

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EVALUACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO DE ANTIMICROBIANOS EN LA
BIOPELÍCULA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE**

Pseudomonas aeruginosa

Por

Q.F.B LUIS JACOB ROMERO CHÁVEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado
de MAESTRÍA EN CIENCIAS
con Orientación en Farmacia**

Marzo 2026

EVALUACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO DE ANTIMICROBIANOS EN LA
BIOPELÍCULA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Aprobación de Tesis:

Dr. Julio Adrián Martínez Meléndez

Director de Tesis

Dra. Flora Eduarda Cruz López

Codirectora de Tesis

Dra. Elvira Garza González

Codirectora Externa

Dra. Elizabeth Orozco Beltrán

Comité Tutorial

Dr. Isaías Balderas Rentería

Comité Tutorial

Dra. Patricia González Barranco

Comité Tutorial

EVALUACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO DE ANTIMICROBIANOS EN LA
BIOPELÍCULA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Aprobación de Tesis:

Dr. Julio Adrián Martínez Meléndez

Presidente

Dr. Isaías Balderas Rentería

Secretario

Dra. Patricia González Barranco

Vocal

Dr. Javier Rivera de la Rosa

Subdirector de Estudios de Posgrado

Resumen

Luis Jacob Romero Chávez

Fecha de graduación: marzo 2026

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: EVALUACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO DE ANTIMICROBIANOS EN LA BIOPELÍCULA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa*.

Número de páginas: 169

Candidato para Grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Farmacia.

Área de estudio: Estudio de compuestos con actividad farmacológica.

Propósito y método de estudio: La resistencia antimicrobiana es un problema de salud pública a nivel mundial. Uno de los principales patógenos involucrados es *Pseudomonas aeruginosa*, un microorganismo con una extensa variedad de mecanismos de resistencia y una capacidad de adaptación y supervivencia notable. La producción de biopelícula es uno de los más preocupantes. Es por esto que la búsqueda de opciones terapéuticas para tratar infecciones asociadas a la producción de biopelícula se vuelve necesaria. Para ello se caracterizaron fenotípicamente y genómicamente aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos mediante distintas técnicas. Se identificaron por medio de PCR, se evaluó el perfil de susceptibilidad por microdilución en caldo y se buscó la producción de carbapenemasas con la prueba de Carba NP. Posteriormente, se evaluó la producción de biopelícula con el método de cristal violeta y se determinó el perfil de susceptibilidad sobre la misma. Además, se evaluaron combinaciones de antibióticos sobre las células de biopelícula utilizando el método del tablero. Por último, se realizó la secuenciación del genoma completo de los aislamientos para establecer la relación entre el fenotipo observado y el genoma.

Contribuciones y conclusiones: Se caracterizaron fenotípicamente y genómicamente 38 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. Se evaluó el efecto de nueve combinaciones de antibióticos sobre aislamientos productores de biopelícula, y se obtuvo efecto de sinergia en las combinaciones con imipenem/relebactam y ceftazidima/avibactam con cefepime. Los resultados de las combinaciones evidencian el potencial como alternativas terapéuticas frente a la biopelícula.

Dr. Julio Adrián Martínez Meléndez
Asesor

Q.F.B. Luis Jacob Romero Chávez
Candidato

EVALUACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO DE ANTIMICROBIANOS

EN LA BIOPELÍCULA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS

DE *Pseudomonas aeruginosa*

Presentado por: Q.F.B Luis Jacob Romero Chávez

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Laboratorios Especializados (CELAES) de la Facultad de Ciencias Químicas, bajo la dirección del Dr. Julio Adrián Martínez Meléndez y en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Medicina, bajo la dirección de la Dra. Elvira Garza González, ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León; así como en el Instituto de Investigación Sanitaria Islas Baleares (IdISBa), en Palma de Mallorca, España, bajo la asesoría del Dr. Antonio Oliver Palomo.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación por el apoyo proporcionado para la realización de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Químicas, al Laboratorio de Biotecnología del Centro de Laboratorios Especializados (CELAES), al Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Medicina, al Instituto de Investigación Sanitaria Islas Baleares (IdISBa) y al Hospital Universitario Son Espases en Palma de Mallorca, España por las facilidades brindadas para la realización de este proyecto.

Al Dr. Adrián Martínez, por todo el apoyo brindado desde mi etapa en la licenciatura hasta la culminación de la maestría. Agradezco profundamente su guía, su disposición para escuchar cada una de mis inquietudes y dudas, y especialmente la paciencia y dedicación con las que siempre me ayudó a resolverlas. Su acompañamiento y orientación fueron fundamentales para mi formación académica y para la realización de este trabajo.

Al Dr. Antonio Oliver, por brindarme la oportunidad de realizar mi estancia académica en su grupo de trabajo, así como por todas sus atenciones, amabilidad y disposición durante este periodo. Su apoyo y hospitalidad hicieron de esta experiencia una etapa sumamente enriquecedora tanto en lo académico como en lo personal.

A la Dra. Lucía Cantú, por ser un ejemplo a seguir tanto como persona como docente. Desde las clases de Síntesis Orgánica durante la licenciatura hasta Química Medicinal Avanzada en la maestría. Le agradezco tanto por los consejos y momentos compartidos que han dejado una marca enorme en mí.

A la Dra. Elvira González, por todas las facilidades brindadas para la realización de este proyecto, así como por sus valiosas observaciones y comentarios, los cuales contribuyeron enormemente.

A la Dra. Flora Cruz, por su apoyo, orientación y valiosos consejos a lo largo de este proceso.

A los miembros de mi Comité de Tesis: Dr. Isaías Balderas, Dra. Patricia González y Dra. Elizabeth Orozco, por sus valiosas observaciones, sugerencias y retroalimentación, las cuales contribuyeron significativamente a este proyecto.

A Biel Taltavull, por su gran apoyo durante mi estancia en Mallorca. Gracias por prácticamente ser mi “niñero” durante ese tiempo, por ayudarme a conocer la isla, por las pláticas tan amenas de camino a casa, por las caminatas con Terra y por toda la ayuda brindada en el apartado de secuenciación.

A Kellie, por su amistad constante (y sobre todo sonante por sus risas espontáneas) durante los últimos años, y también por acompañarme en los momentos difíciles.

A Juanma, por acompañarme en este tramo de nuestras vidas, así como por ayudarme a salir un poco de mi zona de confort y ser un poco menos introvertido.

A Meri, Paula, Jordi, Dani, Almudena, Miquel-Angel, Bel y Marian, por su compañía y por contribuir a que mi estancia fuera una experiencia más amena y agradable.

A Luis Núñez, por todo el apoyo brindado en el análisis bioinformático y por recibirme siempre con disposición durante mis visitas a la Facultad de Medicina.

A los niños de servicio social Vale, Ale, Nilzhe, Karla, Luis, Dani y José, por su apoyo en el laboratorio y por hacer que las mañanas y tardes de trabajo fueran mucho más amenas.

A mi tío Checo y Keren, por convertirse prácticamente en mis segundos papás en esta ciudad.

A mis padres y hermanos, quienes siempre han estado cuando los he necesitado demostrándome tanto amor.

