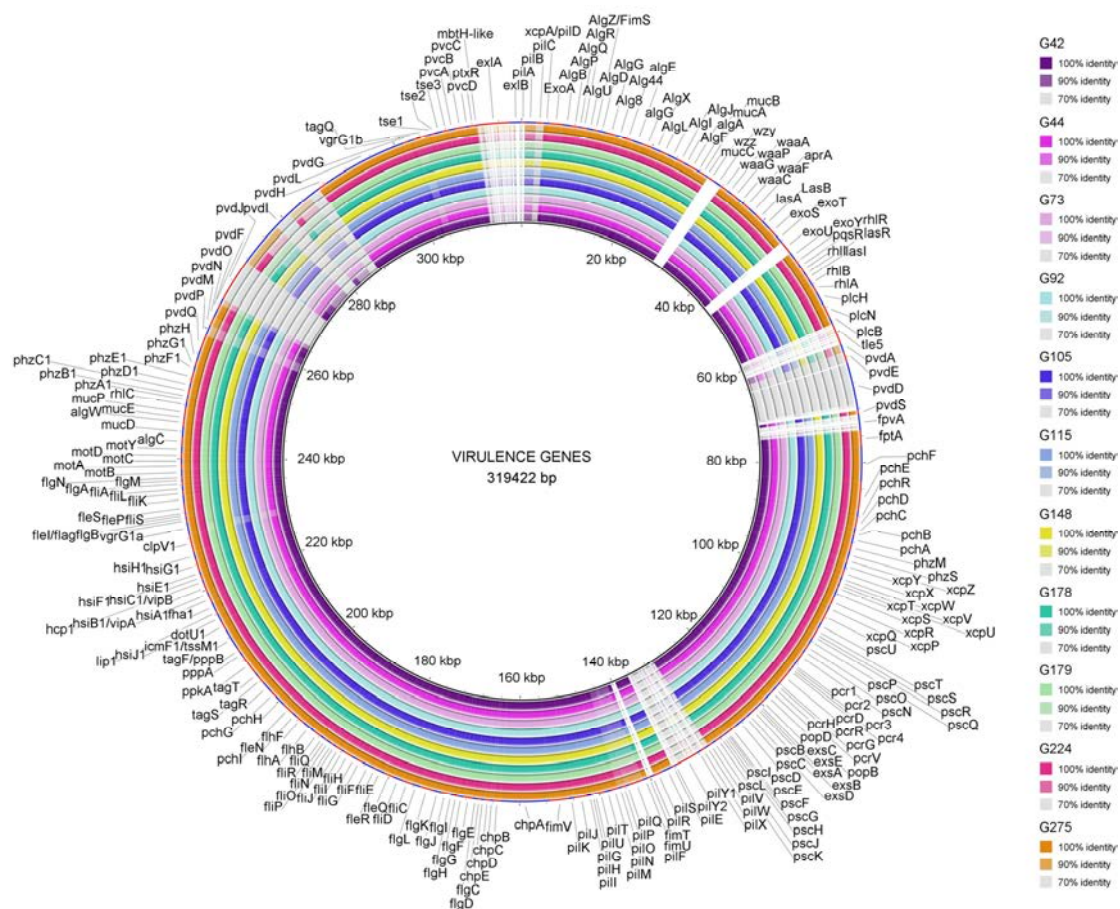


Figure 5. Virulence genes detected among the 11 studied ST274-*P. aeruginosa* strains. The BRIG BRIG Tool was used to represent the genes and their identity, using the reference *P. aeruginosa* PAO1 genome (except for *exlA* and *exlB* genes that were compared to PA7 and *exoU* to PA14 genomes). Figure legend includes the name of the studied *P. aeruginosa* strains and the color according to the percentage of identity detected.

No changes were observed in 91 out of the 250 (36.4%) genes analyzed. On the other hand, all 25 ST274 strains shared the following characteristics in comparison with PAO1 genes: 16 genes were absent (*pilA*, *pilE*, *pilV*, *pilW*, *pilX*, *pilY1*, *pilY2*, *fimT*, *fimU*, *pldA*/*tleS*, *fpvA*, *wzz*, *wzy*, *exlA*, *exlB*, and *exoU*), and 13 genes, mostly involved in pyoverdine and type IV pili biosynthesis (*vvdL*, *vvdE*, *vvdD*, *vvdL*, *vvdL*, *vvdE*, *vvdM*, *vvdP*, *vvdA*, *nchI*, *nlpP*,

No changes were observed in 91 out of the 250 (36.4%) genes analyzed. On the other hand, all 25 ST274 strains shared the following characteristics in comparison with PAO1 genes: 16 genes were absent (*pilA*, *pilE*, *pilV*, *pilW*, *pilX*, *pilY1*, *pilY2*, *fimT*, *fimU*, *pldA*/*tleS*, *fpvA*, *wzz*, *wzy*, *exlA*, *exlB*, and *exoU*), and 13 genes, mostly involved in pyoverdine and type IV pili biosynthesis (*pvdL*, *pvdE*, *pvdD*, *pvdJ*, *pvdI*, *pvdF*, *pvdM*, *pvdP*, *pvdA*, *pchI*, *pilP*, *pilN*, and *pilC*), showed more than 10 equal missense changes. These genes were studied in depth as explained below.

The same mutational patterns were detected in 68 proteins (27%) of all ST274 strains, independently of their clinical/non-clinical or geographical origins. On the other hand, PscP (translocation protein in type III secretion) and LasR (quorum-sensing regulator) showed the highest number of different mutational patterns (10 and 9, respectively) among the 25 ST274-*P. aeruginosa*. Additionally, premature stop codons, deletions, or insertions were detected in six genes (*pilC*, *pchF*, *pvdM*, *pcrH*, *pscK*, and *toxA*) in all strains. This highlights the results observed in ToxA, the exotoxin A precursor, where two mutational patterns including deletions were found: (i) T4I, F22S, G386_A388del, I432V, D500A, detected in ST274-*P. aeruginosa* G105, G115, G179, and G178 and the reference env193, AZPAE14971 and AUS603 strains, and (ii) T4I, F22S, A58_T62del, and I432V observed in the remaining 18 strains.

The XDR strain (*P. aeruginosa* G179) showed unique amino acid changes in PilN (V30L, A31V, A33G, D40G, F43L, T44N, A45T, N49H, N51G, K75R, and a premature stop codon at position Q80) and in RhIR (Y72C) and shared the same missense mutational patterns in 23 genes only with *P. aeruginosa* G105, G115, G178, env193, AZPAE14971, and AUS603 strains.

The *lasR*-truncated strain (*P. aeruginosa* G245) had unique mutational patterns in FleQ, PchH, PchE (D6fs), and PvdS proteins. The ModR strain (*P. aeruginosa* G44) only showed the amino acid change C79I in LasR in comparison with the remaining ST274-*P. aeruginosa* strains.

All 40 Type III Secretion System (T3SS)-related genes and their translocated effectors were detected in all ST274 strains, with the exception of *exoU* gene. The genes involved in flagella, phenazines, and alginate were mostly highly conserved and homologous among all ST274 strains; however, type IV pili (T4P), pyochelin, and pyoverdine biosynthesis genes were more variable. Analyzing the 23 T4P biosynthesis genes (Supplementary Materials Table S9), there were 9 absent genes (*pilA* and the *fimU/T/pilV/W/X/Y1/Y2/E* gene cluster), and at least one missense mutation was observed in 11 genes of all ST274 strains, showing a high polymorphism in proteins, such as PilC, PilN, PilO, or PilP (from 8 to 50 modifications) (Supplementary Materials Table S10). The major subunit of T4P is a protein encoded by the *pilA* gene. This gene has five pili alleles that are found at a conserved chromosomal locus between the adjacent *pilB* and *tRNA-Thr* genes [23]. By analyzing the *pilB/tRNA-Thr* region in all ST274 strains against GenBank sequences using BLAST, we found that *pilA* belongs to T4P group V (*pilA_V*), as well as the *fimU/T/pilV/W/X/Y1/Y2/E* gene cluster. For that reason, it was not possible to detect it when compared to PAO1-*pilA* which belongs to T4P group II (*pilA_{II}*) (parameters used included >90% similarity).

Pyoverdine biosynthesis in *P. aeruginosa* is a complex process involving at least 16 different proteins (Supplementary Materials Table S9). In all ST274 strains, *pvdA*, *pvdP*, *pvdD*, *pvdE*, *pvdJ*, and *pvdI* were highly divergent genes compared with PAO1 ones, and *fpvA* gene (ferripyoverdine receptor) was absent. When the region between *treA* and *pvdQ* was compared to GenBank genomes using BLAST, an identity higher than 80% was detected between our ST274 strains and multiple sequences, including the reference PAO1 (class I), ATCC27853 (class II), and the ATCC BAA-2108 (class III) strains. Figure 6 shows the alignment of the pyoverdine region of an ST274 strain in comparison with class I, class II, and class III pyoverdine-producing strains. All ST274-*P. aeruginosa* presented a pyoverdine locus class II.

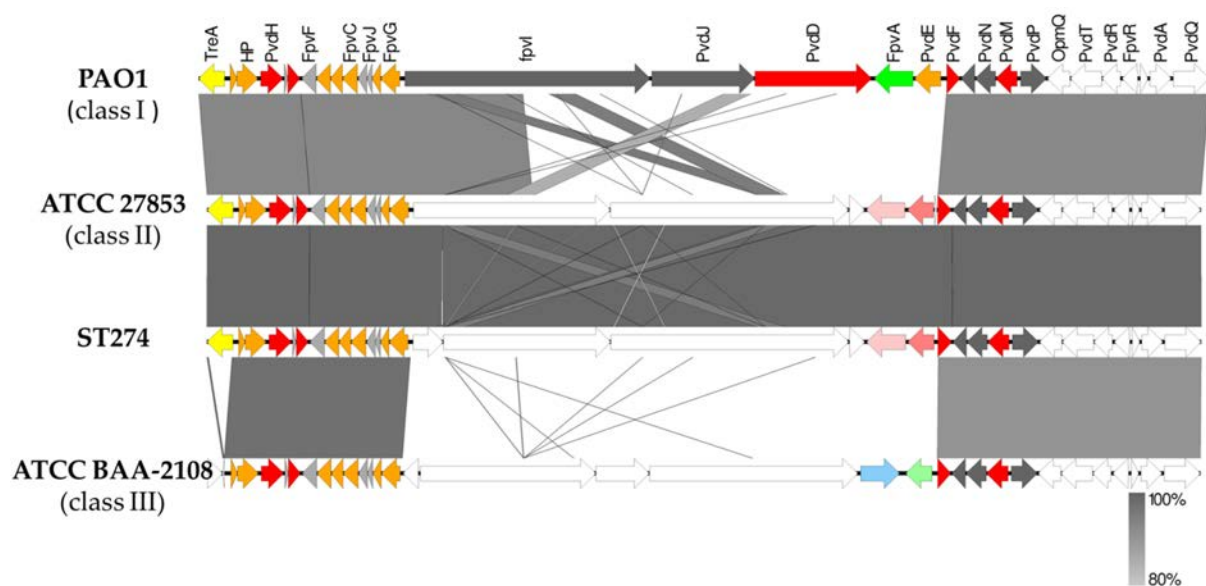


Figure 6. Schematic representation of the genomic differences found in the pyoverdine region between *P. aeruginosa* PAO1 (class I), ATCC 27853 (class II), ATCC BAA-2108 (class III), and ST274 *P. aeruginosa* strains. Colors represent the localization of genes according to the *Pseudomonas* webpage (www.pseudomonas.com (accessed on April 2023)): orange, cytoplasmic membrane proteins; red, cytoplasmic proteins; green, outer membrane proteins; grey, proteins of unknown function. Further more, grey indicates the absence of a gene in a strain, while white indicates the presence of a gene. Another more detailed difference is indicated by a dark pink arrow, which represents ABC transporter blue high difference from PvdA in a dark pink difference in proteins located in that region. ABC class III porin, line region, and white arrows represent hypothetical proteins (unknown function). Easyfig v2.2.5 and BLAST v2.10.0 were used to build the figure.

3. Discussion

3. Discussion

Different studies have revealed a high genetic diversity among *P. aeruginosa* isolates infecting CF patients. However, ST274 high genetic diversity among *P. aeruginosa* isolates infecting CF patients was identified as an endemic clone in Spain and a global epidemic clone worldwide. However, ST274 is defined as an endemic clone in Spain and a global epidemic clone worldwide. ST274 has been detected in multiple CF patients from Europe, America, Asia, and Australia [2,10,12,16,18,19]. Most of the reported studies characterized the ST274 *P. aeruginosa* isolated from CF patients or associated with hospital settings worldwide, although the majority of chronic CF infections are not related to the worldwide colonization by *P. aeruginosa* from environmental sources. The investigation on the origin of ST274 *P. aeruginosa* behavior, including origin, antibiotic resistance, and pathogenicity, molecular typing, or environmental adaptation, is necessary to know the molecular markers and biological characteristics that could explain the clonal success of the ST274 clone. In addition, the assessment of the genetic and biological markers underlying clonal success must be performed in a range of not only both resistant and susceptible strains but also both clinical and non-clinical strains.

In the current study, five clinical and six non-clinical ST274-*P. aeruginosa* strains have been deeply analyzed, and their whole genome sequences were compared with others included in databases. Regarding antimicrobial resistance, 9 out of 11 ST274-*P. aeruginosa* strains were multi-resistant, one strain was MDR, and the remaining strain was XDR and DTR. High-risk clones S1235, S1175, and S1111 are usually associated with MDR/DTR clinical strains; however, as our results show, in agreement with previous studies reported [21,24], these resistance phenotypes are not so frequent among non-clinical or ST274 *P. aeruginosa* strains. The unique XDR and DTR strain (G179) in our work was isolated from a blood sample, showed hyperproduction of AmpC, and possessed a different mutational resistance in comparison to the remaining 10 ST274-*P. aeruginosa* strains. G179 resistance showed missense mutations affecting porins and membrane proteins, multidrug efflux pumps, O-antigen biosynthesis, quinolone targets, and regulators (i.e., OprD,

pumps, O-antigen biosynthesis, quinolone targets, and regulators (i.e., OprD, DacB/PBP4, GyrB, CapD, MexT, MexS, RpoC, and RpoN proteins), which likely explain the observed resistance pattern. The mutational inactivation of *oprD* is the most frequent cause of carbapenem resistance in *P. aeruginosa*, and the inactivation of *dacB*, which correlated with the AmpC overexpression, causes the β -lactam resistance [25–27]. RpoN regulates nitrogen assimilation, quorum sensing, motility, biofilm formation, and other virulence factors, but its regulation was also linked to *P. aeruginosa* tolerance to several antibiotics [28,29]. The insertion of four amino acids in the RpoN of the G179 strain probably induced a partial or total loss of RpoN function which is a relatively common mechanism of pathoadaptation to the CF lungs [30,31]. This strain was also classified as DTR, referring to resistance to all first-line antibiotics that include β -lactams and fluoroquinolones, and associated with higher mortality [32,33]. According to international guidelines [33], ceftolozane–tazobactam, ceftazidime–avibactam, or imipenem–relebactam are recommended for treating DTR *P. aeruginosa*, and our DTR ST274-*P. aeruginosa* strain was susceptible to all of them.

During an infection, *P. aeruginosa* has to adapt to a new scenario that includes the host immune response, antibiotics, and a different environment and substrate composition. There are multiple references analyzing the *P. aeruginosa* adaptive processes, and it is commonly observed that the gradual downregulation or loss of the function of many genes occurs, usually associated with bacterial quorum-sensing and pathogenicity [5,7,31,34,35]. Persistent colonization and chronic infection are eventually associated with resistance development, loss of O-antigen, biofilm production, and loss of motility and virulence factors. Among our analyzed 11 ST274-*P. aeruginosa* strains, the XDR, modR, and *lasR*-truncated strains showed a chronic infection phenotype characterized by loss of serotype-specific antigenicity and low motility. The remaining eight ST274-*P. aeruginosa* strains were fully motile in agreement with a general wild-type phenotype. Furthermore, the XDR and modR strains presented low production of pigments and reduced biofilm formation and values that were very high in the *lasR*-truncated strain. The *lasR* gene is involucrate in the control of quorum-sensing systems and is generally considered at the top of the regulatory hierarchy [36,37]. LasR showed the C79Y change in the modR strain recovered from a fecal sample of a healthy volunteer; whereas in the *lasR*-truncated strain, isolated from a bronchial aspirate of a patient with chronic bronchitis, the *lasR* was truncated by the ISPsp7 element. *P. aeruginosa* is frequently observed to gain mutations in *lasR* gene during chronic infections, including chronic CF lung infections [31,38,39], but a high prevalence of *lasR*-defective *P. aeruginosa* has been detected from not only clinical samples but also non-clinical origins [40–42]. This fact could suggest that the loss of *lasR* function gives a selective pathogenic advantage and minimizes fitness cost at a bacterial population level even outside the clinical contexts. Furthermore, there are multiple evolution studies analyzing the in vitro and in vivo effect of *lasR* mutants, and they have been detected that even the nutritional environment is sufficient to select those mutants, and not all of them involve a LasR-defective phenotype [39,41,43,44]. Thus, *lasR* mutants are neither atypical nor restricted to clinical isolates, and additionally, the *lasR*-loss could be offset by other interactive quorum-sensing systems and/or global regulators, such as MvaT, RpoN, and RpoS.

The *vqsM* and *pldA/tleS* genes were not detected among the 25 studied ST274 sequences. VqsM is an AraC family transcriptional regulator which activates the *las* quorum-sensing system and T3SS gene expression [45]. *pldA/tleS* gene codifies a phospholipase D1 involved in bacterial pathogenesis and persistence [46]. However, it has been reported that not all strains of *P. aeruginosa* carry *vqsM* or *pldA* genes; therefore, their relative infective contributions appear to be strain-specific [45,46].

According to core genome analysis, the phylogenetic tree showed all 25 ST274-*P. aeruginosa* interspersed and grouped in two phylogenetic clades independently of their antimicrobial resistance or origin, supporting the idea of the absence of a geographical or origin barrier for lineage evolution. *P. aeruginosa* G105, G115, G178, G179, env193, AZPAE14971, and AUS603 strains, which were recovered from clinical and non-clinical

samples, shared the wild-type sequences of *mutS*, *mutL*, and *mutT* mutator genes, and the same missense mutational patterns in 7 genes of the resistome (i.e., *fosA*, *mexE*, *muxB*, *mltB1*, *mexW*, *ampG*, and *PA2489*) and 23 genes of the virulome (e.g., *toxA*, *rhlC*, *lasI*, or *popN*).

Interclonal sequence variation is low in the *P. aeruginosa* core genome [47]. Indeed, the genome clusters with the highest level of sequence diversity in *P. aeruginosa* are the pyoverdine locus, the flagellar regulon, T4P *pilA*, the T3SS effector proteins, and the O-antigen biosynthesis locus. Each cluster is present in all strains, but their involved genes are highly divergent between strains. This phenomenon could be a result of “diversifying selection”, a type of selection that maintains multiple alleles in the population [47]. In this line, and according to the results obtained in our work, the genes involved in flagella were mostly highly conserved and homologous among all ST274 strains; however, T4P and siderophores (pyoverdine and pyochelin) biosynthesis genes were highly divergent compared with PAO1 ones. T4P is associated with a number of biological activities in bacteria, such as twitching motility, bacteriophage sensitivity, attachment to biotic and abiotic surfaces, biofilm development, and DNA uptake [23]. In *P. aeruginosa*, T4P is composed of a single-type IVa pilin (T4aP) protein encoded by the *pilA* gene, for which five distinct pilin alleles (Groups I–V) have been previously reported in *P. aeruginosa* [23,48]. PAO1 strain possesses group II pilin, PA14 harbors group III, and all ST274 strains of our study presented a group V. Group III and V pilins have an unusual architecture and diverged from a common ancestor [23,49]. The “minor” pilins are a set of low-abundance pilin-like proteins encoded by the *fimU/T/pilV/W/X/Y1/Y2/E* gene cluster. In all ST274 strains, they were not detected compared with the PAO1 sequence, as observed in other works [50]. However, it has been also described that both groups III and V have identical minor pilin genes [51], which have less than 75% similarity with the group II operon [52]. In addition, the tandem tRNA genes located between the major and minor pilin operons appear to provide hot spots for genetic insertion. This information together with the fact that some *P. aeruginosa* pilins are more closely related to pilins of distinct bacterial species (e.g., *Dichelobacter nodosus*, *Eikenella corrodens*, *Ralstonia solanacearum*, and *Xanthomonas campestris*) strongly suggest that pilin gene diversity was generated through horizontal genetic transfer [53,54]. Group I and II pilins are the most frequently detected in *P. aeruginosa* strains [23,52,55], and among the scarce descriptions of isolates harboring a group V pilin, no specific differences were reported [23,55]. Further studies could determine the possible relationship between these groups of pilins, motility, and strain-specific characteristics.