Finalmente, quiero agradecer a Mariana, mi novia y compañera de vida durante los últimos nueve años, quien ha sido mi mayor motivación a lo largo de este camino y quien nunca se ha cansado de demostrarme su amor de una y mil maneras diferentes. Gracias por tu apoyo, tu paciencia y por estar siempre a mi lado. No existen palabras suficientes para agradecerte todo lo que has hecho por mí.

DEDICATORIA

A mis padres, Alma Chávez y Moises Romero.

Todo se los debo a ustedes.

A mi novia, Mariana Azocar.

Tu mera presencia hace mis días más llevaderos.

ÍNDICE

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	V
DEDICATORIA	VII
ÍNDICE	VIII
LISTA DE TABLAS	XII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	XIV
1 ANTECEDENTES.....	1
1.1 Resistencia antimicrobiana.....	1
1.2 Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud	3
1.2.1 Infecciones provocadas por <i>P. aeruginosa</i>	4
1.2.1.1 Infecciones agudas	4
1.2.1.2 Infecciones crónicas	6
1.3 Historia y características de <i>P. aeruginosa</i>	8
1.4 Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	10
1.4.1 Factores de adherencia	13
1.4.2 Secreción de toxinas y exoenzimas.....	14
1.4.3 Fenotipo mucoide.....	16
1.5 Hipermutación en <i>P. aeruginosa</i>	16
1.6 Heterorresistencia en <i>P. aeruginosa</i>	17
1.7 Biopelícula de <i>P. aeruginosa</i>	18
1.8 Resistencia cromosomal de <i>P. aeruginosa</i>	21
1.8.1 Cefalosporinasa cromosomal <i>AmpC</i> de <i>P. aeruginosa</i>	21
1.8.2 Baja permeabilidad de la membrana externa	22
1.8.3 Bombas de eflujo.....	23
1.8.3.1 MexAB-OprM.....	27
1.8.3.2 MexXY-OprM.....	28
1.8.3.3 MexCD-OprJ.....	29
1.8.3.4 MexEF-OprN	29
1.8.3.5 Otras bombas de eflujo.....	30

1.9	Resistencia antimicrobiana transferible	31
1.10	Resistencia producida por mutaciones	33
1.10.1	Resistencia a betalactámicos.....	35
1.10.2	Resistencia a aminoglucósidos	37
1.10.3	Resistencia a fluoroquinolonas	37
1.10.4	Resistencia a polimixinas	38
1.10.5	Resistencia a fosfomicina	38
1.11	Secuenciación del genoma completo.....	38
1.11.1	Tecnología Illumina	40
1.11.2	Análisis bioinformático	41
1.12	Clonas de alto riesgo	41
1.12.1	ST 175	42
1.12.2	ST 235	42
1.12.3	ST 111	43
1.13	Nuevos betalactámicos y combinaciones con inhibidores de betalactamasas .	43
1.13.1	Ceftolozano/Tazobactam.....	44
1.13.2	Ceftazidima/Avibactam.....	45
1.13.3	Imipenem/Cilastatina/Relebactam	46
1.13.4	Cefiderocol.....	47
1.13	Combinaciones de antimicrobianos.....	48
2	JUSTIFICACIÓN	55
3	HIPÓTESIS.....	56
4	OBJETIVOS	57
4.1	Objetivo general	57
4.2	Objetivos específicos	57
5	MATERIAL Y MÉTODOS.....	58
5.1	Obtención de aislamientos	58
5.2	Identificación de aislamientos.....	58
5.2.1	Extracción de ADN	58
5.2.2	Identificación por PCR.....	59
5.2.3	Electroforesis en gel de agarosa.....	59
5.3	Determinación del perfil de susceptibilidad.....	60

5.3.1	Betalactámicos + inhibidores de betalactamasas	62
5.3.2	Cefiderocol.....	63
5.4	Búsqueda de carbapenemasas	65
5.5	Evaluación de la producción de biopelícula	65
5.6	Determinación del perfil de susceptibilidad en biopelícula	66
5.7	Evaluación de combinaciones sobre la biopelícula.....	67
5.8	Análisis estadístico.....	69
5.9	Secuenciación del genoma completo	69
5.9.1	Extracción de ADN y comprobación de pureza.....	69
5.9.2	Preparación de librerías.....	71
5.9.2.1	Medición y ajuste de ADN bicatenario (QUBIT)	71
5.9.2.2	Fragmentación y etiquetado de ADNg.....	72
5.9.2.3	Multiplexado del ADNg etiquetado	73
5.9.3	Cuantificación, normalización y agrupación de librerías.....	74
5.9.4	Secuenciación de ADN	75
5.9.4.1	Desnaturalización de librerías y carga de muestras en Novaseq 6000 ® 75	
5.9.4.2	Evaluación de la calidad de la secuenciación	75
5.10	Análisis del resistoma de <i>P. aeruginosa</i>	75
5.10.1	Descompresión de archivos.....	75
5.10.2	Evaluación de la calidad de lecturas	75
5.10.3	Recorte de lecturas	76
5.10.4	Ensamble de genomas <i>de novo</i>	76
5.10.5	Resistoma adquirido.....	76
5.10.6	Resistoma por mutaciones	76
5.10.7	Estudio de OprD.....	77
5.10.8	Búsqueda de grandes deleciones cromosómicas.....	77
5.10.9	Tipificación de secuencias multilocus (MLST)	77
5.11	Disposición de residuos	77
6	RESULTADOS	78
6.1	Aislamientos.....	78
6.2	Perfil de susceptibilidad.....	78

6.3	Carba NP	79
6.4	Producción de biopelícula	79
6.5	Perfil de susceptibilidad en biopelícula	81
6.6	Combinaciones sobre biopelícula	82
6.7	Secuenciación del genoma completo	83
6.7.1	Tipificación de los aislamientos	83
6.7.3	Resistoma adquirido	85
6.7.4	Resistoma mutacional	86
6.7.5	Variantes de PDC	87
7	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	89
8	CONCLUSIONES	96
9	PERSPECTIVAS	97
10	BIBLIOGRAFÍA	98
	RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	142
	ANEXOS	143
	Anexo 1. Resultados de la combinación Imipenem/Relebactam— Polimixina B.	143
	Anexo 2. Resultados de la combinación Imipenem/Relebactam— Colistina.	143
	Anexo 3. Resultados de la combinación Imipenem/Relebactam— Cefepime.	143
	Anexo 4. Resultados de la combinación Ceftazidima/Avibactam— Polimixina B. ..	144
	Anexo 5. Resultados de la combinación Ceftazidima/Avibactam— Colistina.	144
	Anexo 6. Resultados de la combinación Ceftazidima/Avibactam— Cefepime.	144
	Anexo 7. Resultados de la combinación Ceftolozano/Tazobactam— Polimixina B.	145
	Anexo 8. Resultados de la combinación Ceftolozano/Tazobactam— Colistina.	145
	Anexo 9. Resultados de la combinación Ceftolozano/Tazobactam— Cefepime.	146
	Anexo 10. Calidad del ADN extraído.	146
	Anexo 11. Resultados de tipificación de secuencias multilocus (MLST).	147
	Anexo 12. Genes de resistencia a betalactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas presentes en los aislamientos.	148
	Anexo 13. Genes de resistencia a otros antimicrobianos presentes en los aislamientos.	149
	Anexo 14. Mutaciones en diferentes genes asociadas con resistencia antimicrobiana en los aislamientos.	149
	Anexo 15. Variantes de PDC en los aislamientos.	152

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>P. aeruginosa</i>	9
Tabla 2. Principales factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	11
Tabla 3. Principales bombas de eflujo de <i>P. aeruginosa</i> , el operón donde se codifican genes reguladores y sus sustratos.	25
Tabla 4 . Genes del resistoma mutacional de <i>P. aeruginosa</i> , mecanismos y antibióticos afectados.	34
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la identificación.	59
Tabla 6. Diseño de placa utilizada para evaluar el perfil de susceptibilidad.	61
Tabla 7. Punto de corte para los antibióticos utilizados.	61
Tabla 8. Diseño de placa utilizada para evaluar el perfil de susceptibilidad a betalactámicos + inhibidores de betalactamasas.	62
Tabla 9. Punto de corte para los antibióticos utilizados.	63
Tabla 10. Cepas utilizadas como parte del control de calidad.	64
Tabla 11. Criterios para la clasificación en función de la producción de biopelícula.	66
Tabla 12. Criterios para definir efecto de combinaciones.	69
Tabla 13. Parámetros de calidad para el ADN extraído.	70
Tabla 14. Programa para BLT PCR.	73
Tabla 15. Susceptibilidad global de los aislamientos.	78
Tabla 16. Producción de biopelícula de los aislamientos.	79
Tabla 17. Asociación entre productores fuertes de biopelícula y resistencia a antimicrobianos.	81
Tabla 18. Comparación entre células planctónicas y de biopelícula.	81
Tabla 19. Efectos de las combinaciones evaluadas sobre la biopelícula de los aislamientos seleccionados.	82
Tabla 20. Resultados de tipificación de secuencias multi-locus (MLST).	83
Tabla 21. Genes de resistencia a betalactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas presentes en los aislamientos.	86
Tabla 22. Genes de resistencia a otros antimicrobianos presentes en los aislamientos. ..	86
Tabla 23. Mutaciones en diferentes genes asociadas con resistencia antimicrobiana en los aislamientos.	86
Tabla 24. Variantes de PDC en los aislamientos.	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cronología que destaca los descubrimientos más importantes sobre antibióticos y la aparición de cepas resistentes.....	2
Figura 2. Sistemas de secreción en <i>P. aeruginosa</i>	15
Figura 3. Fases de formación de biopelícula.....	19
Figura 4. Principales familias de bombas de eflujo.	24
Figura 5. Principales bombas de eflujo involucradas en la resistencia a antibióticos en <i>P. aeruginosa</i>	25
Figura 6. Estructura química de Ceftolozano/Tazobactam	45
Figura 7. Estructura química de Ceftazidima/Avibactam	46
Figura 8. Estructura química de Imipenem/Relebactam	47
Figura 9. Estructura química de Cefiderocol	48
Figura 10. Árbol filogenético basado en el análisis de MLST.....	85

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AN	Amikacina
AST	Agar Soya Trypticaseína
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Aztreonam
BLI	Inhibidor de betalactamasas
BL	Betalactámico
BLEE	Betalactamasa de Espectro Extendido
CAZ	Ceftazidima
CAMHB	Caldo Müller-Hinton ajustado con cationes
CBD	Calgary Biofilm Device
CFTR	Regulador de la Conductancia Transmembranal de Fibrosis Quística
CIP	Ciprofloxacino
CL	Colistina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CRE	Carbapenem Resistant Enterobacterales
CST	Caldo Soya Trypticaseína
CT	Ceftolozano/Tazobactam
CZA	Ceftazidima/Avibactam
°C	Grados Celsius
DTR	Difficult-to-Treat Resistance
DO	Densidad Óptica
dNTP's	Desoxirribonucleótido trifosfato
DTR	Difficult to Treat Resistance
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMA	European Medicines Agency
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
ESBL	Betalactamasas de espectro extendido
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDC	Cefiderocol
FDA	Food & Drug Administration
FEP	Cefepime
FQ	Fibrosis Quística
g	Gramos
IAAS	Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud
ID-CAMHB	Caldo Müller-Hinton ajustado con cationes y depletado de hierro
IMR	Imipenem/Relebactam
INVIFAR	Red Temática de Investigación y Vigilancia de la Farmacorresistencia
IPM	Imipenem
KO	Knockout

LVX	Levofloxacino
M	Molar
MBIC	Concentración mínima inhibitoria de biopelícula
MBL	Metalobetalactamasas
MDR	Multi-Drug Resistance
MEM	Meropenem
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
nm	Nanómetro
PDR	Pan-Drug Resistance
PB	Polimixina B
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PM	Peso molecular
QS	Quorum Sensing
RT-qPCR	Quantitative Reverse Transcription PCR
SCV	Small Colony Variant
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
RAM	Resistencia Antimicrobiana
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tampón Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TOB	Tobramicina
THG	Transferencia Horizontal de Genes
TZP	Piperacilina/Tazobactam
uL	Microlitros
UFC	Unidad Formadora de Colonias
UI	Unidad Internacional
WGS	Whole Genome Sequencing
WT	Wild Type
XDR	Extensively Drug-Resistance
μ M	Micromolar
μ m	Micrómetro

1 ANTECEDENTES

1.1 Resistencia antimicrobiana

La resistencia antimicrobiana (RAM) se ha vuelto un problema de salud pública a nivel global; se prevé una cifra de 10 millones de muertes en todo el mundo para el año 2050 en caso de no ser atendida (1). La RAM se produce cuando los microorganismos no responden a los tratamientos con antimicrobianos, lo que permite que el microorganismo sobreviva dentro del huésped (2). Las consecuencias de no abordar la RAM se agravan, como en la era preantibiótica, cuando las infecciones relacionadas con el parto, cirugías y las fracturas expuestas podían ser potencialmente mortales (3).

El descubrimiento de la penicilina en 1928, por Alexander Fleming, permitió la introducción de los antibióticos en la práctica clínica como una terapia que reducía de manera significativa la mortalidad asociada a las infecciones. El desarrollo a gran escala tuvo lugar en los Estados Unidos durante la Segunda Guerra Mundial, de 1939 a 1945. Este acontecimiento constituyó uno de los mayores avances médicos del siglo XX, marcando el inicio de la “época dorada” de los antibióticos (4,5); sin embargo, el primer caso de RAM se describió poco después del descubrimiento de la penicilina cuando se informó sobre una cepa de *Escherichia coli* capaz de inactivar la penicilina mediante la producción de una penicilinasa (6). La penicilina y sus derivados (cefalosporinas y carbapenémicos) constituyen la clase más numerosa de antibióticos en uso. Desde entonces se han desarrollado alrededor de 150 nuevos antibióticos (Figura 1) y su uso generalizado y excesivo ha dado lugar al desarrollo de altos niveles de RAM, e incluso la aparición de “superbacterias” (7).