In general, every *P. aeruginosa* isolate is able to produce one of three types of pyoverdine [56,57], and all 25 analyzed ST274-*P. aeruginosa* presented a pyoverdine class II. The TonB-dependent ferripyoverdine receptor encoding gene, *fpvA_{II}*, is chromosomally located among the most divergent genes in the region and is not a recombination result between types. Outer membrane protein genes such as the pyoverdine receptor *fpvA* are common targets for entry by phage or pyocins. Pyocins are bacteriocins produced by *P. aeruginosa* that kill strains of the same species. This is the case for pyocin S3 which uses FpvAII as a receptor, while the pore-forming pyocin S5 utilizes the FptA ferripyochelin receptor to gain entry to the cells and kill them [58,59]. Pyocins could indeed play a particularly important role during co-colonization of the CF lung by *P. aeruginosa* isolates that possess different pyocin/immunity genes and favor the outcompetition of a particular *P. aeruginosa* clone. Thus, siderophore diversity may be also a resistance mechanism.

In conclusion, we gained insights into the ST274-*P. aeruginosa* isolates population structure using a combination of phenotyping and genotyping techniques, and certain associations have been primarily detected, such as the presence of *bla_{OXA-486}* and *bla_{PDC-24}* genes, O-antigen serotype O:3, *exoS⁺/exoU⁻* T3SS genotype, Group V of T4P, and pyoverdine locus class II. Other general molecular markers or features have also been observed linked to the analyzed ST274-*P. aeruginosa* sequences, highlighting the absence of *vqsM* and *pldA/tleS* genes and the presence of the same mutational pattern in genes involved in, for example, two-component sensor-regulator systems PmrAB (substitutions L71R and Y345H, respectively) and CreBD (E128G and A397V, respectively); the exotoxin A (A58 or G386

deletions in ToxA); the quorum-sensing RhlI (S62G, D83E); the beta-lactamase expression regulator AmpD (R11L, G148A, D183Y); the penicillin-binding protein 1A (A615_D616insP); or the elongation factor G FusA2 (G695A).

Whole genome sequence analyses provide detailed genome patterns that might be essential to characterize ST274-*P. aeruginosa* strains, although it is difficult and challenging to correlate genotypic with phenotypic variations. Sequencing alone cannot always predict phenotypic differences, due to the multifactorial nature of *P. aeruginosa*. The reduced number of strains and the intra-clonal variability of the parameters analyzed must be considered among the limitations of this study. This variability could be related to the activation of specific regulatory pathways, horizontal gain or loss of genetic material, or undetected punctual mutations that affect the final expression levels of key genes.

Further work is needed to improve our understanding of the basis for the global success of this and other high-risk clones. A more in-depth understanding of *Pseudomonas* virulence regulation, as well as the use of *P. aeruginosa* transcriptomics, would identify hundreds of genes specifically expressed in vitro or during adaptation to different environments. However, this study could serve as the basis for more specific studies that will prove helpful in designing novel antimicrobial approaches, better antibiotic stewardship, and new therapeutic developments.

4. Materials and Methods

4.1. Bacterial Strains

Eleven *P. aeruginosa* strains belonging to clone ST274 were selected from the *Pseudomonas* collection of the Molecular Microbiology Area (Centre for Biomedical Research in La Rioja, CIBIR, Logroño, Spain). These strains were obtained from clinical samples of non-CF patients (number of strains), respiratory (2) and blood (3), and from non-clinical samples, fecal samples of healthy volunteers (2), vegetables (2), and river water (2) (Table 1 and Supplementary Materials Table S1). *P. aeruginosa* PAO1, PA7, and PA14 were included as control strains in different assays.

4.2. Antimicrobial Susceptibility Testing

Susceptibility testing to 15 antipseudomonal agents was performed by MicroScan WalkAway[®] microdilution system (MicroScan; Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) according to CLSI [22], except cefiderocol, ceftazidime–avibactam, and ceftolozane–tazobactam that were determined by disk diffusion method [22]. Colistin resistance was also screened by colistin broth disk elution [22]. The antimicrobial categories and antipseudomonal agents tested were the following ones: aminoglycosides (gentamicin, tobramycin), carbapenems (imipenem, meropenem, doripenem), cephalosporins (ceftazidime, cefepime, cefiderocol), fluoroquinolones (ciprofloxacin, levofloxacin), penicillin– β -lactamase inhibitor combinations (piperacillin–tazobactam, ceftazidime–avibactam, ceftolozane–tazobactam), monobactams (aztreonam), and polymyxins (colistin).

Strains were categorized as multiS, modR, MDR (multidrug-resistant), and XDR according to previously published classifications [60,61]. The strains that are non-susceptible to all of the following antibiotics, piperacillin–tazobactam, ceftazidime, cefepime, aztreonam, meropenem, imipenem, ciprofloxacin, and levofloxacin, were considered difficult-to-treat resistant (DTR) [32].

ESBL, MBL, and class A carbapenemase phenotypes were determined by double-disc synergy tests [26]. AmpC hyperproduction was determined by the phenotypic method [62].

4.3. Serotyping

Serotype identification was performed by agglutination using commercially monovalent antisera specific for 16 different *P. aeruginosa* O-serotypes (Bio-Rad, Temse, Belgium).

4.4. Detection of Virulence and Quorum-Sensing Genes

The presence of *exoS*, *exoU*, *exoY*, *exoT*, *exoA*, *exlA*, *lasA*, *lasB*, *aprA*, *rhlAB*, *rhlI*, *rhlR*, *lasI*, and *lasR* genes was studied by PCR as described previously [20].

4.5. Clonal Relationship

PFGE was carried out using the *SpeI* enzyme to digest genomic DNA [63]. PFGE patterns were analyzed by the Java program GelJ v2 using the Dice coefficient [64].

4.6. Biofilm Formation

Biofilm assays were performed by crystal violet (CV) staining to quantify the total biofilm biomass and by fluorescein diacetate (FDA) assay to determine the bacterial metabolic activity inside the biofilm structure (viable cells within the biofilm). Both methods were performed in 96-well microtiter plates using an initial inoculum of 10^6 cfu/mL and measured after 24 h of incubation, as previously published [20]. Absorbance measures were performed using a POLARstar Omega microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). All experiments were performed in triplicate, including *P. aeruginosa* PAO1 as the control strain. GraphPad Prism (v.8.4.3) was used to build the graphics.

4.7. Elastase and Pigment Production

Bacterial strains were grown at 37 °C in Luria-Bertani (LB) broth overnight with shaking. After centrifugation, elastase activity was determined by the Elastin-Congo-Red assay [7], and the chloroform extract method was used to quantify pyocyanin, pyoverdine, and pyorubin pigments [7]. Absorbance/fluorescence measures were performed using a POLARstar Omega microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). All experiments were performed in triplicate, including *P. aeruginosa* PAO1 as the control strain. GraphPad Prism (v.8.4.3) was used to build the graphics.

4.8. Motility

Swarming and swimming motilities were determined by placing 4 µL of bacterial suspension (1×10^9 cells in LB broth) on the middle of 0.5% (swarming) and 0.3% (swimming) LB agar plates (entire plate area was 6400 mm²) [20]. Plates were photographed with Chemi Doc system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), after incubation at 37 °C overnight. The images were processed with MotilityJ software (v1.0) [65].

A twitching motility assay was performed starting with overnight-grown bacteria on LB agar plates. Bacteria were stab inoculated with a sterile needle loop to the bottom of the plastic agar interface of LB broth solidified with 1% agar plates. After incubation at 37 °C for 48 h, the agar medium was removed. The twitching diameter was measured after staining with 0.05% (wt/vol) Coomassie brilliant blue (40% methanol, 10% acetic acid) for 50 min. Bacteria were classified as non-motile (diameter \leq 5 mm), motile (diameter from >5 mm to ≤ 30 mm), or highly motile (diameter > 30 mm) [66,67].

All assays were performed in triplicate. GraphPad Prism (v.8.4.3) was used to build the graphics.

4.9. Whole Genome Sequencing (WGS)

Genomic DNA from the 11 ST274-*P. aeruginosa* strains of this study was extracted using Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Quantity and quality were assessed using a Qubit fluorimeter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Libraries were prepared using the TruSeq DNA PCR Free protocol (Illumina, San Diego, CA, USA). Then, the final quality of the libraries was assessed with a Fragment Analyzer (Std. Sens. NGS Fragment Analysis kit 1–6000 bp, AATI) and was quantified by qPCR at the Genomics and Bioinformatics Core Facility (CIBIR). Subsequent sequencing was carried out in an Illumina HiSeq 1500 (Illumina, San Diego, CA, USA).

FastQC v0.11.5 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) was used to analyze the quality of raw reads, which were subsequently trimmed and filtered by using Trim

Galore v0.4.5 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/). Genomes were reconstructed by using PLACNETw [68]. Identification of open reading frames (ORFs) and genome annotation of the assembled genetic elements was performed by using PROKKA v1.13 [69].

Additionally, the genomes of 14 ST274-*P. aeruginosa* strains from different origins were downloaded from the NCBI database (January 2020) to be used as reference genomes in the different comparative analyses (Supplementary Materials Table S2). The core genome was determined as the collection of genes present in the 11 ST274-*P. aeruginosa* strains of this study but also in the 14 reference ST274-*P. aeruginosa* genomes and the control strains *P. aeruginosa* PAO1 and PA14. The parameters used included >90% similarity and >90% coverage, as defined by Lanza et al. (2014) [70]. A phylogenetic tree was constructed with this data using IQ-Tree 1.6.12 [71] and iTol V5.6.3 [72]. Roary v3.11.2 was used to determine and analyze the pangenome, identifying common and unique genes [73], and eggNOG-mapper v2 was used to determine the cluster of orthologous groups (COGs) and functional annotations [74].

The presence of acquired antibiotic resistance genes was evaluated using the following tools: ResFinder V3.2 [75], Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) [76], and Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation (ARG-ANNOT) [77]. The mutational resistome was determined by analyzing the presence of mutations among a dataset of 170 genes involved in antimicrobial resistance downloaded from the Pseudomonas Genome Database (www.pseudomonas.com) (Supplementary Materials Table S6)). For this purpose, variant calling was performed using PAO1 as a reference genome (Snippy V4.5.0) and confirmed with BLAST and CLUSTAL. The heatmap was constructed using the GraphPad Prism (v.8.4.3) program.

Additionally, the mutator phenotype was studied from whole genome sequence data through the analysis of genes from mutome panel [2].

Virulence genes were analyzed using the Virulence Factor DataBase (VFDB) [78], studying a dataset of 247 virulence genes of PAO1, plus *exoU* of PA14, and *exlA* and *exlB* of PA7. These genes are associated with flagella and pili biosynthesis/regulation, protease production, type II, IV, and VI secretion systems, protease IV, enzyme, quorum sensing, alginate production/regulation, and toxins were curated from the VFDB (Supplementary Materials Table S10). BLAST searches were used to match the virulence genes with the bacterial genomes, and BLAST Ring Image Generator (BRIG) [79] was used to represent the percentage identity between these genes and those absent. Moreover, we performed BLAST, Clustal Omega, and variant calling (Snippy V4.5.0) using PAO1 as a reference genome to find the aminoacidic changes in virulence proteins.

PlasmidFinder 1.3 was used to search the plasmid replicon types, and the *Pseudomonas aeruginosa* serotyper (PAst 1.0) was used for in silico serotyping (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PAst/>).

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics12111561/s1>, Table S1. Characteristics of the 11 studied ST274-*Pseudomonas aeruginosa* recovered from different origins; Table S2. Characteristics of the genomes of 14 reference ST274-*P. aeruginosa* strains and control strains PAO1 and PA14 downloaded from the NCBI database; Table S3. Single-nucleotide polymorphisms (number of SNPs) in the core genome among the 11 studied ST274-*P. aeruginosa*, the 14 reference ST274-*P. aeruginosa* genomes, and the two control genomes; Table S4. Pangenome determined using Roary in all 25 ST274-*P. aeruginosa* strains and the control strains PAO1 and PA14; Table S5. Acquired genes in ST274-*P. aeruginosa* with Resfinder prediction; Table S6. Dataset and function of the 170 antimicrobial resistance genes analyzed to determine the mutational resistome of the ST274-*P. aeruginosa* strains; Table S7. Mutational resistome of the 25 studied ST274-*P. aeruginosa* strains with respect to PAO1 genome; Table S8. Detection of alterations in the mutome genes (involved in the mutator phenotype) of the 11 studied ST274-*P. aeruginosa* strains and the 14 reference ST274-*P. aeruginosa* genomes, with respect to PAO1 genome; Table S9. Dataset and functions of the 250 virulence genes analyzed to determine the virulome of the ST274-*P. aeruginosa* strains; Table S10. Amino acid changes in virulome

of the 25 studied ST274-*P. aeruginosa* strains with respect to the PAO1 genome. References [80–84] are cited in the supplementary materials.

Author Contributions: Conceptualization, G.C., M.L. and Y.S.; data curation, G.C., M.L., M.d.T., L.R.-R. and B.R.-B.; formal analysis, G.C., M.L., M.d.T. and Y.S.; funding acquisition, Y.S.; investigation, G.C., M.L., M.d.T., L.R.-R., B.R.-B. and Y.S.; methodology, G.C., M.L., M.d.T., L.R.-R., B.R.-B. and Y.S.; resources, G.C., M.d.T. and Y.S.; software, M.L. and M.d.T.; supervision, M.L. and Y.S.; validation, M.L., M.d.T., L.R.-R., B.R.-B. and Y.S.; visualization, G.C., M.L., B.R.-B. and Y.S.; writing—original draft, G.C., M.L. and Y.S.; writing—review and editing, G.C., M.L., M.d.T., L.R.-R., B.R.-B. and Y.S.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research work was supported by the Instituto de Salud Carlos III of Spain (ISCIII) (FIS project number PI20/00356) (co-funded by European Regional Development Fund (FEDER) “A way to make Europe”). Gabriela Chichón (G.C.) had a predoctoral fellowship from the Consejería de Industria, Innovación y Empleo, Gobierno de La Rioja, Spain.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All datasets are available. The whole genome data for the 11 ST274-*P. aeruginosa* strains have been deposited at NCBI using BioProject number PRJNA678143. The raw sequencing data were deposited at NCBI’s Sequence Read Archive (SRA) (SRR13053896 to SRR13053906).

Acknowledgments: Part of this study was presented at the 31st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) (Abstract No. 1916, online, 9–12 July 2021) and the XXIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) (Abstract No. 193, online, 2020).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

- Freschi, L.; Vincent, A.T.; Jeukens, J.; Emond-Rheault, J.G.; Kukavica-Ibrulj, I.; Dupont, M.J.; Charette, S.J.; Boyle, B.; Levesque, R.C. The *Pseudomonas aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on Its Population Structure, Horizontal Gene Transfer, and Pathogenicity. *Genome Biol. Evol.* **2018**, *11*, 109–120. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- López-Causapé, C.; de Dios-Caballero, J.; Cobo, M.; Escribano, A.; Asensio, Ó.; Oliver, A.; del Campo, R.; Cantón, R.; Solé, A.; Cortell, I.; et al. Antibiotic resistance and population structure of cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a Spanish multi-centre study. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2017**, *50*, 334–341. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Diggle, S.P.; Whiteley, M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: Opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology* **2020**, *166*, 30–33. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Subedi, D.; Vijay, A.K.; Kohli, G.S.; Rice, S.A.; Willcox, M. Comparative genomics of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different geographic sites. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 15668. [\[CrossRef\]](#)
- Malhotra, S.; Hayes, D., Jr.; Wozniak, D.J. Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: The Host-Microbe Interface. *Clin. Microbiol. Rev.* **2019**, *32*, e00138-18. [\[CrossRef\]](#)
- Jurado-Martín, I.; Sainz-Mejías, M.; McClean, S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3128. [\[CrossRef\]](#)
- Lozano, C.; Azcona-Gutiérrez, J.M.; Van Bambeke, F.; Sáenz, Y. Great phenotypic and genetic variation among successive chronic *Pseudomonas aeruginosa* from a cystic fibrosis patient. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0204167. [\[CrossRef\]](#)
- Mauch, R.M.; Jensen, P.Ø.; Moser, C.; Levy, C.E.; Høiby, N. Mechanisms of humoral immune response against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **2018**, *17*, 143–152. [\[CrossRef\]](#)
- Gabrielaite, M.; Johansen, H.K.; Molin, S.; Nielsen, F.C.; Marvig, R.L. Gene Loss and Acquisition in Lineages of *Pseudomonas aeruginosa* Evolving in Cystic Fibrosis Patient Airways. *mBio* **2020**, *11*, e02359-20. [\[CrossRef\]](#)
- Nageeb, W.; Amin, D.H.; Mohammedsalem, Z.M.; Makharita, R.R. Novel Molecular Markers Linked to *Pseudomonas aeruginosa* Epidemic High-Risk Clones. *Antibiotics* **2021**, *10*, 35. [\[CrossRef\]](#)
- López-Causapé, C.; Rojo-Molinero, E.; Mulet, X.; Cabot, G.; Moyà, B.; Figuerola, J.; Togores, B.; Pérez, J.L.; Oliver, A. Clonal Dissemination, Emergence of Mutator Lineages and Antibiotic Resistance Evolution in *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Chronic Lung Infection. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e71001. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ocampo-Sosa, A.A.; Fernández-Martínez, M.; Cabot, G.; Peña, C.; Tubau, F.; Oliver, A.; Martínez-Martínez, L. Draft Genome Sequence of the Quorum-Sensing and Biofilm-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Strain Pae221, Belonging to the Epidemic High-Risk Clone Sequence Type 274. *Genome Announc.* **2015**, *3*, e01343-14. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

13. Fernández-Olmos, A.; García-Castillo, M.; Alba, J.M.; Morosini, M.I.; Lamas, A.; Romero, B.; Galán, J.C.; del Campo, R.; Cantón, R. Population structure and antimicrobial susceptibility of both nonpersistent and persistent *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51*, 2761–2765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Cortes-Lara, S.; del Barrio-Tofiño, E.; López-Causapé, C.; Oliver, A.; Martínez-Martínez, L.; Bou, G.; Zamorano, L.; Sánchez-Diener, I.; Galán, F.; Gracia, I.; et al. Predicting *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility phenotypes from whole genome sequence resistome analysis. *Clin. Microbiol. Infect.* **2021**, *27*, 1631–1637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kos, V.N.; Déraspe, M.; McLaughlin, R.E.; Whiteaker, J.D.; Roy, P.H.; Alm, R.A.; Corbeil, J.; Gardner, H. The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 427–436. [[CrossRef](#)]
16. Bocharova, Y.A.; Savinova, T.A.; Lyamin, A.V.; Kondratenko, O.V.; Polikarpova, S.V.; Zhilina, S.V.; Fedorova, N.I.; Semykin, S.Y.; Chaplin, A.V.; Korostin, D.O.; et al. Genome features and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in patients with cystic fibrosis in the Russian Federation. *Russ. Clin. Lab. Diagn.* **2021**, *66*, 629–634. [[CrossRef](#)]
17. Ahmed, M.A.S.; Hadi, H.A.; Abu Jarir, S.; Khan, F.A.; Arbab, M.A.; Hamid, J.M.; Alyazidi, M.A.; Al-Maslamani, M.A.; Skariah, S.; Sultan, A.A.; et al. Prevalence and microbiological and genetic characteristics of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* over three years in Qatar. *Antimicrob. Steward. Healthc. Epidemiol.* **2022**, *2*, e96. [[CrossRef](#)]
18. Van Mansfeld, R.; Willems, R.; Brimicombe, R.; Heijerman, H.; Van Berkhout, F.T.; Wolfs, T.; Van der Ent, C.; Bonten, M. *Pseudomonas aeruginosa* genotype prevalence in Dutch cystic fibrosis patients and age dependency of colonization by various *P. aeruginosa* sequence types. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, 4096–4101. [[CrossRef](#)]
19. Mitchelmore, P.J.; Randall, J.; Bull, M.J.; Moore, K.A.; O'Neill, P.A.; Paszkiewicz, K.; Mahenthalingam, E.; Scotton, C.J.; Sheldon, C.D.; Withers, N.J.; et al. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in an unsegregated bronchiectasis cohort sharing hospital facilities with a cystic fibrosis cohort. *Thorax* **2017**, *73*, 677–679. [[CrossRef](#)]
20. Ruiz-Roldán, L.; Rojo-Bezares, B.; de Toro, M.; López, M.; Toledano, P.; Lozano, C.; Chichón, G.; Alvarez-Erviti, L.; Torres, C.; Sáenz, Y. Antimicrobial resistance and virulence of *Pseudomonas spp.* among healthy animals: Concern about exolysin ExlA detection. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 11667. [[CrossRef](#)]
21. Torres, R.T.; Cunha, M.V.; Ferreira, H.; Fonseca, C.; Palmeira, J.D. A high-risk carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone detected in red deer (*Cervus elaphus*) from Portugal. *Sci. Total Environ.* **2022**, *829*, 154699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. CLSI 2022; Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 32th Informational Supplement; CLSI Document M100-S32; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2022.
23. Kus, J.V.; Tullis, E.; Cvitkovitch, D.G.; Burrows, L.L. Significant differences in type IV pilin allele distribution among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis (CF) versus non-CF patients. *Microbiology* **2004**, *150 Pt 5*, 1315–1326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Caballero, J.D.; Wheatley, R.M.; Kapel, N.; López-Causapé, C.; Van der Schalk, T.; Quinn, A.; Shaw, L.P.; Ogunlana, L.; Recanatini, C.; Xavier, B.B.; et al. Mixed strain pathogen populations accelerate the evolution of antibiotic resistance in patients. *Nat. Commun.* **2023**, *14*, 4083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. López-Causapé, C.; Cabot, G.; Del Barrio-Tofiño, E.; Oliver, A. The Versatile Mutational Resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 685. [[CrossRef](#)]
26. Rojo-Bezares, B.; Estepa, V.; Cebollada, R.; de Toro, M.; Somalo, S.; Seral, C.; Castillo, F.J.; Torres, C.; Sáenz, Y. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital: Characterization of metallo-beta-lactamases, porin OprD and integrons. *Int. J. Med. Microbiol.* **2014**, *304*, 405–414. [[CrossRef](#)]
27. Chevalier, S.; Bouffartigues, E.; Bodilis, J.; Maillot, O.; Lesouhaitier, O.; Feuilloley, M.G.J.; Orange, N.; Dufour, A.; Cornelis, P. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, 698–722. [[CrossRef](#)]
28. Lloyd, M.G.; Vossler, J.L.; Nomura, C.T.; Moffat, J.F. Blocking RpoN reduces virulence of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients and increases antibiotic sensitivity in a laboratory strain. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6677. [[CrossRef](#)]
29. Viducic, D.; Ono, T.; Murakami, K.; Katakami, M.; Susilowati, H.; Miyake, Y. *rpoN* gene of *Pseudomonas aeruginosa* alters its susceptibility to quinolones and carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 1455–1462. [[CrossRef](#)]
30. Winstanley, C.; O'Brien, S.; Brockhurst, M.A. *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. *Trends Microbiol.* **2016**, *24*, 327–337. [[CrossRef](#)]
31. Smith, E.E.; Buckley, D.G.; Wu, Z.; Saenphimmachak, C.; Hoffman, L.R.; D'argenio, D.A.; Miller, S.I.; Ramsey, B.W.; Speert, D.P.; Moskowitz, S.M.; et al. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 8487–8492. [[CrossRef](#)]
32. Kadri, S.S.; Adjemian, J.; Lai, Y.L.; Spaulding, A.B.; Ricotta, E.; Prevots, D.R.; Palmore, T.N.; Rhee, C.; Klompas, M.; Dekker, J.P.; et al. Difficult-to-Treat Resistance in Gram-Negative Bacteremia at 173 US Hospitals: Retrospective Cohort Analysis of Prevalence, Predictors, and Outcome of Resistance to All First-Line Agents. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2018**, *67*, 1803–1814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Tamma, P.D.; Aitken, S.L.; Bonomo, R.A.; Mathers, A.J.; van Duin, D.; Clancy, C.J. Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β -lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-P. aeruginosa). *Clin. Infect. Dis.* **2022**, *75*, 187–212. [[CrossRef](#)]
34. Camus, L.; Vandenesch, F.; Moreau, K. From genotype to phenotype: Adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis environment. *Microb. Genom.* **2021**, *7*, 000513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. D'Argenio, D.A.; Wu, M.; Hoffman, L.R.; Kulasekara, H.D.; Déziel, E.; Smith, E.E.; Nguyen, H.; Ernst, R.K.; Larson Freeman, T.J.; Spencer, D.H.; et al. Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* lasR mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients. *Mol. Microbiol.* **2007**, *64*, 512–533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Groleau, M.C.; de Oliveira Pereira, T.; Dekimpe, V.; Déziel, E. PqsE Is Essential for RhlR-Dependent Quorum Sensing Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *mSystems* **2020**, *5*, e00194–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Moradali, M.F.; Ghods, S.; Rehm, B.H. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 39. [[CrossRef](#)]
38. Kostylev, M.; Kim, D.Y.; Smalley, N.E.; Salukhe, I.; Greenberg, E.P.; Dandekar, A.A. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing hierarchy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 7027–7032. [[CrossRef](#)]
39. Feltner, J.B.; Wolter, D.J.; Pope, C.E.; Groleau, M.C.; Smalley, N.E.; Greenberg, E.P.; Mayer-Hamblett, N.; Burns, J.; Déziel, E.; Hoffman, L.R.; et al. LasR Variant Cystic Fibrosis Isolates Reveal an Adaptable Quorum-Sensing Hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* **2016**, *7*, e01513–16. [[CrossRef](#)]
40. Vincent, A.T.; Freschi, L.; Jeukens, J.; Kukavica-Ibrulj, I.; Emond-Rheault, J.-G.; Leduc, A.; Boyle, B.; Jean-Pierre, F.; Groleau, M.-C.; Déziel, E.; et al. Genomic characterization of environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dental unit waterlines revealed the insertion sequence ISPa11 as a chaotropic element. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2017**, *93*, fix106. [[CrossRef](#)]
41. Groleau, M.C.; Taillefer, H.; Vincent, A.T.; Constant, P.; Déziel, E. *Pseudomonas aeruginosa* isolates defective in function of the LasR quorum sensing regulator are frequent in diverse environmental niches. *Environ. Microbiol.* **2021**, *24*, 1062–1075. [[CrossRef](#)]
42. Ruiz-Roldán, L.; Rojo-Bezares, B.; Lozano, C.; López, M.; Chichón, G.; Torres, C.; Sáenz, Y. Occurrence of *Pseudomonas* spp. in Raw Vegetables: Molecular and Phenotypical Analysis of Their Antimicrobial Resistance and Virulence-Related Traits. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 12626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Wang, Y.; Gao, L.; Rao, X.; Wang, J.; Yu, H.; Jiang, J.; Zhou, W.; Xiao, Y.; Li, M.; Zhang, Y.; et al. Characterization of lasR-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 13344. [[CrossRef](#)]
44. Scribner, M.R.; Stephens, A.C.; Huong, J.L.; Richardson, A.R.; Cooper, V.S. The Nutritional Environment Is Sufficient to Select Coexisting Biofilm and Quorum Sensing Mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **2022**, *204*, e0044421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Williams McMackin, E.A.; Djapagne, L.; Corley, J.M.; Yahr, T.L. Fitting Pieces into the Puzzle of *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System Gene Expression. *J. Bacteriol.* **2019**, *201*, e00209–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Wilderman, P.J.; Vasil, A.I.; Johnson, Z.; Vasil, M.L. 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*, 291–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Smith, E.E.; Sims, E.H.; Spencer, D.H.; Kaul, R.; Olson, M.V. Evidence for diversifying selection at the pyoverdine locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 2138–2147. [[CrossRef](#)]
48. Burrows, L.L. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: Type IV pili in action. *Annu. Rev. Microbiol.* **2012**, *66*, 493–520. [[CrossRef](#)]
49. Nguyen, Y.; Jackson, S.G.; Aidoo, F.; Junop, M.; Burrows, L.L. Structural characterization of novel *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilins. *J. Mol. Biol.* **2010**, *395*, 491–503. [[CrossRef](#)]
50. Kiyaga, S.; Kyany'a, C.; Muraya, A.W.; Smith, H.J.; Mills, E.G.; Kibet, C.; Mboowa, G.; Musila, L. Genetic Diversity, Distribution, and Genomic Characterization of Antibiotic Resistance and Virulence of Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Strains in Kenya. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 835403. [[CrossRef](#)]
51. Giltner, C.L.; Rana, N.; Lunardo, M.N.; Hussain, A.Q.; Burrows, L.L. Evolutionary and functional diversity of the *Pseudomonas* type IVa pilin island. *Environ. Microbiol.* **2010**, *13*, 250–264. [[CrossRef](#)]
52. Asikyan, M.L.; Kus, J.V.; Burrows, L.L. Novel proteins that modulate type IV pilus retraction dynamics in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 7022–7034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Kus, J.V.; Kelly, J.; Tessier, L.; Harvey, H.; Cvitkovitch, D.G.; Burrows, L.L. Modification of *Pseudomonas aeruginosa* Pa5196 type IV Pilins at multiple sites with D-Araf by a novel GT-C family Arabinosyltransferase, TfpW. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 7464–7478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Kung, V.L.; Ozer, E.A.; Hauser, A.R. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 621–641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Horna, G.; Quezada, K.; Ramos, S.; Mosqueda, N.; Rubio, M.; Guerra, H.; Ruiz, J. Specific type IV pili groups in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. Microbiol.* **2019**, *22*, 131–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Meyer, J.M.; Stintzi, A.; De Vos, D.; Cornelis, P.; Tappe, R.; Taraz, K.; Budzikiewicz, H. Use of siderophores to type pseudomonads: The three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology* **1997**, *143*, 35–43. [[CrossRef](#)]
57. Cornelis, P.; Hohnadel, D.; Meyer, J.M. Evidence for different pyoverdine-mediated iron uptake systems among *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Infect. Immun.* **1989**, *57*, 3491–3497. [[CrossRef](#)]
58. Baysse, C.; Meyer, J.M.; Plesiat, P.; Geoffroy, V.; Michel-Briand, Y.; Cornelis, P. Uptake of pyocin S3 occurs through the outer membrane ferripyoverdine type II receptor of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 3849–3851. [[CrossRef](#)]
59. Behrens, H.M.; Lowe, E.D.; Gault, J.; Housden, N.G.; Kaminska, R.; Weber, T.M.; Thompson, C.M.A.; Mislin, G.L.A.; Schalk, I.J.; Walker, D.; et al. Pyocin S5 Import into *Pseudomonas aeruginosa* Reveals a Generic Mode of Bacteriocin Transport. *mBio* **2020**, *11*, e03230–19. [[CrossRef](#)]

60. Mulet, X.; Cabot, G.; Ocampo-Sosa, A.A.; Domínguez, M.A.; Zamorano, L.; Juan, C.; Tubau, F.; Rodríguez, C.; Moyà, B.; Peña, C.; et al. Biological Markers of *Pseudomonas aeruginosa* Epidemic High-Risk Clones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 5527–5535. [[CrossRef](#)]
61. Magiorakos, A.-P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 268–281. [[CrossRef](#)]
62. Rojo-Bezares, B.; Cavalié, L.; Dubois, D.; Oswald, E.; Torres, C.; Sáenz, Y. Characterization of carbapenem resistance mechanisms and integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains from blood samples in a French hospital. *J. Med. Microbiol.* **2016**, *65*, 311–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. 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*, 15–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Heras, J.; Domínguez, C.; Mata, E.; Pascual, V.; Lozano, C.; Torres, C.; Zarazaga, M. GelJ—A tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinform.* **2015**, *16*, 270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Casado-García, Á.; Chichón, G.; Domínguez, C.; García-Domínguez, M.; Heras, J.; Inés, A.; López, M.; Mata, E.; Pascual, V.; Sáenz, Y. Motility]: An open-source tool for the classification and segmentation of bacteria on motility images. *Comput. Biol. Med.* **2021**, *136*, 104673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Semmler, A.B.; Whitchurch, C.B.; Mattick, J.S. A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **1999**, *145*, 2863–2873. [[CrossRef](#)]
67. Cullen, L.; Weiser, R.; Olszak, T.; Maldonado, R.F.; Moreira, A.S.; Slachmuylders, L.; Brackman, G.; Paunova-Krasteva, T.S.; Zarnowiec, P.; Czerwonka, G.; et al. Phenotypic characterization of an international *Pseudomonas aeruginosa* reference panel: Strains of cystic fibrosis (CF) origin show less in vivo virulence than non-CF strains. *Microbiology* **2015**, *161*, 1961–1977. [[CrossRef](#)]
68. Vielva, L.; de Toro, M.; Lanza, V.F.; de la Cruz, F. PLACNETw: A web-based tool for plasmid reconstruction from bacterial genomes. *Bioinformatics* **2017**, *33*, 3796–3798. [[CrossRef](#)]
69. Seemann, T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2068–2069. [[CrossRef](#)]
70. Lanza, V.F.; de Toro, M.; Garcillán-Barcia, M.P.; Mora, A.; Blanco, J.; Coque, T.M.; de la Cruz, F. Plasmid flux in *Escherichia coli* ST131 sublineages, analyzed by Plasmid Constellation Network (PLACNET), a new method for plasmid reconstruction from whole genome sequences. *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004766. [[CrossRef](#)]
71. Nguyen, L.T.; Schmidt, H.A.; von Haeseler, A.; Minh, B.Q. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **2015**, *32*, 268–274. [[CrossRef](#)]
72. Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W256–W259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Page, A.J.; Cummins, C.A.; Hunt, M.; Wong, V.K.; Reuter, S.; Holden, M.T.G.; Fookes, M.; Falush, D.; Keane, J.A.; Parkhill, J. Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* **2015**, *31*, 3691–3693. [[CrossRef](#)]
74. Cantalapedra, C.P.; Hernández-Plaza, A.; Letunic, I.; Bork, P.; Huerta-Cepas, J. eggNOG-mapper v2: Functional Annotation, Orthology Assignments, and Domain Prediction at the Metagenomic Scale. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 5825–5829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Zankari, E.; Hasman, H.; Cosentino, S.; Vestergaard, M.; Rasmussen, S.; Lund, O.; Aarestrup, F.M.; Larsen, M.V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**, *67*, 2640–2644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Alcock, B.P.; Raphenya, A.R.; Lau, T.T.Y.; Tsang, K.K.; Boucharde, M.; Edalatmand, A.; Huynh, W.; Nguyen, A.-L.V.; Cheng, A.A.; Liu, S.; et al. CARD 2020: Antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D517–D525. [[CrossRef](#)]
77. Gupta, S.K.; Padmanabhan, B.R.; Diene, S.M.; Lopez-Rojas, R.; Kempf, M.; Landraud, L.; Rolain, J.M. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 212–220. [[CrossRef](#)]
78. Liu, B.; Zheng, D.; Jin, Q.; Chen, L.; Yang, J. VFDB 2019: A comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D687–D692. [[CrossRef](#)]
79. Alikhan, N.F.; Petty, N.K.; Ben Zakour, N.L.; Beatson, S.A. BLAST Ring Image Generator (BRIG): Simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genom.* **2011**, *12*, 402. [[CrossRef](#)]
80. Madaha, E.L.; Mienie, C.; Gonsu, H.K.; Bughe, R.N.; Fonkoua, M.C.; Mbacham, W.F.; Alayande, K.A.; Bezuidenhout, C.C.; Ateba, C.N. Whole-genome sequence of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains UY1PSABAL and UY1PSABAL2 isolated from human broncho-alveolar lavage, Yaoundé, Cameroon. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0238390. [[CrossRef](#)]
81. López-Causapé, C.; Sommer, L.M.; Cabot, G.; Rubio, R.; Ocampo-Sosa, A.A.; Johansen, H.K.; Figuerola, J.; Cantón, R.; Kidd, T.J.; Molin, S.; et al. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* mutational resistome in an international Cystic Fibrosis clone. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5555. [[CrossRef](#)]
82. Díaz-Caballero, J.D.; Clark, S.T.; Coburn, B.; Zhang, Y.; Wang, P.W.; Donaldson, S.L.; Tullis, D.E.; Yau, Y.C.W.; Waters, V.J.; Hwang, D.M.; et al. Selective Sweeps and Parallel Pathoadaptation Drive *Pseudomonas aeruginosa* Evolution in the Cystic Fibrosis Lung. *mBio* **2015**, *6*, e00981-15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

83. Winsor, G.L.; Van Rossum, T.; Lo, R.; Khaira, B.; Whiteside, M.D.; Hancock, R.E.W.; Brinkman, F.S.L. *Pseudomonas* Genome Database: Facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *37*, D483–D488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Lee, D.G.; Urbach, J.M.; Wu, G.; Liberati, N.T.; Feinbaum, R.L.; Miyata, S.; Diggins, L.T.; He, J.; Saucier, M.; Deziel, E.; et al. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.* **2006**, *7*, R90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Article

Resistance to Fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa* from Human, Animal, Food and Environmental Origin: The Role of *CrpP* and Mobilizable ICES

María López ^{*,†} , Beatriz Rojo-Bezares ^{*,†} , Gabriela Chichón and Yolanda Sáenz ^{*,†} 

Área de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), 26006 Logroño, Spain

* Correspondence: mlopezm@riojasalud.es (M.L.); brojo@riojasalud.es (B.R.-B.); ysaenz@riojasalud.es (Y.S.);

Tel./Fax: +34-941-27-88-68

† These authors contributed equally to this work and both are first authors.

Abstract: Fluoroquinolone resistance and the associated genetic mechanisms were assessed by antimicrobial susceptibility and whole genome sequencing in 56 *Pseudomonas aeruginosa* strains from human, animal, food and environmental origins. *P. aeruginosa* PAO1, PA7 and PA14 reference strains were also included in the study. Twenty-two strains (37%) were resistant to, at least, one fluoroquinolone agent. Correlation between the number of changes in GyrA and ParC proteins and the level of fluoroquinolone resistance was observed. Mutations or absence of genes, such as *mexZ*, *mvaT* and *nalD* encoding efflux pumps regulators, were also found in resistant strains. The *crpP* gene was detected in 43 strains (72.9%; 17 of them non-clinical strains), and coded seven different CrpP variants, including a novel one (CrpP-7). The *crpP* gene was located in 23 different chromosomal mobile integrative and conjugative elements (ICES), inserted in two tRNAs integration sites. A great variety of structures was detected in the *crpP*-ICES elements, e.g., the fimbriae related *cup* clusters, the mercury resistance *mer* operon, the pyocin S5 or S8 bacteriocin encoding genes, and mobilization genes. The location of *crpP*-like genes in mobilizable ICES and linked to heavy metal resistance and virulence factors is of significant concern in *P. aeruginosa*. This work provides a genetic explanation of the fluoroquinolone resistance and *crpP*-associated pathogenesis of *P. aeruginosa* from a One-Health approach.

Keywords: *Pseudomonas*; ciprofloxacin; mutational resistance; efflux pump; CrpP; one health



Citation: López, M.; Rojo-Bezares, B.; Chichón, G.; Sáenz, Y. Resistance to Fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa* from Human, Animal, Food and Environmental Origin: The Role of *CrpP* and Mobilizable ICES. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1271. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091271>

Academic Editor: Sara M. Soto

Received: 8 August 2022

Accepted: 14 September 2022

Published: 19 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an environmentally ubiquitous species, with great metabolic versatility and with an extraordinary ability to inhabit animals, soil, water or plants, from which it is easily transmissible. *P. aeruginosa* is a versatile opportunistic pathogen of great clinical importance due to its high pathogenicity and antimicrobial resistance [1].

Fluoroquinolones are synthetic products of broad-spectrum antimicrobial action, and are a major class of antibiotics used to treat *P. aeruginosa* infections. Their mechanism of action is the inhibition of DNA gyrase and topoisomerase IV, causing DNA breakdown and cell death [2]. However, bacterial resistance to fluoroquinolones has progressively been increased [2,3]. Three main resistance mechanisms have been detected in *P. aeruginosa*: (1) Chromosomal point mutations in the so-called quinolone resistance determining region (QRDR) of the genes encoding GyrA and GyrB subunits of the DNA gyrase, and ParC and ParE subunits of the topoisomerase IV. The amino acid positions more frequently described are Thr83 and Asp87 in GyrA, Ser466 and Glu468 in GyrB, Ser87 in ParC, and Asp419, Glu459, Ala473 and Ser457 in ParE [3]. (2) Efflux pumps overexpression or permeability alterations that reduce the intracytoplasmic concentration of fluoroquinolones. Four efflux pumps of *P. aeruginosa* are known to efflux fluoroquinolones (MexCD-OprJ/MexEF-OprN/MexAB-OprM/MexXY-OprM), and their overexpression is associated with muta-

tions in their regulator genes (*nfxB* / *mexS/mexR*, *nalC*, *nalD/mexZ*, respectively) [3]. (3) Acquisition of transferable mechanisms of quinolone resistance (TMQR), such as Qnr, QepA, OqxAB, AAC(6′)-Ib-cr, QacA and QacB families [2]. TMQR prevalence is low in *P. aeruginosa* [3–5].

In addition, a 65-amino-acid protein, CrpP (ciprofloxacin resistance protein, plasmid encoded), was first reported in 2018 as a novel ciprofloxacin-modifying enzyme, encoded by a gene located on the pUM505 plasmid in a clinical *P. aeruginosa* isolate [6]. Thereafter, abundant *crpP* homologues have been reported in *P. aeruginosa* and in *Enterobacteriaceae* [4,7–10]. *crpP* genes have been identified in *P. aeruginosa* as part of different mobile integrative and conjugative elements (ICEs) that frequently transfer horizontally. Moreover, genetic environment of *crpP* gene could carry different resistance genes, virulence factors and various mobile genetic elements that may contribute to the spread of pathogens in hospital settings [4,8,11].

The majority of fluoroquinolone-resistance and CrpP studies have focused on clinical *P. aeruginosa* strains from humans, but scarce or absent on animal, food and environmental strains. This study aimed to characterize the fluoroquinolone resistance in a collection of *P. aeruginosa* from different origins, and to assess the associated genetic resistance mechanisms.