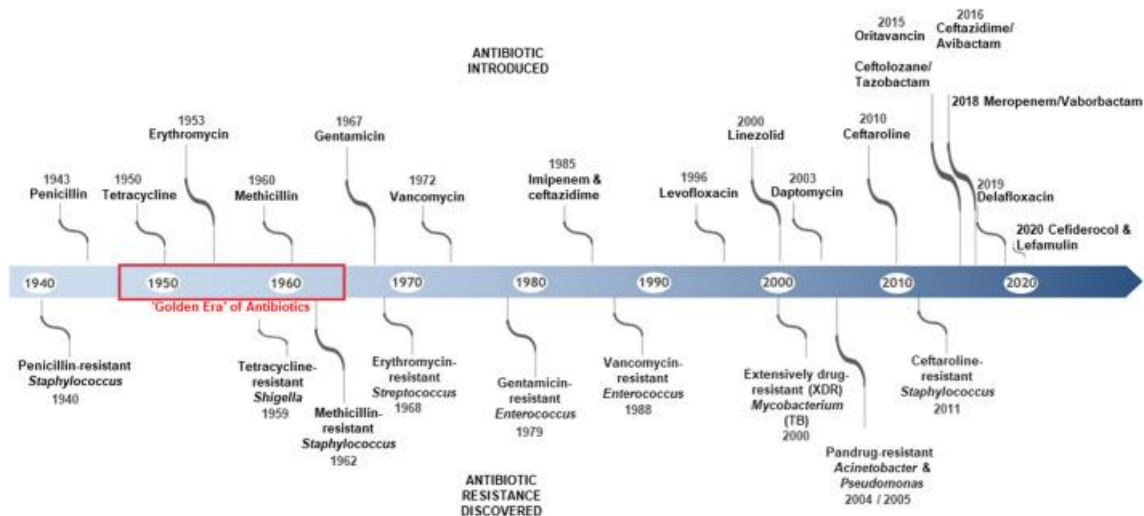


Figura 1. Cronología que destaca los descubrimientos más importantes sobre antibióticos y la aparición de cepas resistentes (3).

En relación con la situación crítica de la RAM, la OMS actualizó la lista de patógenos prioritarios en 2024. Esta se basa en diez criterios para establecer la prioridad, los cuales son: mortalidad, el problema que representan en el ámbito de la salud o comunidad, prevalencia de la resistencia, tendencia de la resistencia a 10 años, transmisibilidad, previsibilidad en la comunidad y entorno sanitario, tratabilidad y desarrollo de nuevos tratamientos. La lista está conformada por tres categorías: siendo la prioridad crítica la de mayor relevancia, seguida de alta y media. La lista de prioridad crítica incluye a *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos; Enterobacterales resistentes a carbapenémicos; Enterobacterales resistentes a cefalosporinas de tercera generación y *Mycobacterium tuberculosis* resistente a rifampicina. La prioridad alta incluye a *Salmonella enterica* serotipo Typhi resistente a fluoroquinolonas; *Shigella* spp. resistente a fluoroquinolonas; *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina; *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos; *Salmonella* no tifoidea resistente a fluoroquinolonas; *Neisseria gonorrhoeae* resistente a fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. El grupo de prioridad media incluye a estreptococos del grupo A y *Streptococcus pneumoniae* resistentes a macrólidos; *Haemophilus influenzae* resistente a ampicilina y estreptococos del grupo B resistentes a la penicilina (8).

Algunos de los microorganismos incluidos en estas listas forman parte del grupo ESKAPE, un acrónimo utilizado para referirse a *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp y *Escherichia coli* (9). En la actualidad, este grupo de patógenos son los principales agentes causales de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) en todo el mundo, y la mayoría presentan un fenotipo de multidrogorresistencia (MDR).

Entre los patógenos que conforman al grupo ESKAPE, *P. aeruginosa* es uno de los principales agentes causales de IAAS. Una de las características clave es su habilidad para desarrollar resistencia a casi todos los antibióticos disponibles mediante la selección de mutaciones cromosómicas y la adquisición de determinantes de resistencia mediante la transferencia horizontal de genes (THG). Este microorganismo es extremadamente versátil y puede crecer en diversos entornos como la piel, huesos, tejidos subcutáneos, oídos, tracto urinario, pulmones y válvulas cardíacas; pero también en el agua o los alimentos. En los hospitales *P. aeruginosa* causa infección en pacientes inmunodeprimidos o a aquellos con heridas quirúrgicas, quemaduras o que necesitan ventilación mecánica (10).

1.2 Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud

Las IAAS son infecciones adquiridas durante la atención en un hospital o centro de atención médica (11). El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) define a las IAAS como infecciones localizadas o sistémicas provocadas por un agente infeccioso que no se encontraban en incubación o latencia antes de acudir al centro de atención médica (12). Para cumplir la definición de IAAS, estas se deben presentar transcurridas 48 horas desde el ingreso al centro de atención médica y hasta 30 días después de haber recibido atención(13). Las IAAS pueden ser causadas por agentes infecciosos tanto de fuentes endógenas como la piel, tracto gastrointestinal, cavidad bucal y nariz, así como de fuentes exógenas como el propio personal del salud, dispositivos médicos o el entorno de atención médica (12). Cifras del CDC estiman que alrededor de 1.7 millones de pacientes hospitalizados adquieren una IAAS y que más de 98,000 mueren a causa de ello (14). En los países con altos ingresos 7 de cada 100 pacientes hospitalizados adquieren IAAS, mientras que esta cifra se eleva a 10 en países en vías de desarrollo (15).

El CDC establece once categorías de IAAS (12); sin embargo, las infecciones más comunes son: neumonías (27.9%), infecciones gastrointestinales (23.1%), infecciones de heridas quirúrgicas (17.5%), infecciones de torrente sanguíneo (13.2%) e infecciones del tracto urinario (9.9%)(16). Como se mencionó anteriormente, los principales patógenos que se ven involucrados en las IAAS son el grupo ESKAPE, entre los cuales destaca *P. aeruginosa* que es el agente causal del 7.1% del total de IAAS (17). Así, *P. aeruginosa* es el patógeno que causa la mayoría de las neumonías asociadas a la ventilación mecánica e infecciones por quemaduras, ambas asociadas con altas tasas de mortalidad (>30%) (10). Además, es la causa más frecuente y grave de infecciones respiratorias crónicas en pacientes con fibrosis quística (FQ) o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (18).

1.2.1 Infecciones provocadas por *P. aeruginosa*

P. aeruginosa es un patógeno Gramnegativo que se aísla con frecuencia en hospitales. A menudo se le asocia con infecciones agudas, como las infecciones del tracto urinario (ITU), neumonías, quemaduras, bacteriemias, infecciones intraabdominales, queratitis, osteomielitis, meningitis, otitis externa, foliculitis, conjuntivitis, entre otras. Sin embargo, también se ha visto que causa infecciones crónicas, especialmente en personas con patologías adyacentes, inmunocomprometidas o enfermedades respiratorias, como FQ o EPOC (19).

1.2.1.1 Infecciones agudas

Las infecciones agudas provocadas por *P. aeruginosa* se derivan de una compleja interacción entre el huésped y el patógeno, en la cual la bacteria causa daño al huésped mientras que el sistema inmune tiene dificultades para controlar al patógeno. Las principales infecciones agudas causadas por *P. aeruginosa* son:

- Infecciones del tracto urinario (ITU): a pesar de que el principal patógeno asociado a este tipo de infecciones es *Escherichia coli* en alrededor del 75-95% de los casos, otras bacterias Gramnegativas que comúnmente causan ITU son *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *P. aeruginosa*. Los pacientes que padecen de ITU provocadas por *P. aeruginosa* a menudo experimentan recurrencia después del tratamiento con antibióticos (20). La diversidad genética en la población de una

ITU puede incrementar la adaptación y supervivencia bacteriana, causando heterorresistencia (21).