2. Results and Discussion

The high use of fluoroquinolone agents has contributed to the selection and dispersion of fluoroquinolone-resistant pathogens in both hospital and environmental settings. In this study, the resistance to fluoroquinolones and the involved genetic mechanisms have been analyzed in a collection of 56 *P. aeruginosa* strains isolated from a wide variety of clinical and non-clinical origins, including clinical and healthy humans, healthy animals, water, and food (Table S1). In addition, the three *P. aeruginosa* PAO1, PA14, and PA7 reference strains were also included in the study. Thirty-three strains (55.9%), including *P. aeruginosa* PAO1 and PA14, were susceptible to all fluoroquinolones tested (ciprofloxacin, levofloxacin, norfloxacin and ofloxacin). All but two non-clinical strains showed this susceptible phenotype (Figure 1, and Table S2). On the other hand, 22 strains (37.3%) were resistant to at least one fluoroquinolone tested, being twelve of them and *P. aeruginosa* PA7 resistant to all fluoroquinolones tested (22%). These resistance percentages were slightly higher than those detected in invasive (blood or cerebrospinal fluid) isolates in Spain (18.1%) and Europe (18.9%) [12].

The three main fluoroquinolone resistance mechanisms have been studied in the 59 *P. aeruginosa* strains of our study: chromosomal mutations in drug targets; efflux pump activity or permeability alterations; and acquisition of TMQR. The mutational resistome was determined by analyzing the mutations in 23 chromosomal genes implicated in fluoroquinolone targets and efflux pumps (Table S3).

2.1. Chromosomal Mutations in Fluoroquinolone Targets

Regarding the amino acid changes detected within the QRDR of GyrA, ParC, GyrB and ParE: two different substitutions were identified in GyrA (S83I and D87N), and ParE proteins (H461D and A473V), and three changes were observed in GyrB (S466A, S466F and I529V) and ParC (S87W, S87L and L95Q) (Table S2). To our knowledge, this is the first report of the L95Q substitution in the ParC protein of *P. aeruginosa* strains, and it was detected in a fluoroquinolone-resistant clinical strain (*P. aeruginosa* G273). No single ParC changes were found in our *P. aeruginosa* collection, whereas single GyrB and ParE substitutions were detected among ciprofloxacin-susceptible and resistant strains. As in previous studies [14–16], a correlation between the number of changes in GyrA and ParC proteins and the level of fluoroquinolone resistance was observed. None fluoroquinolone-susceptible *P. aeruginosa* showed changes either in QRDR of GyrA or ParC. A single amino acid change in the GyrA protein was associated with low ciprofloxacin resistance (MIC 2–4 mg/L), two substitutions (one in GyrA and one in ParC) with a moderate or high level of ciprofloxacin resistance (MIC 8–128 mg/L), and three substitutions (two in GyrA and

one in ParC) were associated with the highest ciprofloxacin MICs (128–256 mg/L) (Figure 1, and Table S2). Curiously, all strains belonging to ST175 showed the highest fluoroquinolone MICs and the same substitutions in GyrA (T83I+D87N), and in ParC (S87W+L168Q).

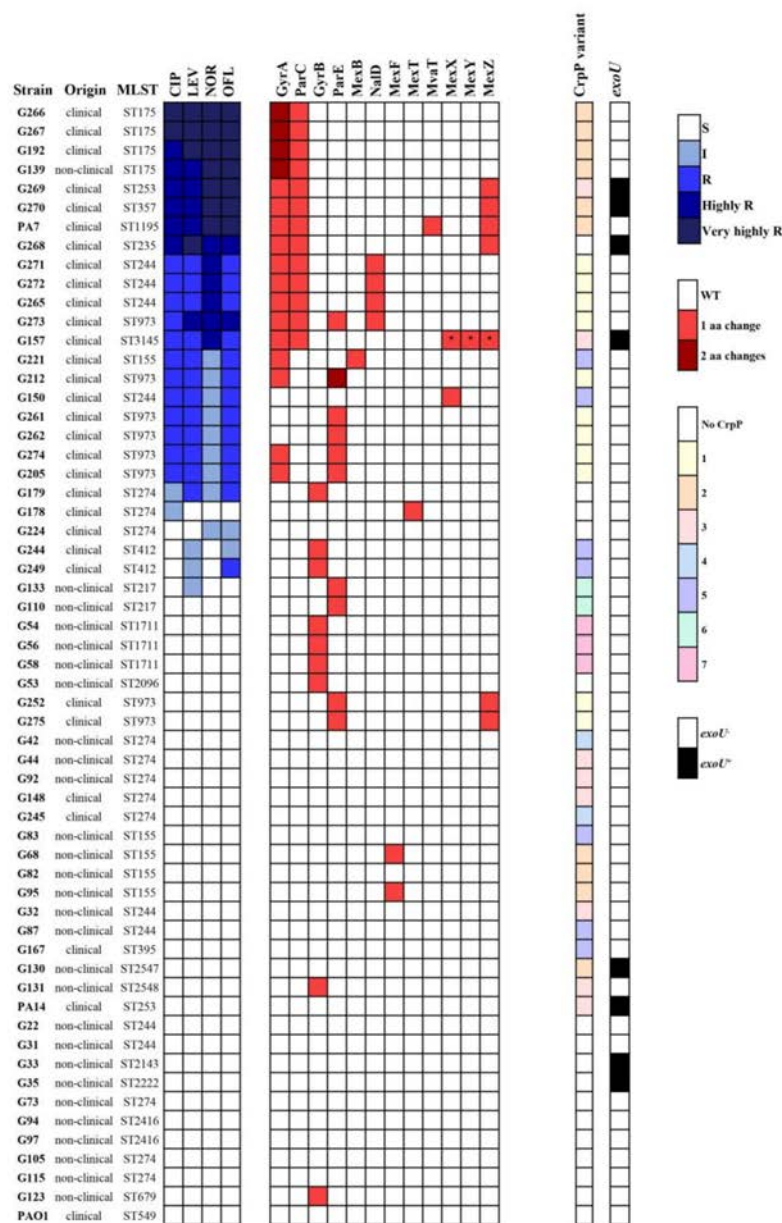


Figure 1. Heatmap Showing Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of Fluoroquinolones (CIP = ciprofloxacin; LEV = levofloxacin; OFL = ofloxacin; NOR = norfloxacin) Where S Corresponds to Susceptible, I to Intermediate, R to Resistant until 32mg/L, highly R from >32 to 128mg/L, and very Highly R >128mg/L (levels of resistance according to Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI [13]). The different variants of CrpP are shown in different colors, and the presence of the *exoU* gene is indicated in black. The fluoroquinolone relevant alterations detected in 12 chromosomal proteins are shown in red or maroon colors depending on the number of alterations. *P. aeruginosa* PA14 is the same as UCBPP-PA14. * Protein not detected.

Recently, Rehman et al. (2021) [15] highlighted the importance of gene–gene interactions in ciprofloxacin resistance. They showed that the T83I substitution in GyrA (without an additional mechanism of resistance) is unable to confer a ciprofloxacin-resistance in *P. aeruginosa*, being 1 mg/mL the predicted ciprofloxacin MIC. They also observed that the

presence of other mutations (in GyrB, ParE, ParC or NfxB) increases the MIC only if the GyrA mutation is present. This is in accordance with our results (Figure 1, and Table S2), whereas there were strains that did not follow the above correlation pattern, such as the three ciprofloxacin-resistant strains (G150, G261, G262) without mutations in GyrA and ParC; or the 9 strains that show a wide range of ciprofloxacin MIC (MIC 8–128 mg/mL) although they harbored the same amino acid substitutions (T83I in GyrA and S83L in ParC) (Figure 1, and Table S2). The presence of active efflux pumps or mutations that affect regulatory genes could explain these situations as it is showed below.

2.2. Efflux Pumps Overexpression and Mutational Resistome

PA β N is a widely used efflux-pump inhibitor in *Enterobacteriaceae* and *P. aeruginosa*, where a four- or eight-fold reduction in the fluoroquinolone MIC in the PA β N presence is an indicator of an efflux-pump overexpression [17,18]. In our study, 38 strains reduced their ciprofloxacin MIC by more than two-fold in presence of 40 mg/L PA β N (Table S2), 17 of them being ciprofloxacin-resistant strains (MIC reduction range from 4 to > 233 folds). This effect was especially noticeable in strains with one single GyrA substitution and in the G157 strain, because the MIC of ciprofloxacin decreased from resistant to susceptible levels. Besides, the nine strains (including G157, and PA7, G265, G268, G269, G270, G271, G272, G273) with two substitutions in the fluoroquinolone targets (T83I in GyrA, and S83L/S83W/L95Q in ParC) reduced their wide range of ciprofloxacin resistance (MIC 8–128 mg/L) in presence of PA β N (MIC < 0.06–16 mg/L). These results indicate the presence of efflux-pump overexpression or the membrane permeabilization in those strains.

The mutational resistome of genes involved in the four fluoroquinolone efflux pump systems (MexA-MexB-OprM, MexC-MexD-OprJ, MexE-MexF-OprN and MexX-MexY-OprM) and their regulators and activators was analyzed in the 59 strains of our study (Table S2). The overexpression of efflux pumps plays a prominent role in the multidrug resistance of *P. aeruginosa*, and is mainly associated with the loss of function of their repressor genes (*mexR*, *nalC*, *nalD*, *nfxB*, *mexS*, *mvaT* and *mexZ*) or the gain of function of their activator genes (*mexT*) [3,14].

Non-synonymous mutations, deletions or insertions have been observed in all genes analyzed (Table S2). Alterations were most frequently observed in *mexD*, *mexX*, *mexY* and *nalC* genes (98, 98, 95 and 85% of the strains, respectively), and the lowest ones in *mvaT*, *mexT* and *mexA* genes (2, 8 and 10% of the strains, respectively). Multiple alterations in these chromosomal resistance genes were classified as wildtype *P. aeruginosa* natural polymorphisms [19], or were already reported showing no effect on efflux pump expression and considered as insignificant for the fluoroquinolone resistance, such as V126E in MexR, or G71E and S209R in NalC [20–23]. Thus, Figure 1 shows the alterations (premature stop codons, substitutions, frameshifts, deletions or insertions) previously reported as fluoroquinolone relevant ones [3,15,19,21–24] that were detected in the 59 *P. aeruginosa* strains of our study (Table S2).

None of the previously reported mutations resulting in deficient NfxB or MexS activity as well as overexpression of MexEF-OprN or MexCD-OprJ efflux pumps, and associated with high-level (clinical) fluoroquinolone resistance [19,25–27], were detected among the 59 strains analyzed.

Regarding the nine strains with the two substitutions in GyrA and ParC targets, it was highlighted that the four strains (G268, G269, G270, PA7) with the highest ciprofloxacin MICs showed premature stop codons or deletions in MexZ (repressor of MexXY-OprM), and the remaining strains, with the exception of the G157 strain, (G265, G271, G272, G273) showed premature stop codons or deletions in the *nalD* gene (repressor of MexAB-OprM) (Figure 1 and Table S2). Those detected mutations lead to defective proteins which could not act as repressors in MexXY-OprM and MexAB-OprM pumps, respectively. Both efflux pumps are constitutively expressed in wild-type strains, but it has been reported that the loss of function of MexZ and NalD lead to efflux overexpression, respectively, and contribute modestly to clinical fluoroquinolone resistance [24,28].

On the other hand, it is interesting to highlight that the G157 strain, which was characterized by the reduction of >233 folds of ciprofloxacin MIC in PA β N presence (from resistant to susceptible levels), lacked the *mexX*, *mexY* and *mexZ* genes (Figure 1 and Table S2). PA β N is a broad spectrum efflux pump inhibitor, but its membrane permeabilization activity has also been described at concentration ≥ 16 mg/L in *P. aeruginosa*, being relevant in efflux pumps deficient strains [29–31]. The efflux pump deficiency linked to the PA β N ability to permeabilize membranes could explain the reduction to ciprofloxacin susceptibility in the G157 strain, and to our knowledge, this is the first detection in a clinical (no laboratory) *P. aeruginosa* strain.

2.3. TMQR Acquisition: Presence of CrpP

Forty-three strains (72.9%; 24 clinical, 17 non-clinical, and PA7 and UCBPP-PA14 reference strains) harbored the *crpP* gene, but no other TMQR was found in any of the 59 *P. aeruginosa* strains of our study (Figure 1 and Table S2). This *crpP*-carrying percentage was higher than those obtained in previous studies performed with clinical *P. aeruginosa* from Portugal (59.5%) [4], from India and Australia (63%) [5], from France and Switzerland (46%) [8] or from China (25.4–53.5%) [10,32], but lower than those previously described in clinical *P. aeruginosa* from Spain (84.6%) [4].

The amino acid sequences of CrpP of all 43 strains were compared with the first CrpP described (NCBI Reference Sequence: WP_033179079.1) [6], and seven different CrpP variants were found, grouped in three clades (Figure 2a). CrpP-1 corresponded with the wild-type protein, but the remaining six CrpP variants presented amino acid changes at least in positions Gly7 and/or Ile26 (Figure 2b). All the variants were previously found [4,9,10,32], except the variant CrpP-7, that has been described for the first time in this study. CrpP-7 showed 5 amino acid changes with respect to CrpP-1 (92% identity), and was detected in three fluoroquinolone-susceptible *P. aeruginosa* isolated from wild boar fecal samples. CrpP-1 was the predominant variant (11 strains, 26%), followed by CrpP-2 (10 strains, 23%), CrpP-3 (8 strains, 19%) and CrpP-5 (7 strains, 16%). The *crpP* gene was found in a wide variety of *P. aeruginosa* clones. Although no significant differences were observed between CrpP variant and sequence types, CrpP-4, CrpP-6 and CrpP-7 variants were detected in strains belonging to ST274, ST217 and ST1711, respectively, and the four strains belonging to high-risk clone ST175 harbored the CrpP-2 variant (Figure 1 and Table S2).

Since the CrpP-1 was initially identified in Mexico in 2018 [6], more than 37 CrpP variants have been reported in *Pseudomonas spp.* from at least 16 countries [4,9,10]. However, the *crpP* presence is not always associated with ciprofloxacin resistance. Indeed, twenty-one out of our 43 *crpP*-positive strains (53%) were susceptible to all fluoroquinolones tested, and the *crpP* presence did not significantly increase the fluoroquinolone MICs in our strains. Previous works also observed these results [4,5,8,10,27,32], highlighting a recent study where rigorous experimental results evidenced that CrpP is not a ciprofloxacin-modifying enzyme nor confers clinical fluoroquinolone resistance [33].

Independently of the impact on fluoroquinolone susceptibility, the global dissemination of *crpP* and homologous genes was observed, not only in *Pseudomonas spp.*, but also in other Gram-negative bacteria genomes worldwide [7,9,11]. Indeed, *crpP* was originally identified in the conjugative plasmid pUM505 [6], although ICEs have been identified as the major reservoirs of *crpP* genes in *P. aeruginosa* [4,10,11]. The location of *crpP*-like genes into mobile genetic elements is of concern, because they also carry genes encoding virulence factors or involved in heavy metal resistance that can be spread among pathogens in different settings.

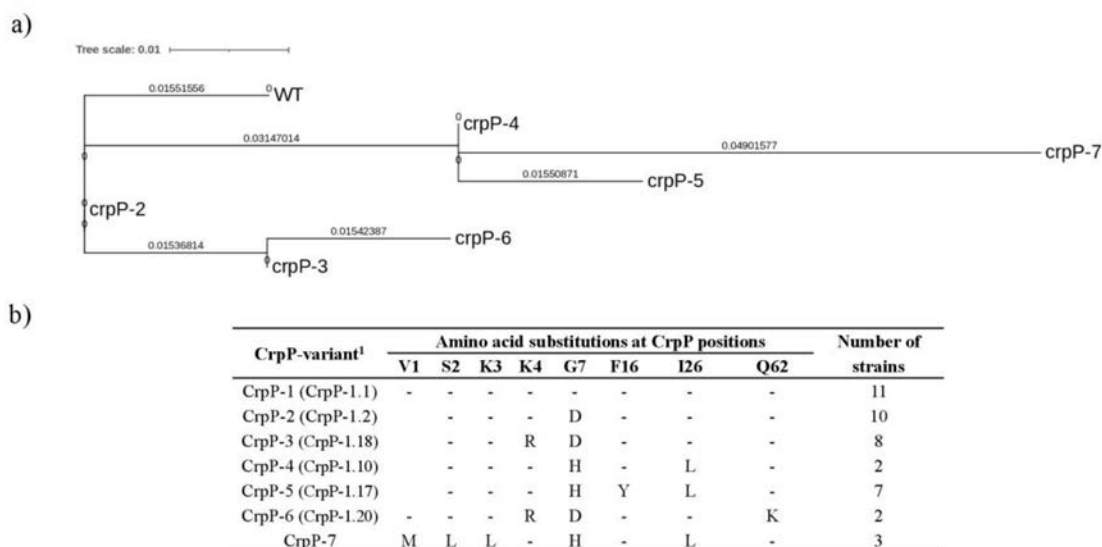


Figure 2. (a) Maximum-likelihood phylogenetic tree generated by the alignment of the amino acidic sequences of the CrpP variants found in this study. The alignment and the tree were generated with MEGA11. WT is CrpP-1. (b) Amino acid substitutions of each CrpP variant detected in this study compared to the first described CrpP in pUM505 plasmid (named CrpP-1) (GenBank accession number HM560971). ¹ The variants included into brackets correspond to the variants previously detected by Zhu et al. (2021) [10]. CrpP-7 is a new variant found only in our study.

The analysis of the *crpP* genetic location in the genome of our *P. aeruginosa* strains revealed that the gene was located in chromosomal ICEs in all the 43-*crpP* positive strains. All *crpP* ICEs carried a MOBH2 relaxase, the ICE sizes ranged from 80 to 165 Kb with a G+C content of 59–60%, and tRNA-Lys was the ICE insertion site. The *crpP* gene was flanked by the highly conserved 45 bp direct repeats (*attL* and *attR*), and at both extremities by the *xerD* and *parA* genes, encoding an integrase of the tyrosine recombinase family and the plasmid partition protein A, respectively, as previously reported [8,10,11].

The ICE structures of the 43 *crpP*-positive *P. aeruginosa* strains, as well as the reference plasmid pUM5053 were analyzed. The *crpP*-ICEs were variable in composition, although displaying a similar backbone gene organization. A phylogenetic tree was constructed from the core single-nucleotide polymorphisms (SNPs) within the ICE backbones (using the sequence of pUM505 as reference) (Figure 3). Three separate clustering groups and 23 different ICEs were observed.

Some association has been observed between the type of *crpP*-ICE and the *P. aeruginosa* sequence type (ST), highlighting that all *P. aeruginosa* ST973 (G205, G212, G252, G261, G262, G273, G274 and G275) showed the same *crpP*-ICE (Figure 3). The G157, G269 and UCBPP-PA14 strains belonged to the clonal complex CC253 and harbored similar *crpP*-ICEs. However, the strains belonging to ST155, ST244 and ST274 had a great variety of *crpP*-ICEs. The genetic structures of the 23 different *crpP*-ICEs identified in Figure 3 were compared, and all of them showed a conserved and a variable region (Figure 4). The conserved region (delimited between the class I SAM-dependent methyltransferase encoding gene and *parA*) included the *crpP* gene and the type IV pili synthesis operon (*pil* operon). On the other hand, a great variety of structures was detected in the variable region (delimited between *xerD* and the class I SAM-dependent methyltransferase encoding gene) of the 23 different *crpP*-ICEs. Several insertion sequences (*ISPa32*, *ISPa40*, *ISPa97*, *ISPa121*, *ISPa125*, *TnAs1*, etc.), the fimbriae related *cupA*, *cupD* or *cupE* clusters, the mercury resistance *mer* operon, the pyocin S5 and S8 bacteriocin encoding genes, and mobilization genes such as *virB*, *virD*, *tra* and *trb* operon, among others, were included in the *crpP*-ICE variable regions (Figure 4). Among these elements found in the *crpP*-ICEs, *cup* locus encodes bacterial adhesive organelles, and *pyoS5* and *pys8* genes encode S5 pyocin and S8

pyocin, respectively, that mediate bactericidal activity against other *P. aeruginosa* isolates were detected. The genetic environment of *pys8* is organized in transposon Tn6350 [34], being this structure found in the strains G87 and G150 within *crpP*-ICE. Additionally, the 23 integrases XerD identified in this study shared from 59.76 to 99.77% amino acid identity, and their protein alignment was plotted in a tree where four different branches were identified (Figure S1).

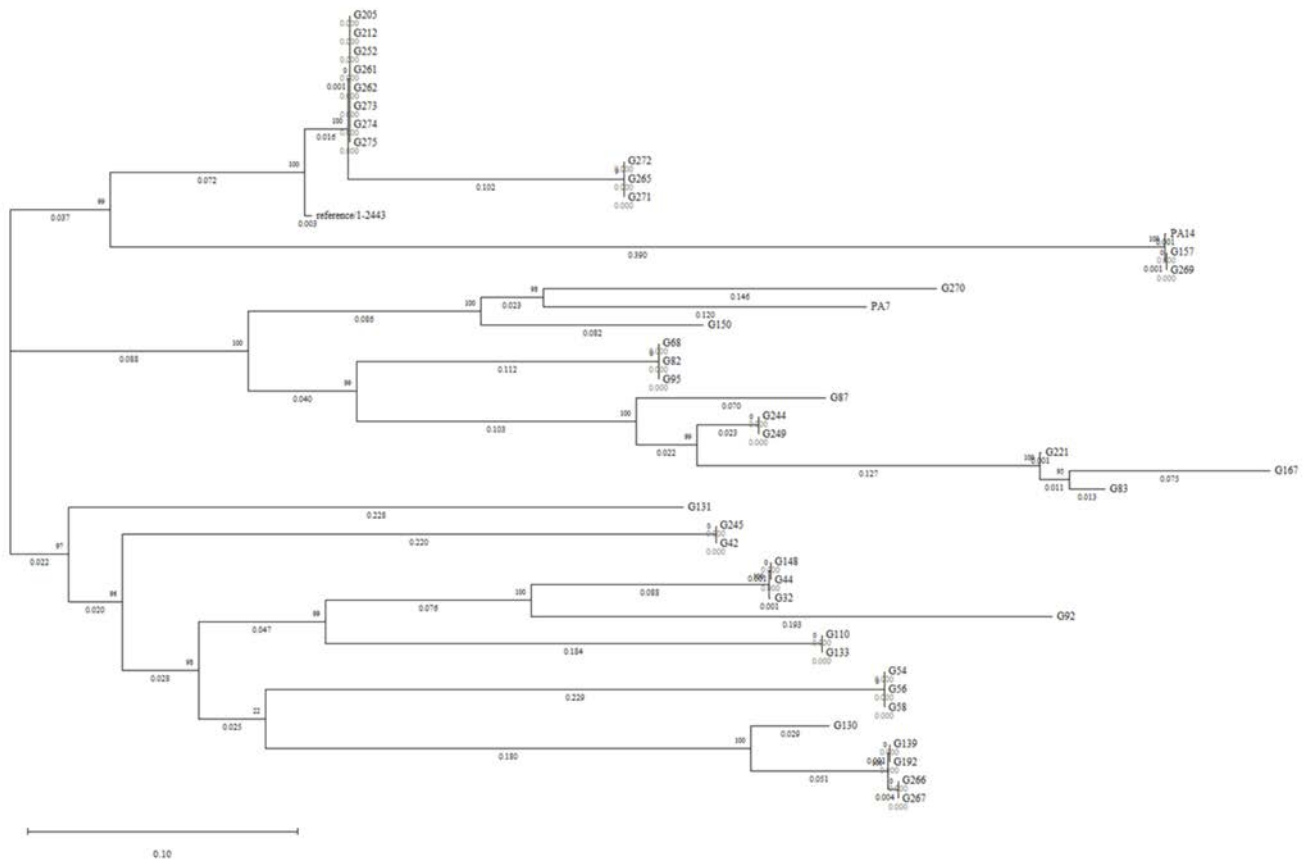


Figure 3. Phylogenetic tree of the *crpP*-ICEs detected in the 43 *crpP*-positive *P. aeruginosa* and the reference plasmid pUM505 (reference 1-2443) build based on the concatenated alignment of the high-quality SNPs, using CSI Phylogeny and MEGA-11.

The presence of this arsenal of genes, together with the fact that ICEs have the capacity to be transferred among *P. aeruginosa* strains, highlights the *crpP*-ICE role in the dissemination of resistance mechanisms and virulence that would enhance, on host *P. aeruginosa* strains, the adaptation to different niches, including hospital environment, as well as its expansion towards other relevant genera (i.e., *Acinetobacter*).



Figure 4. Comparison of different genetic environments of *crpP*-harboring *P. aeruginosa*. Arrows represent genes and indicate the orientation. Relevant genes are indicated by colored arrows as follows:

xerD and *parA* genes (dark blue), mobilization genes (*virB*, *virD*, *tra* genes and *trb* operon) (orange), *pil* operon (green), *mer* operon (pink), fimbrial operon (brown), mobile element (IS and Tn) (yellow), pyocin gene (dark grey) and *crpP* gene (red).

The *crpP*-ICEs were integrated into specific hotspots. The tRNAs are known to serve as integration sites for ICEs and phage-like elements [35]. Indeed, all the 43 *crpP*-ICEs detected in this study were integrated at the end of the tRNA-Lys that was found alone or in a tRNA cluster (tRNA-Asn, tRNA-Pro, tRNA-Lys), as was previously described [11]. The two different genomic environments detected (PA4541/PA4542 and PA0976/PA0988) were as follows: (i) PA4541/PA4542, the ICE was inserted between PA4541 (*lepA*) and PA4542 (*clpB*) after the tRNA cluster (observed in 29 strains, including UCBPP-PA14); or (ii) PA0976/PA0988, ICE inserted between PA0976 (*queC*) and PA0988 (CoAhydrolase) after the single tRNA-Lys (detected in 14 strains, including PA7) (Figure 5, Table S4). These two insertion points are considered as regions of genome plasticity (RGPs) [35]. Interestingly, all the 14 strains harboring the *crpP*-ICEs inside the PA0976/PA0988 point, showed the “hot spot” PA4541/PA4542 empty. However, different structures were observed in the 29 strains with the *crpP*-ICEs inserted in the PA4541/PA4542 point: 10 strains showed an empty PA0976/PA0988 structure, 4 strains carried the *exoU*-PAGI, 6 strains harbored an ICE with the *pyoS5* gene, one strain presented a genomic island similar to PAGI-5 (GenBank accession No. EF611301), and the PA0976/PA0988 region was not totally ascertained in 8 strains (Figure 5, Table S4).

The presence of the PA4541/PA4542 and PA0976/PA0988 insertion points was also investigated in the 16 *crpP*-negative *P. aeruginosa* strains of this study (Figure 5, Table S4). The PA4542/PA4541 insertion point was empty in all but one strain. The PA0976/PA0988 region was empty in six strains, but included the *exoU*-PAGI in two strains, the *pyoS5*-ICE in four strains (including PAO1 strain), the PAGI-5-like in two strains, and an ICE in two strains, whose insertion removed from PA0988 to PA0998 region, leaving a partial *pqsB* gene (PA0997) (Figure 5, Table S4). All these elements, including the *crpP*-ICE, belong to the pKLC102-subtype genomic islands, which harbor a XerC/XerD integrase gene. These integrases recognize these two insertion points which both are the unique tRNA-Lys present in the *P. aeruginosa* genome [35].

In summary, resistance to fluoroquinolones in *P. aeruginosa* is multifactorial as Table 1 shows. Genomic information could predict ciprofloxacin resistance and susceptibility, such as recent works have reported using manual and machine learning approaches [19,36]. Particularly, mutations in the QRDR of GyrA and ParC have the highest effect on fluoroquinolone resistance levels. In our study, other related proteins were found to be altered or absent in resistant strains, such as those implicated in efflux pumps regulation: MexZ, MvaT and NalD. Other alterations in the studied genes were detected, but in susceptible- and resistant-strains, and therefore, their implication in resistance could not be proved. The same fact occurs with the presence of CrpP variants. We have reported the spread of *crpP*-like genes in a large series of *P. aeruginosa* obtained from a clinical and non-clinical origin. Despite CrpP not conferring fluoroquinolones resistance per se, the emergence of other CrpP variants as well as in combination with other mechanisms may be considered and monitored. Furthermore, the location of *crpP*-like genes in mobilizable ICEs in *P. aeruginosa* is of significant concern, because genes encoding resistance to heavy metals and virulence factors are coharbored.

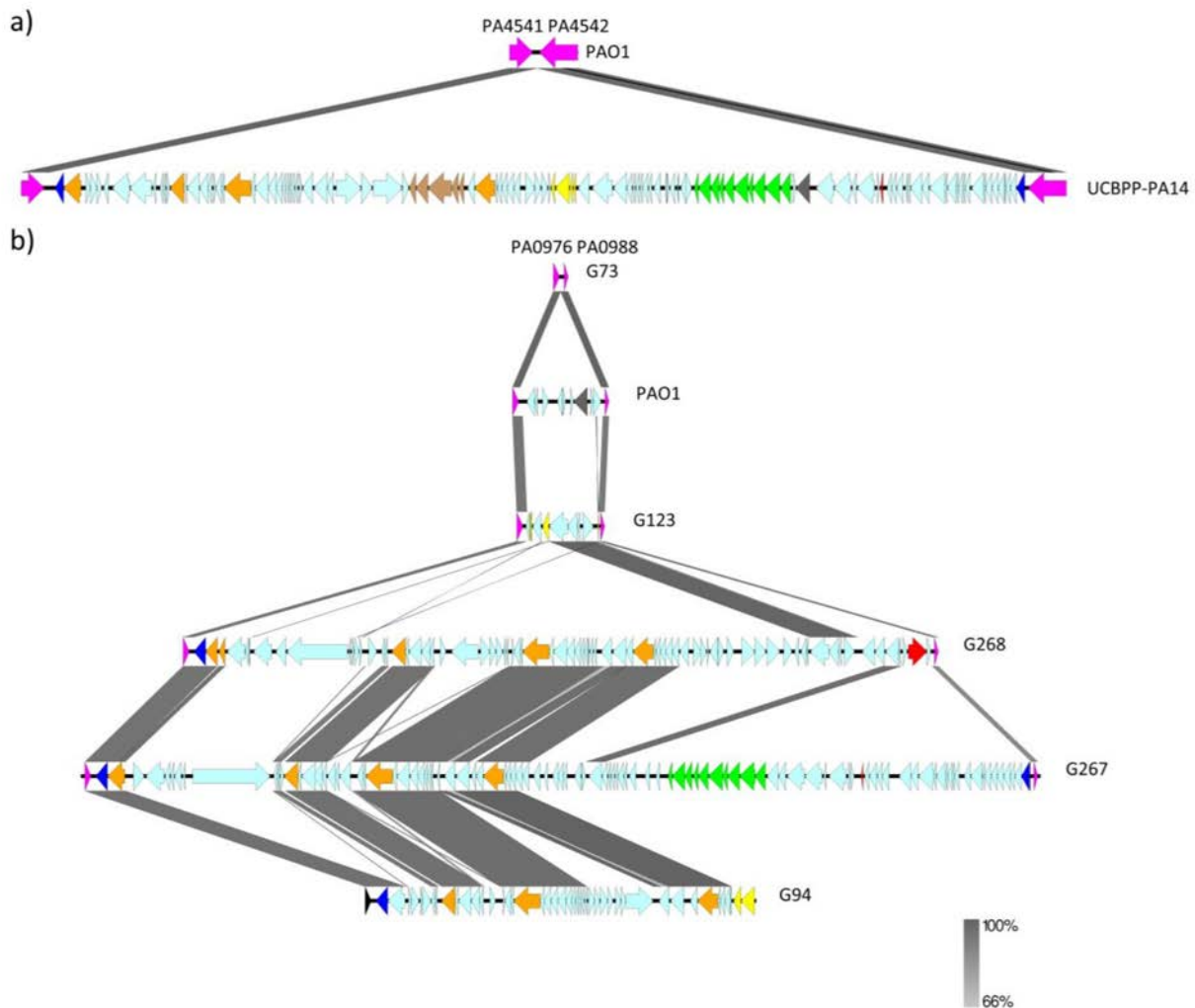


Figure 5. Mobile elements inserted after the tRNA-Lys of *P. aeruginosa* genome: (a) PA4541/PA4542 (*lexA/clpB*) empty region in PAO1 strain and *crpP*-ICE inserted in UCBPP-PA14 strain. (b) PA0976/PA0988 (*queC/CoA* hydrolase) empty region in G73 strain, *pyoS5*-ICE in PAO1 strain, PAGI-5-like in G123, *exoU*-PAGI in G268, *crpP*-ICE in G267, and an ICE removing from PA0988 to PA0998 in G94. Relevant genes are indicated by colored arrows as follows: *xerD* and *parA* genes (dark blue), mobilization genes (*virB*, *virD*, *tra* genes and *trb* operon) (orange), *pil* operon (green), fimbrial operon (brown), mobile element (*IS* and *Tn*) (yellow), pyocin gene (dark grey) and *crpP* and *exoU* genes (red).

This work provides a genetic explanation of the fluoroquinolone resistance and *crpP*-associated pathogenesis of *P. aeruginosa* recovered from clinical and healthy humans, healthy animals, environmental, and food samples. A reduction of fluoroquinolone use, a continued monitoring of evolving antibiotic resistance patterns, and novel research approaches including new antibiotics with novel modes of action, phage therapy or antisense agents, are required to minimizing the impact of fluoroquinolone resistance in *P. aeruginosa*.

Table 1. Fluoroquinolone Resistance Levels and Associated Changes Detected in the Strains included in this Study.

Number of Strains	Fluoroquinolone MIC (mg/L) ^a				Fluoroquinolone Relevant Modifications Detected in [n°Strains] ^b	CrpP Variant (n°Strains) ^c
	CIP	LEV	NOR	OF		
8	64–256 (R)	128–256 (R)	128–512 (R)	128–512 (R)	GyrA (T83I; D87N); ParC (S87W) (4) GyrA (T83I); ParC (S87W); MexZ (ΔV102-V105) (1) GyrA (T83I); ParC (S87L); MexZ (V43*/ E98fs) (2) GyrA (T83I); GyrB (I529V); ParC (S87L); MvaT (ins_ntG66); MexZ (Δnt216-225) (1)	CrpP-2 (4) CrpP-3 (1) CrpP-2 (1); None (1) CrpP-2 (1)
5	8–16 (R)	4–128 (R)	64–128 (R)	16–128 (R)	GyrA (T83I); ParC(S87L); NalD (R164*) (3) GyrA (T83I); ParC (L95Q); ParE (A473V); NalD (V151fs) (1) GyrA (T83I); ParC (S87W); ΔMexXYZ (1)	CrpP-1 (3) CrpP-1 (1) CrpP-3 (1)
7	2–4 (R)	4–16 (R)	8 (I)	8–16 (R)	GyrA (T83I); ParE (A473V/ H461D, A473V) (3) GyrA (T83I); MexB (Δnt2131-2143) (1) ParE (A473V) (2) MexX (Q85*) (1)	CrpP-1 (3) CrpP-5 (1) CrpP-1 (2) CrpP-5 (1)
1	1 (I)	16 (R)	8 (I)	16 (R)	GyrB (S466F) (1)	None (1)
1	1 (I)	1 (S)	1 (S)	1 (S)	MexT (P28fs) (1)	None (1)
2	0.5 (S)	2 (I)	4 (S)	4–8 (I-R)	GyrB (S466A) (2)	CrpP-5 (2)
35	0.06–0.5 (S)	0.125–2 (S-I)	0.125–8 (S-I)	0.25–4 (S-I)	ParE (A473V) (2) ParE (A473V); MexZ (ΔE21-G28) (2) GyrB (I529V) (6) MexF (Q178*) (2) OprM (P173fs) (1) WT (22)	CrpP-6 (2) CrpP-1 (2) CrpP-7 (3); CrpP-3 (1); None (2) CrpP-2 (2) CrpP-4 (1) CrpP-2 (2); CrpP-3 (5); CrpP-4 (1); CrpP-5 (3); None (11)

^a Breakpoints according to CLSI 2020 [13]. CIP: ciprofloxacin; LEV: levofloxacin; NOR: norfloxacin; OF, ofloxacin.

^b Amino acid changes compared to PAO1 as reference strain, except for MexT which was compared to UCBPP-PA14 reference strain. The slanted line (/) separates different patterns of modifications. Abbreviations: *, premature stop codon; fs, frameshift; ins_nt, nucleotide insertion; Δ, deletion; ^c CrpP-1 allele corresponds to the wild-type protein described in pUM505, and the remaining CrpP variants showed the following changes: CrpP-2 (G7D); CrpP-3 (K4R, G7D); CrpP-4 (G7H, I26L); CrpP-5 (G7H, F16Y, I26L); CrpP-6 (K4R, G7D, Q62K); CrpP-7 (V1M, S2L, K3L, G7H, I26L).

3. Materials and Methods

3.1. Bacterial Strains and Fluoroquinolone Susceptibility Testing

A total of 56 *P. aeruginosa* strains were selected from the *Pseudomonas* collection of the Molecular Microbiology Area (Centre for Biomedical Research in La Rioja, CIBIR, Logroño, Spain) (Table S1). These strains were obtained from clinical ($n = 28$) and non-clinical ($n = 28$) samples from Spain. *P. aeruginosa* PAO1, PA7 and PA14 reference strains were also included in the study.

Minimum inhibitory concentrations (MIC) of ciprofloxacin, levofloxacin, norfloxacin and ofloxacin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were determined by agar dilution method using *P. aeruginosa* ATCC27853 strain as control strain and interpreted according to CLSI (2020) [13]. Furthermore, to assess the role of efflux pumps, MIC of ciprofloxacin was determined in presence and absence of the inhibitor Phe-Arg- β -naphthylamide (PA β N, 40 mg/L, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Isolates were defined as efflux pump overproducers when $MIC_{\text{without PA}\beta\text{N}}/MIC_{\text{PA}\beta\text{N}}$ was > 2 , as previously described [18].

3.2. Whole Genome Sequencing (WGS)

Genomic DNA was extracted using the Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Quantity and quality were evaluated using a Qubit fluorimeter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Libraries were prepared using the TruSeq DNA PCR Free protocol (Illumina, San Diego, CA, USA). Then, the final libraries quality was assessed with Fragment Analyzer (Std. Sens. NGS Fragment Analysis kit 1-6000 bp), and quantified by qPCR at the Genomics and Bioinformatics Core Facility (CIBIR). Subsequent sequencing was carried out in an Illumina HiSeq 1500 (Illumina, San Diego, CA, USA).

FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) was used to analyze the quality of raw reads, which were subsequently trimmed and filtered by using Trim Galore (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/). Genomes were reconstructed using PLACNETw [37] or PATRIC [38]. Identification of Open Reading Frames (ORFs) and genome annotation of the assembled genetic elements was performed by PROKKA v1.13 [39].

The genomes of *P. aeruginosa* PAO1, UCBPP-PA14 and PA7 strains, and the pUM505 plasmid sequence were downloaded from the NCBI database (GenBank accession No. GCF_000006765.1, GCF_000014625.1, GCF_000017205.1 and HM560971, respectively).

3.3. Resistome

The presence of acquired fluoroquinolone resistance genes was evaluated using ResFinder v4.1 [40–42]. The *crpP* gene was confirmed using Blastn tool, and the mutations were determined by comparison with *Pseudomonas aeruginosa* pUM505 *crpP* gene (GenBank accession No. NG_062203.1) using the Clustal Omega tool [43].

The mutational resistome was determined by analyzing the mutations in 23 chromosomal genes implicated in fluoroquinolone targets and efflux pumps (Table S3) using Clustal Omega tool, and compared with *P. aeruginosa* PAO1 genes from Pseudomonas Genome Database (<https://www.pseudomonas.com>) [44].

3.4. Genetic Context of *crpP*

The genetic environment of the *crpP* gene was investigated. The *crpP*-containing ICEs were reconstructed and reannotated manually using Artemis and Mauve [45,46]. A comparative map was drawn using Blast (V2.10) and Easyfig tools [47]. The pUM505 plasmid sequence was considered as reference.

The genetic relationship in this region was analyzed in all strains by CSI Phylogeny, Mega 11 and iTOL [48–50].

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics11091271/s1>, Table S1: Characteristics of the 56 *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different origins; Table S2: Minimum inhibitory concentrations (MIC) of fluoroquinolones, CrpP variants and fluoroquinolone mutational resistome detected in the 59 analyzed *Pseudomonas aeruginosa* strains; Table S3: Dataset and function of the 23 antimicrobial resistance genes analyzed to determine the mutational resistome of the *P. aeruginosa* strains; Table S4: Mobile elements inserted in PA0976/PA0988 and PA4541/PA4542 insertion points of the 59 analyzed *Pseudomonas aeruginosa*; Table S5: Accession numbers for *Pseudomonas aeruginosa* strains in this study; Figure S1: Maximum-Likelihood phylogenetic tree generated by the alignment of the amino acidic sequences of the XerD integrases found in this study.

Author Contributions: Conceptualization, M.L., B.R.-B., G.C. and Y.S.; Data curation, M.L. and B.R.-B.; Formal analysis, M.L., B.R.-B. and Y.S.; Funding acquisition, Y.S.; Investigation, M.L., B.R.-B., G.C. and Y.S.; Methodology, M.L., B.R.-B. and G.C.; Supervision, Y.S.; Writing—original draft, M.L. and B.R.-B.; Writing—review & editing, M.L., B.R.-B., G.C. and Y.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research work was supported by the Instituto de Salud Carlos III of Spain (ISCIII) grant number [FIS project number PI20/00356] (Co-funded by European Regional Development Fund (FEDER) “A way to make Europe”). Gabriela Chichón (G.C.) had a predoctoral fellowship from the Consejería de Industria, Innovación y Empleo, Gobierno de La Rioja, Spain.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All datasets are available. The whole genome data for all 56 *P. aeruginosa* strains have been deposited at GenBank using the BioProject numbers PRJNA526213, PRJNA526344, PRJNA528628, and PRJNA796464. Supplementary Table S5 shows the accession numbers for sequences of *P. aeruginosa* strains.