- Neumonía: De todos los sitios anatómicos en los que *P. aeruginosa* puede colonizar y causar infecciones, el pulmón se asocia con las mayores tasas de mortalidad (22). Es importante destacar los tipos de neumonía en los que este patógeno puede estar involucrado:
 - Las neumonías adquiridas en la comunidad son aquellas que son adquiridas fuera de un centro de atención médica. Aunque no es común que *P. aeruginosa* sea el agente causal, en el 32 % de los casos están involucradas cepas multidrogorresistentes (MDR). Los pacientes con mayor riesgo de colonización son aquellos con enfermedades respiratorias crónicas, en especial aquellos que reciben corticosteroides(23).
 - La neumonía intrahospitalaria (NIH) se desarrolla al menos 48 horas después del ingreso. Los patógenos más comunes son bacilos gramnegativos, en particular Enterobacterales, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y Grampositivos como *Staphylococcus aureus* (24)
 - Las neumonías asociadas a la ventilación mecánica (NAV) son aquellas que se desarrollan dentro de las 48 horas posteriores a la intubación endotraqueal en pacientes que necesitan este tipo de soporte (25). Los principales agentes causales son bacilos Gramnegativos y *Staphylococcus aureus*. Los microorganismos resistentes a los antibióticos son una preocupación importante en este tipo de neumonías. Cabe destacar que la mortalidad en NAV causada por *P. aeruginosa* aumenta cuando el tratamiento empírico inicial no es el apropiado (26).
- Quemaduras: los pacientes con quemaduras tienen un alto riesgo de infecciones en la herida, NAV y sepsis debido a un sistema inmune comprometido (27). Incluso en estancias cortas, estos pacientes están expuestos constantemente a microorganismos del ambiente hospitalario como *P. aeruginosa*, el cual es el microorganismo que se aísla con mayor frecuencia en estos pacientes (28). Estos aislamientos se asocian con tasas de mortalidad de hasta el 80 % (29), y esta

mortalidad se ve mediada por una combinación entre factores de virulencia, como el lipopolisacárido y producción de elastasa o proteasa alcalina (30).

- Bacteriemia: se define como la presencia de bacterias en el torrente sanguíneo y puede ocurrir espontáneamente debido a infecciones tisulares previas, uso de catéteres o después del cuidado de heridas dentales, gastrointestinales y genitourinarias. Las complicaciones suelen causar infecciones más graves, como sepsis o choque séptico. Entre las bacterias causantes de este tipo de infección, *P. aeruginosa* representa entre el 3 y el 7 %. Las tasas de mortalidad por infecciones del torrente sanguíneo provocadas por este microorganismo se han mantenido altas a pesar de la introducción de agentes antipseudomonas. El mal uso y el retraso en la administración de la terapia antibiótica adecuada pueden aumentar la tasa de mortalidad en pacientes con bacteriemia por *P. aeruginosa* (31).

1.2.1.2 Infecciones crónicas

Las infecciones crónicas provocadas por *P. aeruginosa* se originan por una interacción dinámica entre el patógeno y el huésped, donde la bacteria se mantiene sin causar daños graves, y el sistema inmune no es capaz de eliminarla. Las dos principales patologías pulmonares en las que este patógeno se ve involucrado son:

- La FQ es la enfermedad monogénica potencialmente mortal más común en la población caucásica. Se estima que a nivel mundial hay 162,400 personas con FQ, de las cuales 105,300 están diagnosticadas (32). Esta enfermedad genética está causada por una mutación en el gen que codifica el regulador de conductancia transmembrana de la FQ (CFTR), un canal iónico que normalmente transporta cloruro y bicarbonato, dicha alteración provoca una alteración en la depuración del moco (19,33). Además de los pulmones y vías respiratorias superiores, la FQ se puede manifestar en diferentes partes del cuerpo como páncreas, hígado, intestino, riñones, sistema musculoesquelético, genitales, sistema endocrino, glándulas sudoríparas, piel, etc. (34). Desde el descubrimiento de la mutación más común, la F508A (detectada en dos tercios de los casos diagnosticados), se han descrito más de 2000 mutaciones en el gen CFTR (34). La inactivación de esta proteína deshidrata la superficie de las vías respiratorias, lo que produce secreciones

mucopurulentas espesas, alteración de la depuración mucociliar, infección crónica, inflamación y daño pulmonar estructural progresivo (35). La viscosidad de las secreciones dificulta el transporte de péptidos antimicrobianos al epitelio, lo que afecta negativamente la migración de los neutrófilos hacia los patógenos. Además, en este moco denso, predomina un ambiente microaeróbico/anaeróbico, ya que los patógenos o los neutrófilos infiltrados consumen oxígeno, lo que suprime la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de los neutrófilos y otras células, lo que dificulta la eliminación de patógenos. Se ha observado que incluso a una edad muy temprana (menos de 3 años), las personas con FQ presentan al menos un microorganismo, y este número aumenta con la edad. *S. aureus* es, con diferencia, el microorganismo más aislado entre estos pacientes. Por el contrario, en pacientes adultos, *P. aeruginosa* es el patógeno aislado con mayor frecuencia (19).

La persistencia crónica de *P. aeruginosa* en los pulmones de pacientes con FQ se caracteriza por la selección de una diversidad de genotipos y fenotipos que derivan de una única clona de *P. aeruginosa*; este proceso se denomina radiación adaptativa. Los cambios fisiopatológicos confieren una ventaja para mejorar la supervivencia de *P. aeruginosa* en aquellos nichos con inflamación persistente y bajas concentraciones de nutrientes. La presencia de esta variación está determinada por mutaciones y selección. Las mutaciones, principalmente de pérdida de función en genes como *lasR*, *mucA* y *mexT*, conducen al patrón adaptativo y variantes con susceptibilidad reducida, sobreproducción de alginato, menor virulencia y mejora a nivel metabólico. Notablemente, algunas características relacionadas con la virulencia de *P. aeruginosa* están inactivadas, pero también se presenta un aumento en la formación de biopelículas y la producción de exopolisacáridos, transportados por el operón Psl/Pel. Por lo tanto, todas estas adaptaciones y procesos evolutivos facilitan el establecimiento de esta bacteria como un patógeno crónico (36,37). El crecimiento lento también es uno de los fenómenos adaptativos que se ha vinculado a una mayor resistencia a las cefalosporinas, carbapenémicos, quinolonas y aminoglucósidos (38).

A pesar de todos estos cambios en el genotipo y fenotipo de *P. aeruginosa*, se ha estudiado que casi la mitad de los pacientes con fibrosis quística presentan infección crónica por una sola clona (39).

- La EPOC es una enfermedad pulmonar en la que *P. aeruginosa* puede establecerse de manera crónica. Se debe a una limitación del flujo de aire por inflamación producto de la inhalación de toxinas, a menudo el humo del cigarro. Los síntomas incluyen tos productiva y disnea que aumentan con los años. Los signos comunes incluyen disminución del ruido respiratorio, respiración prolongada en la fase espiratoria y sibilancias. Otras causas graves pueden incluir pérdida de peso, neumotórax, episodios frecuentes de descompensación, insuficiencia cardíaca o insuficiencia respiratoria aguda o crónica. La EPOC causó 3,23 millones de muertes en todo el mundo en 2019 y fue la tercera causa principal de muerte (40). Las exacerbaciones de la EPOC son de gran importancia debido a sus efectos perjudiciales prolongados en los pacientes, la aceleración de la progresión de la enfermedad y los elevados costes sanitarios. Estas exacerbaciones requieren hospitalización y se asocian con malos resultados clínicos, lo que representa la mayor parte de la carga económica de la enfermedad (41). Por lo tanto, las infecciones respiratorias son la causa más importante de exacerbaciones graves en pacientes con EPOC (42). Distintos microorganismos potencialmente patógenos pueden aislarse de muestras respiratorias en el 30-50% de los pacientes clínicos con EPOC (43). Entre estos microorganismos, se ha visto que *P. aeruginosa* está presente en las vías respiratorias en el 4-20% de los pacientes con exacerbación aguda de EPOC (44,45). *P. aeruginosa* se asocia con hospitalización prolongada, mayor tasa de exacerbación y mal pronóstico a largo plazo en estos pacientes (46).

1.3 Historia y características de *P. aeruginosa*

El género *Pseudomonas* fue descrito por primera vez por Walter Migula a finales del siglo 19 (47), como unidad falsa, dándole el nombre de *Pseudomonas* del griego “pseudo”, que significa falso y “monas”, que en latín significa unidad simple (48).

Previamente, *aeruginosa* había sido documentada por Schroeter en 1872, el nombre hacía referencia al color que la bacteria presentaba bajo ciertas condiciones de cultivo, un color

similar al cobre oxidado con tonalidades verde azuladas. Describió que dicha coloración se debía a un pigmento soluble en agua que posteriormente se conocería como piocianina. Schroeter proponía el nombre de *Bacterium aeruginosum*, aunque posteriormente otros investigadores observaron que el organismo responsable de la producción del pigmento era *P. aeruginosa* (49).

No fue hasta 1882, cuando el farmacéutico francés Carle Gessard estableció la especie *P. aeruginosa* por su uniformidad fenotípica. La clasificación actual se presenta en la Tabla 1(50).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *P. aeruginosa*.

Dominio	Bacteria
Reino	Pseudomonadati
Filo	Pseudomonadota
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Pseudomonadales
Familia	<i>Pseudomonadaceae</i>
Género	<i>Pseudomonas</i>
Especie	<i>aeruginosa</i>

P. aeruginosa es un bacilo Gramnegativo móvil, de aproximadamente 1-5 µm de longitud y 0.5-1 µm de ancho. Se trata de un anaerobio facultativo que crece mediante respiración aeróbica y puede hacerlo mediante respiración anaeróbica en presencia de nitrato como aceptor terminal de electrones. En el laboratorio, *P. aeruginosa* crece a 37°C, pero puede sobrevivir en un amplio rango de temperaturas, desde 4 a 42°C, siendo su habilidad para crecer a 42°C una manera de distinguirla de otras especies de *Pseudomonas* (50). La gran mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* tiene una morfología típica en placas de agar y presenta un olor a uva o a tortillas de maíz por la producción de 2-aminoacetofenona. Las colonias suelen ser lisas, con bordes irregulares, y pueden presentar distintas morfologías, como variantes mucoides o *Small Colony Variants* (SCV's), comúnmente aisladas de pacientes con fibrosis quística (FQ) (51).

Además, *P. aeruginosa* es capaz de producir diferentes pigmentos hidrosolubles que se difunden en el medio, mostrando diferentes coloraciones como piocianina (azul-verde), piorrubina (rojo-café), piomelanina (café-negro) y pioverdina (amarillo-verde fluorescente). Otra característica fenotípica importante es la β -hemólisis que presentan las colonias en placas de agar sangre, presentando algunas un aspecto metálico verdoso por la producción de pigmentos.

Este patógeno es capaz de habitar en una amplia variedad de ambientes, desde el suelo y agua hasta entornos asociados a plantas, animales y humanos. En relación con la persistencia en el ambiente, es capaz de formar biopelículas, las cuales se encuentran reguladas por procesos de *quorum sensing* (QS). Esta comunicación intercelular se basa en pequeñas moléculas señalizadoras que coordinan y regulan la expresión génica de la población bacteriana (52).

Además de la coordinación entre las células de *P. aeruginosa* y considerando que alrededor del 8% de su genoma está compuesto por genes implicados en procesos de regulación, este microorganismo posee una enorme capacidad de adaptación, supervivencia y persistencia en diversos entornos (53). Cabe destacar que en el ámbito hospitalario también puede aislarse de diversas áreas, como lavabos, desagües, inodoros, duchas y dispositivos médicos, incluyendo equipos de soporte respiratorio así como en soluciones de limpieza, antisépticos, depósitos de agua, bañeras y humidificadores (19).

En su membrana externa, el lipopolisacárido (LPS) es el componente principal y un complemento esencial para la integridad estructural de la bacteria. Un punto importante es que el LPS de *P. aeruginosa* es menos tóxico que el de otras bacterias Gramnegativas, lo que facilita el establecimiento de infecciones crónicas al causar una respuesta inflamatoria baja (54). En conjunto, todos estos factores contribuyen a la modulación de los niveles de resistencia antimicrobiana y virulencia de *P. aeruginosa*.

1.4 Factores de virulencia de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa tiene numerosos factores de virulencia que le permiten establecerse en diferentes tipos de infecciones y ha desarrollado una compleja red de genes reguladores para controlar la expresión de factores de virulencia y maximizar su supervivencia (Tabla 2).

Tabla 2. Principales factores de virulencia de *P. aeruginosa*. Adaptado de (55).

Factor de virulencia	Sistema de secreción	Diana en el huésped	Rol de patogenicidad
Alginato			Polisacárido extracelular. Sobreproducido en cepas mucoides. Participa en la formación de biopelículas.
Proteasa alcalina AprA	TISS	Proteínas del complemento	AprA es una metaloproteasa dependiente de zinc. Causa toxicidad intracelular en el huésped.
Elastasas (LasA y LasB)	TISS	Proteínas de la matriz	Ambas son metaloproteasas. LasA actúa específicamente, pero también mejora la actividad elastolítica de LasB.
ExoA	TISS	Estructura celular	Miembro de la familia de toxinas AB. En el citosol de la célula huésped, inhibe la síntesis de proteínas e induce la apoptosis.
ExoS, ExoT, ExoU y ExoY	TISS	Estructura celular	La función principal de S y T es la ribosilación. En contraste, la función principal de U e Y es causar la lisis de la célula huésped.
Flagelo		Superficie celular	Adhesión superficial importante. Provoca una fuerte respuesta inflamatoria mediada por NFκB en el huésped y proporciona movilidad bacteriana.
Cianuro de hidrógeno		Mitocondria	Sus efectos sobre las células huésped varían según el tipo celular y el estrés oxidativo, provocando apoptosis o necrosis.