Acknowledgments: Part of this study was presented at the 32nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) (Presentation number P0795, Lisbon, Portugal, 23–26 April 2022).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Lister, P.D.; Wolter, D.J.; Hanson, N.D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22*, 582–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Ruiz, J. Transferable Mechanisms of Quinolone Resistance from 1998 Onward. *Clin. Microbiol. Rev.* **2019**, *32*, e00007-19. [[CrossRef](#)]
3. Rehman, A.; Patrick, W.M.; Lamont, I.L. Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: New approaches to an old problem. *J. Med. Microbiol.* **2019**, *68*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hernández-García, M.; García-Castillo, M.; García-Fernández, S.; López-Mendoza, D.; Díaz-Regañón, J.; Romano, J.; Pássaro, L.; Paixão, L.; Cantón, R. Presence of Chromosomal *crpP*-like Genes Is Not Always Associated with Ciprofloxacin Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates Recovered in ICU Patients from Portugal and Spain. *Microorganisms* **2021**, *9*, 388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Khan, M.; Summers, S.; Rice, S.A.; Stapleton, F.; Willcox, M.D.P.; Subedi, D. Acquired fluoroquinolone resistance genes in corneal isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Genet. Evol.* **2020**, *85*, 104574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Chávez-Jacobo, V.M.; Hernández-Ramírez, K.C.; Romo-Rodríguez, P.; Pérez-Gallardo, R.V.; Campos-García, J.; Gutiérrez-Corona, J.F.; García-Merinos, J.P.; Meza-Carmen, V.; Silva-Sánchez, J.; Ramírez-Díaz, M.I. CrpP Is a Novel Ciprofloxacin-Modifying Enzyme Encoded by the *Pseudomonas aeruginosa* pUM505 Plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e02629-17. [[CrossRef](#)]
7. Chávez-Jacobo, V.M.; Hernández-Ramírez, K.C.; Silva-Sánchez, J.; Garza-Ramos, U.; Barrios-Camacho, H.; Ortiz-Alvarado, R.; Cervantes, C.; Meza-Carmen, V.; Ramírez-Díaz, M.I. Prevalence of the *crpP* gene conferring decreased ciprofloxacin susceptibility in enterobacterial clinical isolates from Mexican hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74*, 1253–1259. [[CrossRef](#)]
8. Ortiz de La Rosa, J.; Nordmann, P.; Poirel, L. Pathogenicity Genomic Island-Associated CrpP-Like Fluoroquinolone-Modifying Enzymes among *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates in Europe. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e00489-20. [[CrossRef](#)]
9. Ruiz, J. CrpP, a passenger or a hidden stowaway in the *Pseudomonas aeruginosa* genome? *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74*, 3397–3399. [[CrossRef](#)]
10. Zhu, Z.; Yang, H.; Yin, Z.; Jing, Y.; Zhao, Y.; Fu, H.; Du, H.; Zhou, D. Diversification and prevalence of the quinolone resistance *crpP* genes and the *crpP*-carrying *Tn6786*-related integrative and conjugative elements in *Pseudomonas aeruginosa*. *Virulence* **2021**, *12*, 2162–2170. [[CrossRef](#)]
11. Botelho, J.; Grosso, F.; Peixe, L. ICEs Are the Main Reservoirs of the Ciprofloxacin-Modifying *crpP* Gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Genes* **2020**, *11*, 889. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. WHO Regional Office for Europe and European Centre for Disease Prevention and Control. *Surveillance of Antimicrobial Resistance in Europe, 2020 Data. Executive Summary*; WHO Regional Office for Europe: Copenhagen, Denmark, 2021.
13. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility*, 30th ed.; CLSI Supplement M100; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2020.

14. Bruchmann, S.; Dötsch, A.; Nouri, B.; Chaberny, I.F.; Häußler, S. Quantitative contributions of target alteration and decreased drug accumulation to *Pseudomonas aeruginosa* fluoroquinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 1361–1368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Rehman, A.; Jeukens, J.; Levesque, R.C.; Lamont, I.L. Gene-Gene Interactions Dictate Ciprofloxacin Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and Facilitate Prediction of Resistance Phenotype from Genome Sequence Data. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2021**, *65*, e0269620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Van der Putten, B.C.L.; Remondini, D.; Pasquini, G.; Janes, V.A.; Matamoros, S.; Schultsz, C. Quantifying the contribution of four resistance mechanisms to ciprofloxacin MIC in *Escherichia coli*: A systematic review. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74*, 298–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Guo, L.L.; Li, L.M.; Li, Y.; Duan, X.X.; Liu, Y.J.; Gao, R.; Zhao, Y.D. Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from mink in China, 2011–2020. *Microb. Pathog.* **2022**, *162*, 105323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Palma, N.; Pons, M.J.; Gomes, C.; Mateu, J.; Riveros, M.; García, W.; Jacobs, J.; García, C.; Ochoa, T.J.; Ruiz, J. Resistance to quinolones, cephalosporins and macrolides in *Escherichia coli* causing bacteraemia in Peruvian children. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2017**, *11*, 28–33. [[CrossRef](#)]
19. Cortes-Lara, S.; Barrio-Tofiño, E.D.; López-Causapé, C.; Oliver, A.; GEMARA-SEIMC/REIPI *Pseudomonas* Study Group. Predicting *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility phenotypes from whole genome sequence resistome analysis. *Clin. Microbiol. Infect.* **2021**, *27*, 1631–1637. [[CrossRef](#)]
20. Choudhury, D.; Talukdar, A.D.; Maurya, A.P.; Choudhury, M.D.; Dhar Chanda, D.; Chakravarty, A.; Bhattacharjee, A. Contribution of efflux pumps in fluoroquinolone resistance in multi-drug resistant nosocomial isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a tertiary referral hospital in north east India. *Indian J. Med. Microbiol.* **2015**, *33*, 84–86. [[CrossRef](#)]
21. Horna, G.; López, M.; Guerra, H.; Saénz, Y.; Ruiz, J. Interplay between MexAB-OprM and MexEF-OprN in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 16463. [[CrossRef](#)]
22. Pan, Y.P.; Xu, Y.H.; Wang, Z.X.; Fang, Y.P.; Shen, J.L. Overexpression of MexAB-OprM efflux pump in carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Microbiol.* **2016**, *198*, 565–571. [[CrossRef](#)]
23. Suresh, M.; Nithya, N.; Jayasree, P.R.; Vimal, K.P.; Manish Kumar, P.R. Mutational analyses of regulatory genes, *mexR*, *nalC*, *nalD* and *mexZ* of *mexAB-oprM* and *mexXY* operons, in efflux pump hyperexpressing multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *34*, 83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. López-Causapé, C.; Cabot, G.; Del Barrio-Tofiño, E.; Oliver, A. The Versatile Mutational Resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Richardot, C.; Plésiat, P.; Fournier, D.; Monlezun, L.; Broutin, I.; Llanes, C. Carbapenem resistance in cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa* as a result of amino acid substitutions in porin OprD. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2015**, *45*, 529–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. 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**, *60*, 2302–2310. [[CrossRef](#)]
27. Xu, C.; Liu, H.; Pan, X.; Ma, Z.; Wang, D.; Zhang, X.; Zhu, G.; Bai, F.; Cheng, Z.; Wu, W.; et al. Mechanisms for Development of Ciprofloxacin Resistance in a Clinical Isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* **2021**, *11*, 598291. [[CrossRef](#)]
28. Sobel, M.L.; Hocquet, D.; Cao, L.; Plésiat, P.; Poole, K. Mutations in PA3574 (*nalD*) lead to increased MexAB-OprM expression and multidrug resistance in laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 1782–1786. [[CrossRef](#)]
29. Iino, R.; Nishino, K.; Noji, H.; Yamaguchi, A.; Matsumoto, Y. A microfluidic device for simple and rapid evaluation of multidrug efflux pump inhibitors. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 40. [[CrossRef](#)]
30. Lamers, R.P.; Cavallari, J.F.; Burrows, L.L. The Efflux Inhibitor Phenylalanine-Arginine Beta-Naphthylamide (PA β N) Permeabilizes the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e60666. [[CrossRef](#)]
31. Lomovskaya, O.; Warren, M.S.; Lee, A.; Galazzo, J.; Fronko, R.; Lee, M.; Blais, J.; Cho, D.; Chamberland, S.; Renau, T.; et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel agents for combination therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 105–116. [[CrossRef](#)]
32. Xu, Y.; Zhang, Y.; Zheng, X.; Yu, K.; Sun, Y.; Liao, W.; Jia, H.; Xu, C.; Zhou, T.; Shen, M. The prevalence and functional characteristics of CrpP-like in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from China. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2021**, *40*, 2651–2656. [[CrossRef](#)]
33. Zubyk, H.L.; Wright, G.D. CrpP is not a fluoroquinolone-inactivating enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2021**, *65*, e00773-21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Turano, H.; Gomes, F.; Barros-Carvalho, G.A.; Lopes, R.; Cerdeira, L.; Netto, L.E.S.; Gales, A.C.; Lincopan, N. Tn6350, a Novel Transposon Carrying Pyocin S8 Genes Encoding a Bacteriocin with Activity against Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *24*, e00100-17. [[CrossRef](#)]
35. Klockgether, J.; Cramer, N.; Wiehlmann, L.; Davenport, C.F.; Tümmler, B. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*, 150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Khaleedi, A.; Weimann, A.; Schniederjans, M.; Asgari, E.; Kuo, T.H.; Oliver, A.; Cabot, G.; Kola, A.; Gastmeier, P.; Hogardt, M.; et al. Predicting antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* with machine learning-enabled molecular diagnostics. *EMBO Mol. Med.* **2020**, *12*, e10264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Vielva, L.; de Toro, M.; Lanza, V.F.; de la Cruz, F. PLACNETw: A web-based tool for plasmid reconstruction from bacterial genomes. *Bioinformatics* **2017**, *33*, 3796–3798. [[CrossRef](#)]
38. Davis, J.J.; Wattam, A.R.; Aziz, R.K.; Brettin, T.; Butler, R.; Butler, R.M.; Chlenski, P.; Conrad, N.; Dickerman, A.; Dietrich, E.M.; et al. The PATRIC Bioinformatics Resource Center: Expanding data and analysis capabilities. *Nucl. Acids Res.* **2020**, *48*, D606–D612. [[CrossRef](#)]
39. Seemann, T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2068–2069. [[CrossRef](#)]
40. Bortolaia, V.; Kaas, R.F.; Ruppe, E.; Roberts, M.C.; Schwarz, S.; Cattoir, V.; Philippon, A.; Allesoe, R.L.; Rebelo, A.R.; Florensa, A.R.; et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, *75*, 3491–3500. [[CrossRef](#)]
41. Camacho, C.; Coulouris, G.; Avagyan, V.; Ma, N.; Papadopoulos, J.; Bealer, K.; Madden, T.L. BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinform.* **2009**, *10*, 421. [[CrossRef](#)]
42. Zankari, E.; Allesøe, R.; Joensen, K.G.; Cavaco, L.M.; Lund, O.; Aarestrup, F.M. PointFinder: A novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, *72*, 2764–2768. [[CrossRef](#)]
43. Madeira, F.; Park, Y.M.; Lee, J.; Buso, N.; Gur, T.; Madhusoodanan, N.; Basutkar, P.; Tivey, A.R.N.; Potter, S.C.; Finn, R.D.; et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucl. Acids Res.* **2019**, *47*, W636–W641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Winsor, G.L.; Griffiths, E.J.; Lo, R.; Dhillon, B.K.; Shay, J.A.; Brinkman, F.S. Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucl. Acids Res.* **2016**, *44*, D646–D653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Carver, T.; Harris, S.R.; Berriman, M.; Parkhill, J.; McQuillan, J.A. Artemis: An integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 464–469. [[CrossRef](#)]
46. Darling, A.E.; Mau, B.; Perna, N.T. Progressive Mauve: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e111147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Sullivan, M.J.; Petty, N.K.; Beatson, S.A. Easyfig: A genome comparison visualizer. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 1009–1010. [[CrossRef](#)]
48. Kaas, R.S.; Leekitcharoenphon, P.; Aarestrup, F.M.; Lund, O. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e104984. [[CrossRef](#)]
49. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 3022–3027. [[CrossRef](#)]
50. Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucl. Acids Res.* **2021**, *49*, W293–W296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



MotilityJ: An open-source tool for the classification and segmentation of bacteria on motility images

Ángela Casado-García^a, Gabriela Chichón^b, César Domínguez^a, Manuel García-Domínguez^a, Jónathan Heras^{a,*}, Adrián Inés^a, María López^b, Eloy Mata^a, Vico Pascual^a, Yolanda Sáenz^b

^a Department of Mathematics and Computer Science, University of La Rioja, Spain

^b Area de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Biofilm
Classification
Deep learning
Infectious diseases
Motility
Segmentation

ABSTRACT

Background and objectives: Infectious diseases produced by antimicrobial resistant microorganisms are a major threat to human, and animal health worldwide. This problem is increased by the virulence and spread of these bacteria. Surface motility has been regarded as a pathogenicity element because it is essential for many biological functions, but also for disease spreading; hence, investigations on the motility behaviour of bacteria are crucial to understand chemotaxis, biofilm formation and virulence in general. To identify a motile strain in the laboratory, the bacterial spread area is observed on media solidified with agar. Up to now, the task of measuring bacteria spread was a manual, and, therefore, tedious and time-consuming task. The aim of this work is the development of a set of tools for bacteria segmentation in motility images.

Methods: In this work, we address the problem of measuring bacteria spread on motility images by creating an automatic pipeline based on deep learning models. Such a pipeline consists of a classification model to determine whether the bacteria has spread to cover completely the Petri dish, and a segmentation model to determine the spread of those bacteria that do not fully cover the Petri dishes. In order to annotate enough images to train our deep learning models, a semi-automatic annotation procedure is presented.

Results: The classification model of our pipeline achieved a F1-score of 99.85%, and the segmentation model achieved a Dice coefficient of 95.66%. In addition, the segmentation model produces results that are indistinguishable, and in many cases preferred, from those produced manually by experts. Finally, we facilitate the dissemination of our pipeline with the development of MotilityJ, an open-source and user-friendly application for measuring bacteria spread on motility images.

Conclusions: In this work, we have developed an algorithm and trained several models for measuring bacteria spread on motility images. Thanks to this work, the analysis of motility images will be faster and more reliable. The developed tools will help to advance our understanding of the behaviour and virulence of bacteria.

1. Introduction

Historically, infectious diseases have been a major cause of mortality and, nowadays, remain as an important problem not only in human, but also in animal and plant health. The discovery of antibiotics changed medical practice by significantly decreasing the morbidity and mortality associated with bacterial infection. However, the rapid emergence, spread and persistence of antimicrobial-resistant microorganisms is a public health problem all over the globe, and possibly one of the major challenges nowadays. Furthermore, the limited therapeutic alternatives to combat them are aggravating the problem [1,2].

Compounding the burden of these infections and the extraordinary bacterial capability to develop great antimicrobial resistance is the presence of multiple virulence factors that raises the bacterial persistence and consequently the threat to human life. Among the big arsenal of bacterial virulence factors, bacterial surface motility has been regarded as a pathogenicity element because it is essential for many biological functions, such as the search for nutrients, sexual reproduction, but also for the spreading of diseases. Motility is involved in movement between body compartments, host cell adherence, colonisation, formation of biofilms, and bacterial survival and persistence [3–5]. Bacterial motility is a mechanism that allows pathogenic bacteria, such

* Corresponding author.

E-mail address: jonathan.heras@unirioja.es (J. Heras).

<https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2021.104673>

Received 26 May 2021; Received in revised form 19 July 2021; Accepted 19 July 2021

Available online 21 July 2021

0010-4825/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

***Pseudomonas aeruginosa* from river water: antimicrobial resistance, virulence and molecular typing.**

Beatriz Rojo-Bezares¹, Cristina Casado¹, Tania Ceniceros¹, María López¹, Gabriela Chichón¹, Carmen Lozano^{1a}, Lidia Ruiz-Roldán^{1b}, Yolanda Sáenz^{1*}.

¹ Área de Microbiología Molecular. Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR), Logroño, Spain.

^a Current address: Area of Biochemistry and Molecular Biology, University of La Rioja, 26006 Logroño, Spain.

^b Current address: Joint Research Unit “Infection and Public Health” FISABIO-University of Valencia, Institute for Integrative Systems Biology I2SysBio (CSIC-UV), Av. de Catalunya, 21, 46020 Valencia, Spain.

Corresponding author:

Yolanda Sáenz

Área de Microbiología Molecular,

Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR),

C/ Piqueras 98, 3^a planta, 26006, Logroño, Spain

Phone: +34 941278868

Fax: +34 941278887

e-mail: ysaenz@riojasalud.es

Abstract

P. aeruginosa isolates were recovered from surface river water samples in La Rioja region (Spain) to characterise their antibiotic resistance, molecular typing and virulence mechanisms. Fifty-two *P. aeruginosa* isolates were isolated from 15 different water samples (45.4%) and belonged to 23 different PFGE patterns. All isolates were susceptible to all antibiotics tested, except one carbapenem-resistant *P. aeruginosa* that showed a premature stop codon in OprD porin. Twenty-two sequence types (STs)(six new ones) were detected among 29 selected *P. aeruginosa* (one strain with different PFGE pattern per sample), being ST274 (14%) the most frequent one. The O:6 and O:3 were the predominant serotypes (31%). Seven virulotypes were detected, being 59% *exoS-exoY-exoT-exoA-lasA-lasB-lasI-lasR-rhlAB-rhlI-rhlR-aprA*-positive *P. aeruginosa*. It is noteworthy that the *exlA* gene was identified in three strains (10.3%), and the *exoU* gene in 7 (24.1%), *exoS* in 18 (62.1%), and both *exoS* and *exoU* genes in one strain. High motility ranges was found in these strains. Twenty-seven percent of strains produced more biofilm biomass, 90% more pyorubin, 83% more pyocyanin, and 65.5% more than twice of elastase activity compared to PAO1 strain. These results highlight the importance of rivers as temporary reservoirs and sources of *P. aeruginosa* transmission, and alert to the importance of their epidemiological surveillance in the environment.

Keywords

MLST; PFGE; *exlA*; biofilm; pigments; T3SS

1. INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous bacterium that is widespread in natural environments, survives on minimal nutritional requirements and tolerates a variety of physical conditions. These characteristics allow this species to colonize soil, vegetables, animals and a wide range of water sources, but also hospitals and community settings (Lister et al., 2009; Moradali et al., 2017; Pirnay et al., 2005). *P. aeruginosa* is an opportunistic pathogen of great clinical importance, because it is one of the most frequent and severe agents causing nosocomial infections, particularly affecting immunocompromised, chronic infected and intensive care unit patients. Along with the wide variety of infections and issues caused by *P. aeruginosa*, it can be also very difficult to treat. This organism is resistant to many antibiotics and has high capacity to express virulence factors and to form biofilm. Indeed, the World Health Organization identified *P. aeruginosa* as one of the top three priority pathogens for which new antibiotics are urgently needed (Tacconelli et al., 2018).

The success of *P. aeruginosa* to infect the host cell and evade the host immune system is due to a broad arsenal of pathogenicity factors such as the secretion of adhesins, toxins, proteases, pigments as well as biofilm production. The Type 3 Secretion System (T3SS) is the major virulence weapon of this microorganism that contributes to cytotoxicity and acute infections, injecting potent exotoxins (ExoU, ExoS, ExoY and ExoT) into cytoplasm of the host cell (Moradali et al., 2017, Pena et al., 2019). The ExoU effector is even associated with an increased risk of early clinical mortality (Foulkes et al., 2019; Hauser, 2009; Tümmler and Klockgether, 2017). On the other hand, the absence of T3SS in *P. aeruginosa* strains has also been associated with the two-partner secretion system, ExlAB (Huber, 2022; Reboud et al., 2016; Ruiz-Roldán et al., 2020). The secretion of the exolysin ExlA is responsible of the hypervirulent behaviour of some clinical strains (Elsen et al. 2014; Reboud et al., 2016). Furthermore, the production of biofilm, defined as organized bacterial communities embedded

in an extracellular polymeric matrix attached to living or abiotic surfaces, is recognized as one of the major determinants of *P. aeruginosa* to favor its occurrence and persistence at different niches.

P. aeruginosa uses the quorum-sensing systems (QS) to regulate the biofilm formation and most of the virulence factors. Three systems are well known in *P. aeruginosa*: two of LuxI/LuxR type (LasI/LasR and RhlI/RhlR) and a third one called *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) system (Lee and Zhang, 2015). These QS systems regulate the expression of elastase (LasB, LasA), alkaline protease (AprA), exotoxin A (ExoA or ToxA), autoinductor synthase (LasI), rhamnosyltransferase (RhlAB) and pyocyanine, among others (Cabrol et al., 2003; Pena et al., 2019).

Humans use river water mainly for water supply, agriculture, industry, energy production and recreational purposes. Aquatic environments are recognized as one of the reservoirs and transmission routes for the dissemination of antimicrobial-resistant and virulent pathogens, and in consequence, water-borne bacterial diseases can be acquired (Amarasiri et al 2019). High microbiological quality of rivers is required to reduce human infections. La Rioja is a region located in northern Spain with an estimated population of 323,377 inhabitants (in 2023), and the Iregua river is the main drinking water supplier (60% of the population). Thus, the present work aims to study the occurrence of *P. aeruginosa* in the Iregua river, and to analyse their antimicrobial resistance, virulence factors, and molecular typing.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Sample collection and processing. *P. aeruginosa* identification.