Nucleótido difosfato quinasa	TISS	Macrófagos	Cataliza el intercambio de grupos fosfato entre nucleósidos difosfatos. Induce la expresión de IL-1 α/β en combinación con señales causadas por la flagelina.
Fosfolipasa C	TISS	Membranas celulares	Su producción es inducida por la privación de fosfato y puede actuar en las vías de eliminación de fosfato en infecciones por bacterias Gramnegativas en humanos.
Proteasa IV	TISS	Proteínas del complemento	Puede inactivar una amplia gama de defensas del huésped. Su producción está fuertemente inducida por el sistema de <i>quorum sensing</i> .
Piocianina		Toxicidad general	Inhibe la respiración celular del huésped, la función ciliar y el crecimiento epidérmico; altera la homeostasis del calcio e induce la apoptosis en los neutrófilos.
Pioverdina		Hierro celular	Sideróforo. Cuando el hierro libre está disponible en el entorno del huésped, la pioverdina lo secuestra. Luego, el complejo formado actúa como una molécula de señalización e interactúa con FpvA, provocando la regulación positiva de ExoA, la endoproteasa y la propia pioverdina
Ramnolípido			Surfactante. Participa en el mantenimiento de los canales que rodean las biopelículas.

Aparato de translocación TIIIS		Superficie celular	Se necesitan tres proteínas para la translocación: PopB, PopD y PerV. Todas son necesarias para la formación de poros. PopB también desempeña un papel en la patogenicidad. PerV se encuentra al final del complejo de agujas TIISS y actúa como plataforma para que PopB y PopD formen el poro.
T4P		Superficie celular	Molécula de adhesión que proporciona movilidad de contracción. El mecanismo de transducción de señales requiere su unión a la superficie sólida, retracción del pili y la señal de transducción. En consecuencia, T4P activa la producción de AMPc y la transcripción de varios genes, incluidos algunos factores de virulencia clave.

1.4.1 Factores de adherencia

El primer paso de la infección causada por *P. aeruginosa* depende de su adhesión a los tejidos del huésped. Por regla general, las superficies a las que se unen los patógenos son específicas, pero *P. aeruginosa* utiliza componentes de la superficie celular para promover esta adhesión a células o superficies inanimadas. Existen al menos tres factores de adhesión/adhesinas diferentes: el pili tipo IV, flagelo y el oligosacárido central del LPS.

- Pili de tipo IV o T4P: Es un conjunto de filamentos que están compuestos por homopolímeros de pilina, son retractiles y flexibles, mediando la adhesión a las células epiteliales del huésped (56). El T4P desempeña múltiples funciones como

la motilidad superficial, formación de microcolonias en biopelículas, adhesión, evasión del sistema inmune, transformación del ADN, señalización celular y adhesión a fagos. La alteración de esta proteína reduce la virulencia de este patógeno (57).

- Flagelo: *P. aeruginosa* posee un flagelo polar único, el cual está compuesto mayoritariamente de flagelina, aunque otras proteínas participan en su ensamblaje y función. Estos flagelos son necesarios para múltiples funciones como la adhesión a la mucina en las células epiteliales, motilidad y formación de biopelículas. Las cepas deficientes de flagelos muestran una reducción en la invasión a células epiteliales del huésped y patogenicidad (58).
- Núcleo de LPS: Está compuesto por un oligosacárido de 9 a 10 unidades y se encarga de mediar la adhesión al regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística (CFTR) de las células epiteliales. Es un factor que influye en la virulencia bacteriana y la respuesta del huésped. Además, la contribución del LPS a la patogénesis e inmunidad depende de la susceptibilidad propia del paciente, la isoforma del LPS, el componente del lípido A y la variación en la cadena lateral del antígeno-O (59).

1.4.2 Secreción de toxinas y exoenzimas

P. aeruginosa ha desarrollado cinco sistemas de secreción complejos que se encargan de transportar factores de virulencia al entorno extracelular o al citosol de las células huésped. Por una parte, los TIISS y TVISS transportan proteínas desde el citoplasma bacteriano al citosol de la célula diana. Por otro lado, los TISS, TISS y TVSS transportan proteínas del citoplasma bacteriano al medio extracelular (60). En resumen, estos sistemas de secreción son (Figura 2):

- Sistema de secreción tipo I (TISS): Está compuesto por una proteína de membrana externa y un transportador ABC. Existen dos tipos de TIISS en *P. aeruginosa*: el sistema Apr, que participa en la secreción extracelular de la proteasa alcalina AprA y los genes *Has*, ambos cruciales para la supervivencia en etapas tempranas de la infección (61).

- Sistema de secreción tipo II (TISS): Se compone de dos partes que se encargan de procesar el transporte de proteínas extracelulares. La primera es dependiente de la unión de Sec/Tat desde el citosol al periplasma, y la segunda implica un complejo que es secretado al espacio extracelular(62).
- Sistema de secreción tipo III (TIISS): Tiene cinco partes funcionales, la maquinaria de secreción, proteínas que se encargan de translocar las proteínas secretadas al huésped, proteínas reguladoras, proteínas de unión a las proteínas secretadas, llamadas chaperonas, y proteínas que se inyectan en las células del huésped, conocidas como proteínas efectoras (63).
- Sistema de secreción tipo V (TVSS): Utiliza un sistema de secreción dependiente de Sec. Las proteínas se secretan a través de la membrana externa mediante la función de translocasa de la porción C-terminal de la proteína (autotransportadores) o por alguna otra proteína auxiliar (62).
- Sistema de secreción tipo VI (TVISS): Es un complejo con forma de aguja. En *P. aeruginosa*, se han descrito tres, los genes *tse son* efectores que se dirigen a otras especies bacterianas, con el propósito de competir en el entorno (64).

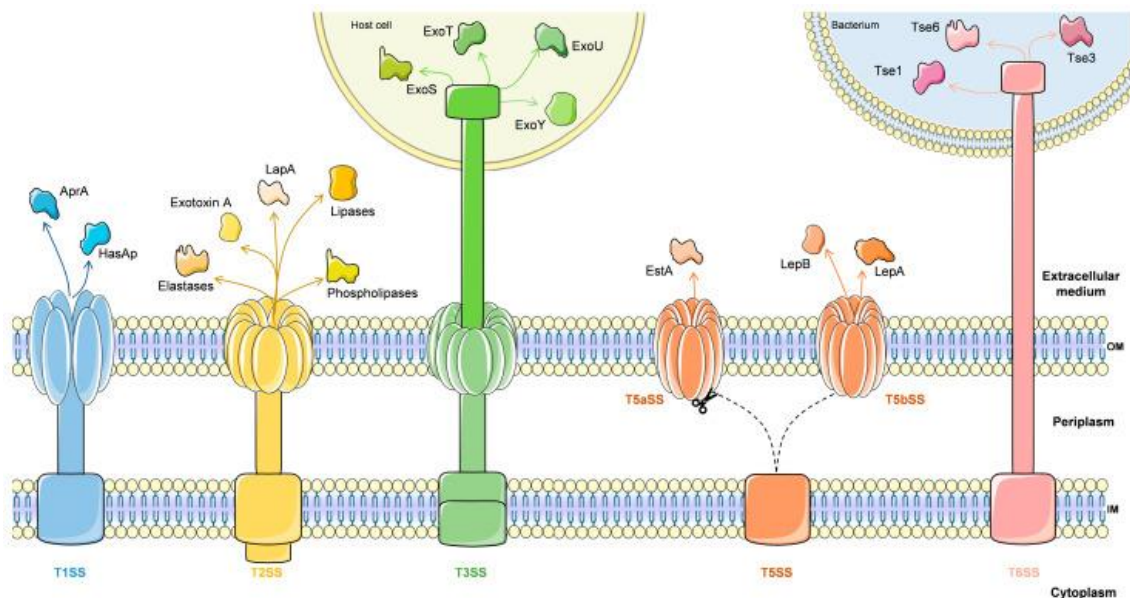


Figura 2. Sistemas de secreción en *P. aeruginosa*. Reimpreso de (60).