Thirty-three surface water samples were collected from different points along the Iregua river in La Rioja region during November 2015 (Figure 1). The Iregua river is born in Sierra Cebollera at 2,100 m, and descends in 64 km to flow into the Ebro river at 360 m. The Iregua

river basin presents a land occupation dominated by the area of forest (55% of the entire basin), scrubland (20%) and irrigated land (11%). The head zone is dominated by forest and scrub, and the low section for irrigation. The Iregua river basin has two reservoirs which supplies drinking water to 60% of La Rioja population. The temperature and pH of the river water were measured during sampling. Supplementary Table S1 shows specific data from each collected sample.

A total of 500 mL of river water were collected with sterile bottles pre-dosed with sodium thiosulfate (10 mg) (Gosselin). The samples were transported under refrigeration conditions and directly processed.

A volume of 250 mL of each sample was filtered through a 0.45 μm nitrocellulose filter that was directly deposited on the surface of cetrimide agar plates and incubated at 37 °C overnight. Then, the filter was placed and washed in a tube with 1 mL of sterile water, and after that, serial dilutions were done. Aliquots of 100 μL were seeded on cetrimide agar plates, and incubated at 37° C during 24 hours. Colonies with *Pseudomonas* morphology (up to five per sample) were selected, identified by classical biochemical methods (Triple Sugar Iron and oxidase reactions), and confirmed by PCR and subsequent sequencing of the 16S rRNA (Rojo-Bezares et al., 2014).

2.2. Antimicrobial phenotype

Antimicrobial susceptibility to antipseudomonal antibiotics (aztreonam, piperacillin-tazobactam, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, doripenem, ciprofloxacin, gentamicin, tobramycin, amikacin, and netilmicin) was studied by disc diffusion method (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2022). The metallo-beta-lactamase (MBL), extended spectrum beta-lactamase (ESBL) and class A carbapenemase phenotypes were determined by double-disc synergic test (Rojo-Bezares et al., 2014).

2.3. Characterization of the porin coding *oprD* gene

Mutations in the *oprD* gene were analysed in the carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates by PCR, sequencing and comparison with the sequence of the *P. aeruginosa* PAO1 reference strain (GenBank accession number AE004091) (Ruiz-Roldán et al., 2018).

2.4. Molecular typing

The clonal diversity of the recovered *P. aeruginosa* isolates was analysed by pulsed-field electrophoresis (PFGE) with the *SpeI* enzyme (Rojo-Bezares et al., 2014). DNA profiles were analysed by the GelJ software 2.3 (UPGMA algorithm; Dice coefficient) (Heras et al., 2015).

The multilocus sequence typing (MLST) was performed by PCR and sequencing (Ruiz-Roldán et al., 2018). The nucleotide sequences of alleles were compared with those of PubMLST database (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>) to obtain the specific sequence type (ST). New STs were submitted to the PubMLST website.

2.5. Serotyping

Serotyping was performed by slide agglutination with 16 O monovalent antisera according to the manufacturer's recommendations (BIORAD, Marnes-la-Coquette, France).

2.6. Detection of virulence factors

The presence of 14 genes involved in virulence and quorum sensing (*exoU*, *exoS*, *exoY*, *exoT*, *exoA*, *lasA*, *lasB*, *aprA*, *rhlAB*, *rhlI*, *rhlR*, *lasI*, *lasR*, and *exlA*) was analysed by PCR (Petit et al., 2013; Ruiz-Roldán et al., 2020).

2.7. Biofilm production

Crystal violet (CV) staining assay was performed to analyse total biofilm biomass, and fluorescein diacetate (FDA) assay to study the bacterial metabolic activity inside the biofilm structure. Both methods were performed in 96-well microtiter plates using an initial inoculum 10^6 CFU/mL, and measured after 24h of incubation, as previously recommended (Peeters et al.,

2008). Measures were performed using a POLARstar Omega microplate reader (BMG Labtech). All assays were performed in triplicate. The percentage of biofilm biomass and bacterial metabolic activity was calculated in comparison to the biofilm production of the reference *P. aeruginosa* PAO1 strain.

2.8. Motility

Swarming and swimming motility were studied in *P. aeruginosa* strains (Ruiz-Roldán et al., 2020), placing 4 µL of bacterial suspension (1×10^9 cells in Luria–Bertani (LB) broth) on the middle of 0.5% (swarming) and 0.3% (swimming) LB agar plates. The plates were imaged with Chemi Doc system (Bio-Rad, Temse, Belgium), and processed with Image Lab software (version 5.2.1, Bio-Rad). The entire plate area was 6,400 mm². All assays were performed in triplicate.

2.9. Pigments and elastase production

The chloroform-extract method was used for quantification of pyocyanin and pyorubin pigments, by measuring the absorbance at 520 and 525 nm, respectively (Anantharajah et al., 2017).

Elastase activity was tested by the Elastin-Congo-Red assay and the absorbance was measured at 450 nm and 600 nm as previously described (Pearson et al., 1997).

All assays were performed in triplicate. The percentage of pigments and elastase production was calculated in comparison to the production of the reference *P. aeruginosa* PAO1 strain.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Fifty-two *P. aeruginosa* isolates were isolated from 15 different water samples that were recovered along the Iregua river in La Rioja region (Figure 1). The presence of *P. aeruginosa* was detected in 45.4% of the tested samples. The temperature of the water ranged from 7.5 to 14 °C, and the pH from 7.9 to 10.8 (Table S1). There was no evidence about the presence of

wastewater outflows near to any positive sampling points. Whereas *P. aeruginosa* was consistently isolated from water samples collected more downstream along the river and at the sites with larger population. In this part of the river, water quality is expected to be influenced by run-off from agricultural land and an anthropogenic trend, even receiving waste water from both households and industry. Indeed, it should be pointed out that seven samples that harboured *P. aeruginosa* were recollected in industrial zones (47% of total samples), in accordance with other studies that obtained a high prevalence of *P. aeruginosa* in samples from environments with intense human contact (Crone et al., 2020).

These 52 isolates were susceptible to all the antibiotics tested, except *P. aeruginosa* MW131b isolated from an urban zone sample that was resistant to carbapenems (imipenem, meropenem and doripenem). No carbapenemases were found in strain MW131b, however the following amino acid changes were detected in its OprD porin: D43N, S57E, S59R, E202Q, I210A, E230K, S240T, N262T, A267S, A281G, K296Q, Q301E, R310G, V359L, Loop 7 short, and a premature stop codon at position 415. All these substitutions, with the exception of the stop codon, have been previously detected in carbapenem-resistant and susceptible *P. aeruginosa* strains recovered from different origins (Estepa et al. 2017; Rojo-Bezares et al., 2014; 2016; Ruiz-Roldán et al. 2018, 2020). Whereas the presence of a premature stop codon in OprD is associated with the loss of function of this porin and with a carbapenem resistance phenotype (Gutiérrez et al., 2007; Rodríguez-Martínez et al., 2009; Rojo-Bezares et al., 2014, 2016). Thus, the inactivating premature stop codon found in OprD would justify the carbapenem-resistance in MW131b strain.

The overall antibiotic resistance level was very low in comparison with *P. aeruginosa* isolates recovered from clinical samples (Lister et al, 2009; Peña et al., 2015; Recio et al., 2020; Rojo-Bezares et al., 2014) or waste water effluents (Okafor et al., 2023; Wu et al., 2023), but similar low antimicrobial resistance levels were detected in other studies performed with

environmental *P. aeruginosa* strains (Crone et al., 2020; Kittinger et al., 2016; Pirnay et al., 2005; Suzuki et al., 2013). Considering that carbapenems are last-resort antibiotics for treating infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria, it is concerning that we detected a carbapenem-resistant *P. aeruginosa* strain in this natural environment, suggesting that rivers could be considered a potential risk on human health.

Regarding the clonal relationship among the 52 *P. aeruginosa* isolates, 23 different PFGE patterns were observed (Figure 2). Most of the strains with indistinguishable PFGE patterns were isolated from the same sample, although there were also strains with equal PFGE pattern that were isolated from different samples (i. e. those strains with PFGE pattern P1, P6, P16, and P18) (Figure 2). Considering the strains from same sample, the highest diversity was found among the five *P. aeruginosa* strains recovered from the I33 sample (collected in the Ebro river mouth) since they showed four different PFGE patterns (P16, P18, P20 and P21), two of which (P16 and P18) were also detected in strains from I30 sample. Sampling points of the two samples I30 and I33 were located close to each other (Table S1). One strain with different PFGE pattern per sample was included in further analysis. Additionally, strains MW131b and MW133 were both included even though they showed an indistinguishable PFGE pattern, but different resistance phenotypes. Thus, a total of 29 *P. aeruginosa* strains were finally included in this study for further characterization.

The MLST was performed for the 29 selected *P. aeruginosa* and a high diversity of STs was found, detecting 22 different STs (Figure 2). Six new STs were identified and registered in the PubMLST database as: ST2540, ST2543, ST2544, ST2545, ST2547 and ST2548 (Table 1). None of the worldwide *P. aeruginosa* high-risk clones (including ST235, ST111, and ST175) were detected among our *P. aeruginosa* from river water. ST136, ST274, ST679, ST782, and ST2540 were found more than once among the studied strains, being ST274, the most prevalent, detected in four strains (14%). The ST274 has been previously described as an

intercontinental *P. aeruginosa* clone disseminated worldwide and detected in strains from clinical samples (blood cultures, urine, ulcers, wounds, sputum, stool, etc.), healthy human and raw foods (Estepa et al., 2014, 2015, 2017; López-Causapé et al., 2017; Ocampo-Sosa et al., 2015; Rojo-Bezarez et al., 2016; Ruiz-Roldan et al., 2018). In the case of ST136, it was also found in clinical strains of the ICU of a hospital in Ho Chi Minh City (Tada et al., 2013). According to the MLST database, the following STs have also been reported among clinical strains: ST116, ST217, ST455, ST483, ST773, ST782, and ST792 in sputum, ST136, ST217, and ST252 in soft tissue infections, and ST252 in bronchial lavage.

The serotyping of the 29 *P. aeruginosa* strains was performed, and the serotypes detected were O:1, O:3, O:4, O:6, O:9 and O:11, being O:6 and O:3 the predominant ones (31% of strains, respectively) followed by serotype O:1 (24%) (Table 1). In comparison with previous works in clinical *P. aeruginosa* strains (del Barrio-Tofiño et al 2019; Lu et al., 2014), the serotype O:6 was also the most frequent, followed by O:1 and O:11.

Regarding virulence profiles, the 29 strains were classified in 7 virulotypes (Table 1). The virulotype 1, characterised by amplifying *exoS*, *exoY*, *exoT*, *exoA*, *lasA*, *lasB*, *lasI*, *lasR*, *rhlAB*, *rhlI*, *rhlR* and *aprA* genes, was the most common (58.6%). This virulotype was also the most frequent in *P. aeruginosa* from blood samples, animal and human fecal samples, and foods such as raw vegetables, observed in studies of our group (Rojo-Bezarez et al., 2016; Ruiz-Roldán et al., 2018, 2021). The *exoU*, *exoS*, *exoY* and *exoT* genes were found in 27.6%, 65.5%, 79.3%, and 89.6% of the strains, respectively. *exoU* gene was detected in 7 *P. aeruginosa* strains, *exoS* in 18 strains, and both genes in one strain. This proportion of T3SS genotypes is in accordance with other Spanish studies carried out in the clinical setting (Peña et al., 2015; Recio et al., 2020).

ExoU is a potent cytotoxin with phospholipase A2 activity that has been clinically associated with early mortality, and ExoS plays an important role in the invasive capability of *P.*

aeruginosa (Hauser, 2009; Moradali et al., 2017; Peña et al., 2015). Many authors reported that *exoS* and *exoU* genes are mutually exclusive (Feltman et al., 2001; Pirnay et al., 2009), probably because enhance fitness in distinct ecological niches (Ozer et al., 2019; Rutherford et al., 2018). However, the number of reported works that described the concomitant presence of both genes is increasing (Horna et al., 2019; Morales-Espinosa et al., 2017; Ozer et al., 2019; Song et al., 2023; Yi et al., 2021). Considering that *exoU* gene is located in an island structure, it has been suggested that *exoU* could be a horizontally acquired virulence determinant, mobilized onto a transmissible plasmid (Kulasekara et al., 2006). In our work, only strain MW200 co-carried the *exoU* and *exoS* genes (3.4%), a low percentage previously observed in studies of our group (Ruiz-Roldán et al., 2018), in contrast to other studies with higher percentages of *exoS* and *exoU* co-carriers (Horna et al., 2019; Morales-Espinosa et al., 2017). The presence of both *exoS* and *exoU* genes has been associated with acute infection in humans and with hypervirulent *P. aeruginosa* clones (Horna et al., 2019; Morales-Espinosa et al., 2017; Song et al., 2023). Thus, further research is required to determine the cytotoxicity and pathogenicity of this MW200 strain isolated from a surface river water sample.

On the other hand, in three of our 29 strains (10%), all T3SS genes (*exoU*, *exoS*, *exoT*, *exoY*) were absent, but the *exlA* gene was amplified (Table 1). The ExlA toxin induces plasma membrane rupture in host cells. Furthermore, *exlA*-harboring strains have been found in non-clinical samples (such as plants, soil, wild-animal, and as in this study, river water), promoting their capacity to adapt in different environmental resources (Huber, 2022; Reboud et al. 2016, Ruiz-Roldán et al. 2020).

The *rhlI/R* and *lasI/R* genes, involved in quorum sensing regulation, were detected in all strains with the exception of one strain belonging to ST217 that not amplified the *lasR* gene. The *lasA*, *lasB*, *rhlAB* and *aprA* genes were detected in all strains. The *exoA* gene, encoding an exotoxin A which is important virulence factor of type 2 secretion system (T2SS) (Yousefi-Avarvand et

al. 2015), was found in all but two *P. aeruginosa* strains. Curiously, two *exlA*-positive strains lacked *exoA* gene and one strain has both *exlA* and *exoA* genes. Further future studies invite the analysis of the cytotoxicity of different strains with a very diverse battery of virulence genes.

Biofilm production analysis showed that 27.6% of strains produced more biofilm biomass, and 17.2% more bacterial metabolic activity than PAO1 strain (Figure 3). The swimming and swarming results revealed that *P. aeruginosa* strains from Iregua river had great motility, because 72.4% (21 strains) showed the highest swimming, and 58.6% (17 strains) the highest swarming capacity, covering the entire Petri dish surface (6,400 mm²) (Figure 4). Moreover, 65.5% of the strains produced more than twice of elastase activity compared to PAO1 strain (Figure 5). Regarding pyorubin and pyocyanin production, 90% and 83% of the strains produced, respectively, more amount than the PAO1 strain (Figure 5). This high percentage of strains with great pigment production could be because the pyocyanin is toxic to the majority of the population when cells are nutrient limited; a subset of cells is intrinsically pyocyanin resistant. The effect of pyocyanin on the producer population thus appears to be dynamic, and helping to biofilm development (Meirelles and Newman, 2018). Interestingly, the three *exlA*-harbouring strains were the major producers of biofilm biomass and pyocyanin production, but low elastase producers. Our results are in accordance to Ruiz-Roldán et al. (2020), where six *exlA*-strains showed three to four times higher biofilm biomass values and pyocyanin production than control *P. aeruginosa* PAO1 strain.

Previous reports suggested a relationship between different serotypes and the presence of the *exoU* and *exoS* virulence genes (del Barrio-Tofiño et al., 2019; Faure et al. 2003; Recio et al., 2020). Faure et al. (2003) observed that none of the strains with O:1 serotype harbored *exoU* gene, in contrast, 67% of O:1 strains were *exoU* positive in our work. On the other hand, serotype O:11 was associated with the presence of *exoU* (Recio et al., 2020), whereas in our work only the ST773 strain meets this requirement. It is noted that strains belonging to serotype

O:4 are frequently associated with high mortality rates (23.5%) (Faure et al. 2003), and additionally, as a previous Spanish nationwide study reported (del Barrio-Tofiño et al., 2019), O:4 serotype is strongly linked to the multidrug/extensively drug-resistant profile of the widespread ST175 high-risk clone. However, in our work the unique strain with serotype O:4 contained both, the *exoU* and *exoS* genes and was ascribed to the new sequence type ST2547.

4. CONCLUSION

Despite their antimicrobial susceptibility, *P. aeruginosa* strains recovered from environmental samples have great pathogenic potential, given the high presence of virulence factors, great motility, and high pigment production and elastase activity.

This study provides significant data on the great diversity and pathogenicity of *P. aeruginosa* recovered from river water. These results alert to the importance of epidemiological surveillance of this species in the environment, and its implication in the clinical setting.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Funding

This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III of Spain (ISCIII) [FIS project numbers PI16/01381, PI20/00356] (Co-funded by European Regional Development Fund (FEDER) "A way to make Europe"). Gabriela Chichón (G.C.) and Lidia Ruiz-Roldán (L.R.-R.) had a predoctoral fellowship from the Consejería de Industria, Innovación y Empleo, Gobierno de La Rioja, Spain.

Acknowledgements

Part of this study was presented at the following congresses: 29th ECCMID congress (ESCMID, Amsterdam, Netherland 13-16 April 2019), XXII SEIMC (SEIMC, Bilbao, Spain, 24-26 May 2018), Antimicrobial resistance in microbial biofilms and options for treatment Congress (ESCMID, ESGB, EPASG, Ghent, Belgium, 5-7 October 2016), XX Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. (SEM, León, Spain, 14-16 September 2016) and 25th ECCMID (ESCMID, Copenhagen, Denmark, 25-28 April 2015).

Appendix A Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version.

References

1. Amarasiri M, Sano D and Suzuki S. Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 2020;50(19):2016-59. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1692611>.
2. Anantharajah A, Buyck JM, Sundin C, Tulkens PM, Mingeot-Leclercq MP, Van Bambeke F. Salicylidene acylhydrazides and hydroxyquinolines act as inhibitors of type three secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa* by distinct mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61(6):e02566-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02566-16>.
3. Cabrol S, Olliver A, Pier GB, Andremont A, Ruimy R. Transcription of quorum-sensing system genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2003;185(24):7222-30. <https://doi.org/10.1128/jb.185.24.7222-7230.2003>

4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Thirty-Second International Supplements. M100S-S32. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2022.
5. Crone S, Vives-Flórez M, Kvich L, Saunders AM, Malone M, Nicolaisen MH, Martínez-García E, Rojas-Acosta C, Gomez-Puerto MC, Calum H, Whiteley M, Kolter R, Bjarnsholt T. The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS* 2020;128(3): 220-31. <https://doi.org/10.1111/apm.13010>.
6. del Barrio-Tofiño E, Sánchez-Diener I, Zamorano L, Cortes-Lara S, López-Causapé C, Cabot G, Bou G, Martínez-Martínez L, Oliver A; GEMARA-SEIMC/REIPI. 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): 3217-3220. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz346>.
7. Elsen S, Huber P, Bouillot S, Couté Y, Fournier P, Dubois Y, Timsit JF, Maurin M, Attrée I. A type III secretion negative clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* employs a two-partner secreted exolysin to induce hemorrhagic pneumonia. *Cell Host Microbe* 2014;15(2), 164-76. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.003>.
8. 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):15-9. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12301>
9. Estepa V, Rojo-Bezares B, Torres C, Sáenz Y. Genetic lineages and antimicrobial resistance in *Pseudomonas* spp. isolates recovered from food samples. *Foodborne Pathog Dis* 2015;12(6):486-91. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1928>.
10. 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. *Enferm Infecc Microbiol Cli.* 2017;35(3): 141-7. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.12.014>.
11. Faure K, Shimabukuro D, Ajayi T, Allmond LR, Sawa T, Wiener-Kronish JP. O-antigen serotypes and type III secretory toxins in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2003;41(5):2158-60. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.5.2158-2160.2003>
 12. Feltman H, Schulert 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(Pt 10):2659-69. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-10-2659>.
 13. Foulkes DM, McLean K, Haneef AS, Fernig, DG, Winstanley C, Berry N, Kaye SB. *Pseudomonas aeruginosa* toxin ExoU as a therapeutic target in the treatment of bacterial infections. *Microorganisms* 2019;7: 11–3. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120707>.
 14. Gutiérrez O, Juan C, Cercenado E, Navarro F, Bouza E, Coll P, Pérez JL, Oliver A. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(12): 4329-35. <https://doi.org/10.1128/AAC.00810-07>
 15. Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 2009;7(9):654-65. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2199>.
 16. Heras J, Domínguez C, Mata E, Pascual V, Lozano C, Torres C, Zarazaga M. GelJ - a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics* 2015;16:1–8. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0703-0>.
 17. 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):10874. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47303-4>.

18. Huber P. ExlA: A New Contributor to *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Front Cell Infect Microbiol* 2022;12:929150. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.929150>.
19. Kittinger C, Lipp M, Baumert R, Folli B, Koraimann G, Toplitsch D, Liebmann A, Grisold AJ, Farnleitner AH, Kirschner A, Zarfel G. Antibiotic Resistance Patterns of *Pseudomonas* spp. Isolated from the River Danube. *Front Microbiol* 2016;7:586. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00586>.
20. Kulasekara BR, Kulasekara HD, Wolfgang MC, Stevens L, Frank DW, Lory S. Acquisition and evolution of the *exoU* locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2006;188(11): 4037-50. <https://doi.org/10.1128/JB.02000-05>
21. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 2015;6(1): 26-41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>.
22. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 2009;22(4):582-610. <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>.
23. López-Causapé C, Sommer LM, Cabot G, Rubio R, Ocampo-Sosa AA, Johansen HK, Figuerola J, Cantón R, Kidd TJ, Molin S, Oliver A. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* mutational resistome in an international Cystic Fibrosis clone. *Sci Rep* 2017;7:5555. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05621-5>
24. Lu Q, Eggimann P, Luyt CE, Wolff M, Tamm M, François B, Mercier E, Garbino J, Laterre PF, Koch H, Gafner V, Rudolf MP, Mus E, Perez A, Lazar H, Chastre J, Rouby JJ. *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes. *Crit Care* 2014;18(1):R17. <https://doi.org/10.1186/cc13697>.
25. Meirelles LA, Newman DK. Both toxic and beneficial effects of pyocyanin contribute to the lifecycle of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 2018;110(6):995-1010. <https://doi.org/10.1111/mmi.14132>.

26. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front. Cell Infect Microbiol* 2017;7:39. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>.
27. Morales-Espinosa R, Delgado G, Espinosa LF, Isselo D, Méndez JL, Rodriguez C, Miranda G, Cravioto A. Fingerprint Analysis and Identification of Strains ST309 as a Potential High Risk Clone in a *Pseudomonas aeruginosa* Population Isolated from Children with Bacteremia in Mexico City. *Front Microbiol* 2017;8:313. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00313>.
28. Ocampo-Sosa AA, Fernández-Martínez M, Cabot G, Peña C, Tubau F, Oliver A, Martínez-Martínez L. Draft genome sequence of the quorum-sensing and biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa* strain Pae221, belonging to the epidemic high-risk clone sequence type 274. *Genome Announc* 2015;3(1):pii:e01343-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01343-14>.
29. Okafor JU, Nwodo UU. Antibioqram Profile and Detection of Resistance Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Recovered from Hospital Wastewater Effluent. *Antibiotics* (Basel). 2023;12(10):1517. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12101517>.
30. Ozer EA, Nnah E, Didelot X, Whitaker RJ, Hauser AR. The population structure of *Pseudomonas aeruginosa* is characterized by genetic isolation of *exoU*⁺ and *exoS*⁺ lineages. *Genome Biol Evol* 2019;11(1):1780-96. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz119>.
31. Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* 1997;179(18):5756-67. <https://doi.org/10.1128/jb.179.18.5756-5767.1997>
32. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* 2008;72(2):157-65. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.11.010>.

33. Pena RT, Blasco L, Ambroa A, González-Pedrajo B, Fernández-García L, López M, Bleriot I, Bou G, García-Contreras R, Wood TK, Tomás M. Relationship between Quorum Sensing and Secretion Systems. *Front Microbiol* 2019;10:1100. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01100>.
34. Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, Almirante B, Pomar V, Aguilar M, Granados A, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Rodríguez-López F, Tubau F, Martínez-Martínez L, Oliver A; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Infect Dis*. 2015;60(4): 539-48. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu866>.
35. Petit SM, Lavenir R, Colignon-Dupuich C, Boukerb AM, Cholley P, Bertrand X, Freney J, Doléans-Jordheim A, Nazaret S, Laurent F, Cournoyer B. Lagooning of wastewaters favors dissemination of clinically relevant *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Microbiol* 2013;164(8):856-66. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.06.007>.
36. Pirnay JP, Matthijs S, Colak H, Chablain P, Bilocq F, Van Eldere J, De Vos D, Zizi M, Triest L, Cornelis P. Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. *Environ Microbiol* 2005;7(7):969-80. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00776.x>
37. Pirnay JP, Bilocq F, Pot B, Cornelis P, Zizi M, Van Eldere J, Deschaght P, Vanechoutte M, Jennes S, Pitt T, De Vos D. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS One* 2009;4(11):e7740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007740>.
38. Reboud E, Elsen S, Bouillot S, Golovkine G, Basso P, Jeannot K, Attrée I, Huber P. Phenotype and toxicity of the recently discovered exlA-positive *Pseudomonas aeruginosa* strains collected worldwide. *Environ Microbiol* 2016;18(10):3425-39. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13262>.

39. Recio R, Mancheño M, Viedma E, Villa J, Orellana MÁ, Lora-Tamayo J, Chaves F. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and impact of antimicrobial resistance and bacterial virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(2): e01759-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01759-19>.
40. Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(11):4783-88. <https://doi.org/10.1128/AAC.00574-09>.
41. Rojo-Bezares B, Estepa V, Cebollada R, de Toro M, Somalo S, Seral C, Castillo FJ, Torres C, Sáenz Y. 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):405-14. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.01.001>.
42. Rojo-Bezares B, Cavalié L, Dubois D, Oswald E, Torres C, Sáenz Y. Characterization of carbapenem resistance mechanisms and integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains from blood samples in a French hospital. *J Med Microbiol* 2016;65(4):311-9. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000225>.
43. Ruiz-Roldán L, Bellés A, Bueno J, Azcona-Gutiérrez JM, Rojo-Bezares B, Torres C, Castillo FJ, Sáenz Y, Seral C. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish children: occurrence in faecal samples, antimicrobial resistance, virulence, and molecular typing. *Biomed Res Int* 2018;8060178. <https://doi.org/10.1155/2018/8060178>.
44. Ruiz-Roldán L, Rojo-Bezares B, de Toro M, López M, Toledano P, Lozano C, Chichón G, Alvarez-Erviti L, Torres C, Sáenz Y. Antimicrobial resistance and virulence of *Pseudomonas* spp. among healthy animals: concern about exolysin ExlA detection. *Sci Rep* 2020;10(1):11667. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68575-1>.
45. Ruiz-Roldán L, Rojo-Bezares B, Lozano C, López M, Chichón G, Torres C, Sáenz, Y. Occurrence of *Pseudomonas* spp. in Raw Vegetables: Molecular and Phenotypical

- Analysis of Their Antimicrobial Resistance and Virulence-Related Traits. *Int J Mol Sci* 2021;22(23):12626. <https://doi.org/10.3390/ijms222312626>.
46. Rutherford V, Yom K, Ozer EA, Pura O, Hughes A, Murphy KR, Cudzilo L, Mitchell D, Hauser AR. Environmental reservoirs for *exoS*⁺ and *exoU*⁺ strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol Rep* 2018;10(4):485-92. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12653>.
47. Song Y, Mu Y, Wong NK, Yue Z, Li J, Yuan M, Zhu X, Hu J, Zhang G, Wei D, Wang C, Wu W, Bai F, Feng J. Emergence of hypervirulent *Pseudomonas aeruginosa* pathotypically armed with co-expressed T3SS effectors ExoS and ExoU. *hLife* (in press). 2023. <https://doi.org/10.1016/j.hlif.2023.02.001>.
48. Suzuki Y, Kajii S, Nishiyama M, Iguchi A. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected from river water in Japan to antipseudomonal agents. *Sci Total Environ*. 2013;450-451:148-54. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.011>.
49. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outtersson K, Patel J, Cavalieri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N; WHO Pathogens Priority List Working Group. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2018;18(3):318-27. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3).
50. Tada T, Miyoshi-Akiyama T, Kato Y, Ohmagari N, Takeshita N, Hung NV, Phuong DM, Thu TA, Binh NG, Anh NQ, Nga TT, Truong PH, Xuan PT, Thu le TA, Son NT, Kirikae T. Emergence of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in hospitals in Vietnam. *BMC Infect Dis* 2013;13:251. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-251>.

51. Tümmler B, Klockgether J. Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. *F1000Res*. 2017;6:1261. <https://doi.org/10.12688/f1000research.10506.1>.
52. Wu Y, Li S, Yu K, Hu J, Chen Q, Sun W. Wastewater treatment plant effluents exert different impacts on antibiotic resistome in water and sediment of the receiving river: Metagenomic analysis and risk assessment. *J Hazard Mater*. 2023;460:132528. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132528>.
53. Yi H, Sun Q, Wang X, Liu Y, Feng N, Zhang L, Song W, Shang X, Li X, Ma X. Study on Virulence Genes of Type III Secretion System of *Pseudomonas aeruginosa* in Xinjiang Province. *Clin Lab* 2021;67(8). <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2020.200815>.
54. Yousefi-Avarvand A, Khashei R, Sedigh Ebrahim-Saraie H, Emami A, Zomorodian K, Motamedifar M. The frequency of Exotoxin A and Exoenzymes S and U genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Shiraz, Iran. *Int J Mol Cell Med* 2015;4(3):167-73.
55. *Pseudomonas aeruginosa* typing database_(22 May 2023, date last accessed)

ORIGINAL UNEDITED MANUSCRIPT

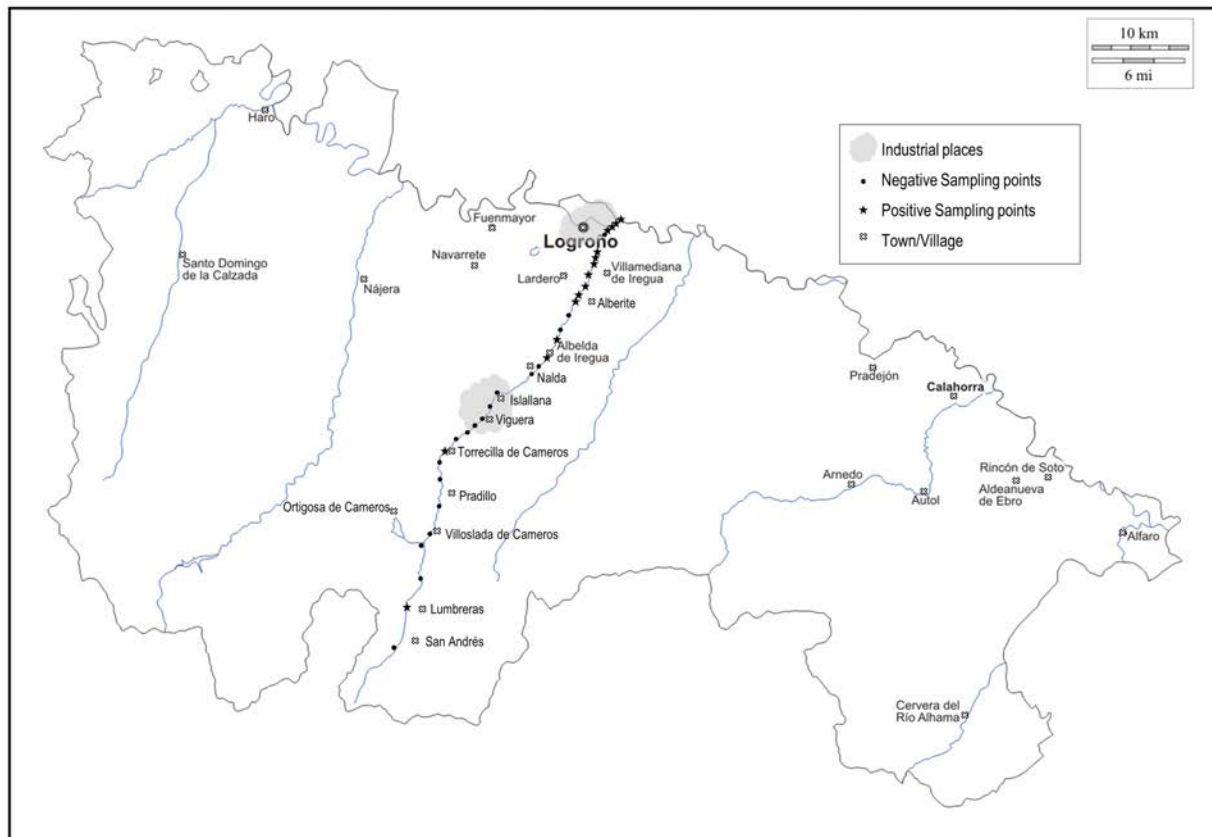


Figure 1. Location of sampling sites of the 33 surface water of Iregua river in La Rioja region. Those points where *P. aeruginosa* strains were isolated are marked with star symbols.

ORIGINAL UNEDITED

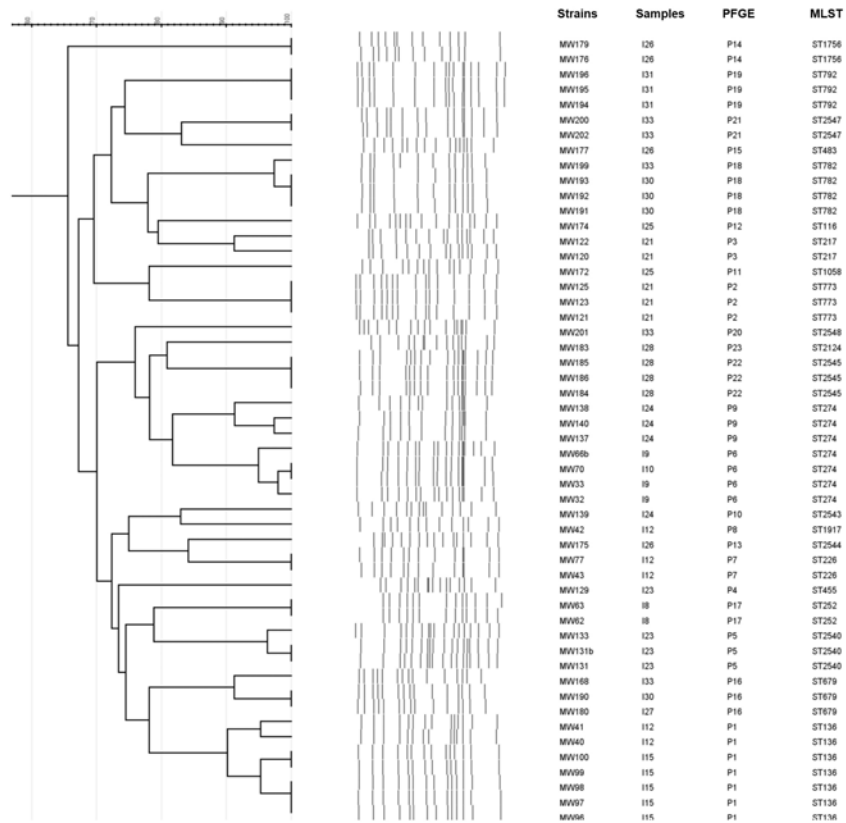


Figure 2. Dendrogram of PFGE patterns obtained from the 52 *P. aeruginosa* isolates studied. The name of strains and samples; as well as the PFGE patterns and STs were also indicated.

ORIGINAL UNEDITED

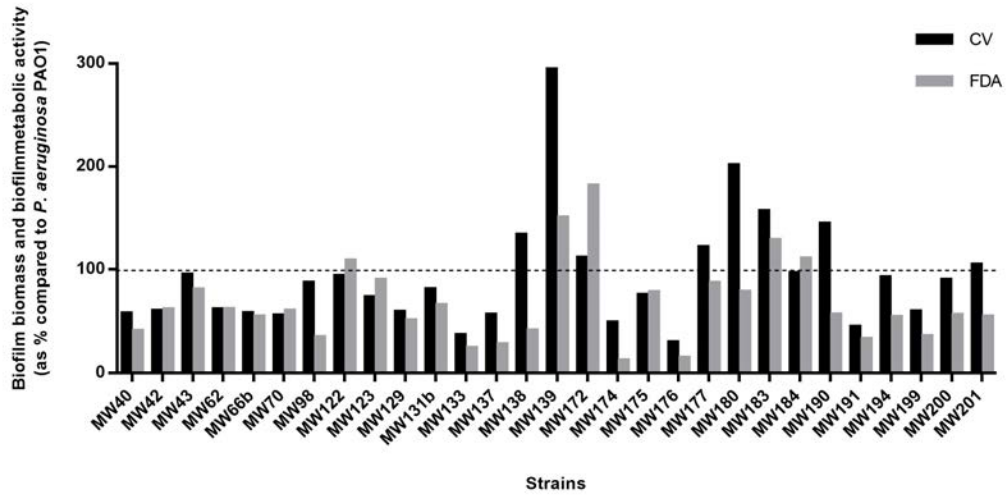


Figure 3. Percentages of production of biofilm biomass (CV) and biofilm metabolic activity (FDA) of 29 *P. aeruginosa* strains compared to reference *P. aeruginosa* PAO1 strain (black dotted line shows 100%).

ORIGINAL UNEDITED

APPT

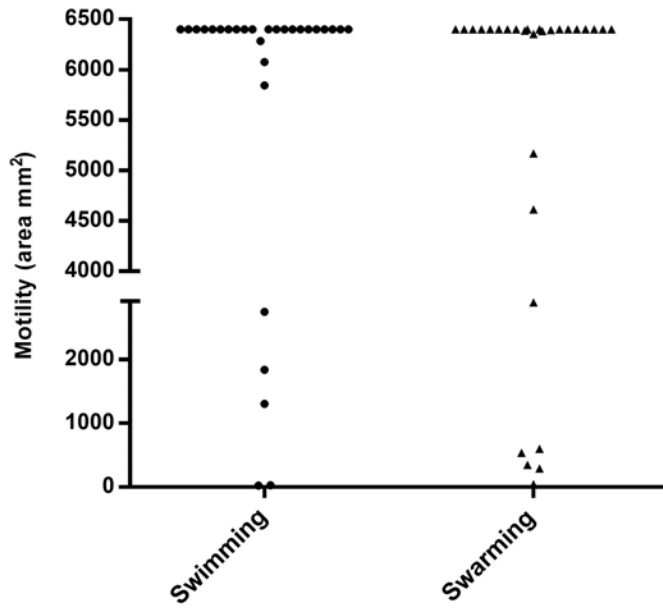


Figure 4. Values of motility area (swimming and swarming) of 29 *P. aeruginosa* strains. The entire plate area was 6,400 mm².

ORIGINAL UNEDITED

APPT

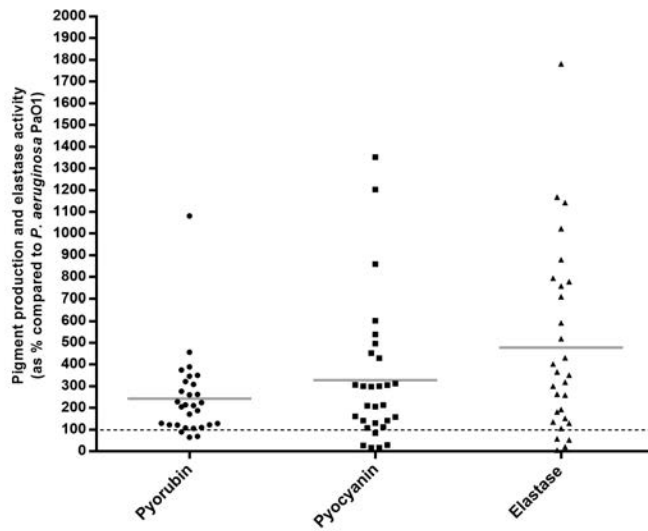


Figure 5. Percentage of pyorubin and pyocyanin production and elastase activity of the 29 *P. aeruginosa* strains compared to *P. aeruginosa* PAO1 reference strain (black dotted line shows 100%). The grey line indicates the mean value.

ORIGINAL UNEDITED

MP

Table 1. Virulence profiles, serotypes and sequence types found in 29 *P. aeruginosa* strains from Iregua River.

Virulence factors														Serotype	Sequence types
<i>exoU</i>	<i>exoS</i>	<i>exoY</i>	<i>exoT</i>	<i>exoA</i>	<i>lasA</i>	<i>lasB</i>	<i>aprA</i>	<i>rhlAB</i>	<i>rhlI</i>	<i>rhlR</i>	<i>lasI</i>	<i>lasR</i>	<i>exlA</i>	(Number of strains)	(Number of strains)
-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	O:1 (1)	ST252 (1)
														O:3 (5)	ST116 (1), ST274 (4)
														O:6 (9)	ST483 (1), ST782 (2), ST792 (1), ST1058 (1), ST1756 (1), ST2540 (2) ^a , ST2545 (1)
														O:9 (1)	ST226 (1)
														NA (1)	ST455 (1)
-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	O:3 (1)	ST217 (1)
+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	O:1 (3)	ST1917 (1), ST2543 (1), ST2544(1)
														O:11 (1)	ST773 (1)
+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	O:1 (3)	ST2124 (1), ST136 (2)
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	O:4 (1)	ST2547 (1)
-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	O:3 (1)	ST2548 (1)
-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	O:3 (2)	ST679 (2)

^a The *P. aeruginosa* MW131b strain was resistant to imipenem, meropenem and doripenem. NA, non-agglutinable.

ORIGINAL UNEDITED MANUSCRIPT