1.4.3 Fenotipo mucoide

El fenotipo mucoide es una de las principales características de las infecciones respiratorias crónicas asociadas a *P. aeruginosa*. Este se debe a la sobreproducción del exopolisacárido (EPS) alginato. La conversión a fenotipo mucoide se debe principalmente a una serie de mutaciones que inactivan el gen *mucA* (alrededor del 85%), el cual es un represor del factor sigma AlgU, también conocido como σ^{22} . Esta disrupción en *mucA* lleva a la expresión constitutiva de AlgU y, por lo tanto, a la biosíntesis de alginato (65,66).

El alginato es un polímero de ácido D-manurónico y ácido L-glucurónico que forma un glucocálix que encapsula a las bacterias, protegiéndolas de ambientes adversos como la desecación, agentes oxidantes y el sistema inmune del huésped (67). En consecuencia, el fenotipo mucoide es más virulento y se asocia con infecciones crónicas, aumento de la inflamación y suele ser un indicador de mal pronóstico, ya que presenta altas tasas de mortalidad en pacientes con FQ (19).

Por lo tanto, σ^{22} regula directa e indirectamente numerosos genes de respuesta al estrés que están asociados a la virulencia de *P. aeruginosa*, lo que sugiere que las mutaciones en *mucA* van más allá de la conversión al fenotipo mucoide. El caso más común en etapas tardías de infecciones es la coexistencia de variantes mucoides y no mucoides, con diferente distribución, lo que refleja la ventaja de la diversificación para la persistencia (68).

1.5 Hipermutación en *P. aeruginosa*

En el contexto de infecciones respiratorias crónicas, la radiación adaptativa representa una huella dactilar para los aislamientos de *P. aeruginosa*, ya que contribuye a la persistencia del patógeno en los pulmones de pacientes con fibrosis quística. Gracias a sofisticadas redes de regulación transcripcional, una única clona de *P. aeruginosa* es capaz de ocupar nichos específicos mediante la divergencia de distintos sublinajes especializados (53). Estas comunidades difieren a nivel genómico y fenotípico, pero pueden coexistir, creando así poblaciones heterogéneas (69,70). La divergencia de *P. aeruginosa* en las vías respiratoria de FQ pueden deberse a una disminución a nivel nutricional y a los altos niveles de mucina, pero esta diversificación se ve potenciada por la presión del sistema inmune del huésped así como la presencia de otros microorganismos

(71). Este proceso, el cual está impulsado por la hipermutación, contribuye a la diversidad genética de las poblaciones de *P. aeruginosa*, lo que conduce a la diversidad fenotípica y a la evolución (72). La hipermutación afectando a nivel genotípico y fenotípico se ha observado ampliamente en alisamientos clínicos (69).

El riesgo de hipermutación aumenta en pacientes con infecciones crónicas, lo que resulta en una inflamación pulmonar persistente y una respuesta inmunitaria con liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden causar daño al ADN y mutación en bacterias (73).

1.6 Heterorresistencia en *P. aeruginosa*

Aparte de los mecanismos y fenotipos convencionales de resistencia a antibióticos, *P. aeruginosa* ha desarrollado una forma especial de resistencia a fármacos conocida como heterorresistencia. Este fenómeno es un fenotipo en el que una cepa aparentemente isogénica alberga una o varias subpoblaciones que presentan mayores niveles de resistencia a los antibióticos en comparación con la población principal (74). Esta subpoblación resistente predomina en presencia de un antibiótico determinado, pero puede volver a su estado basal tras la retirada de este, lo que indica que la heterorresistencia es un fenotipo inestable (75). En la práctica clínica, la heterorresistencia no puede observarse fácilmente y su relevancia sigue siendo incierta. Notablemente, los resultados clínicos de las infecciones producidas por *P. aeruginosa* que pudieran estar relacionadas con heterorresistencia, son generalmente más severos que los de otras bacterias Gramnegativas (76).

La heterorresistencia debe distinguirse de otras formas de resistencia mediada por subpoblaciones, como las células persistentes. Las células persistentes también se deben a que una pequeña proporción de la subpoblación isogénica presenta una mayor resistencia a los antibióticos (77). En presencia de antibióticos, las células persistentes permanecen temporalmente inactivas o crecen lentamente, mientras que la subpoblación con heterorresistencia puede crecer rápidamente y convertirse en la población dominante (78).

Otro factor a considerar al definir la heterorresistencia es su estabilidad, ya que puede serlo si las mutaciones que confieren resistencia son genéticamente estables, como los polimorfismos de secuencia de nucleótidos (SNP), los desplazamientos del marco de

lectura, las inserciones y las deleciones; y el fenotipo resistente no revierte rápidamente al fenotipo susceptible en ausencia de presión selectiva de antibióticos; o bien puede ser inestable, cuando un clon resistente aislado de la subpoblación resistente genera una población mixta de células susceptibles y resistentes cuando se cultiva en ausencia de antibióticos debido a la reversibilidad del fenotipo de resistencia. Esta inestabilidad puede ser causada por mutaciones (SNP, inserciones y deleciones) que son genéticamente estables pero conllevan un alto costo energético (79).

P. aeruginosa es heterorresistente a los agentes más comúnmente utilizados, incluyendo cefalosporinas, penicilinas combinadas con inhibidores de betalactamasas, carbapenémicos, polimixinas y fosfomicina (76). Algunos de los mecanismos que se han vinculado a la heterorresistencia de *P. aeruginosa* a las cefalosporinas incluyen la hiperproducción de AmpC (80). Por otro lado, la heterorresistencia a carbapenémicos se debe a la reducción en la expresión de OprD y la sobreexpresión de bombas de eflujo (81). La heterorresistencia a polimixinas se debe a la alteración de varios sistemas de dos componentes, como PmrAB, PhoPQ, ParRS y CprRS (82).

1.7 Biopelícula de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa puede cambiar su forma de crecimiento, entre células individuales o planctónicas y células que forman biopelículas, una transición que se encuentra ampliamente estudiada y es una característica clave en las infecciones crónicas. Este fenómeno demuestra la capacidad de *P. aeruginosa* para fortalecer su supervivencia y persistencia en entornos adversos al formar comunidades. La biopelícula puede ser definida como agregados bacterianos que se encuentran rodeados de una matriz polimérica extracelular que les confiere resistencia en entornos hostiles. Implica cuatro fases principales: adhesión inicial, formación de microcolonias, maduración de la biopelícula y dispersión (Figura 3)(83).

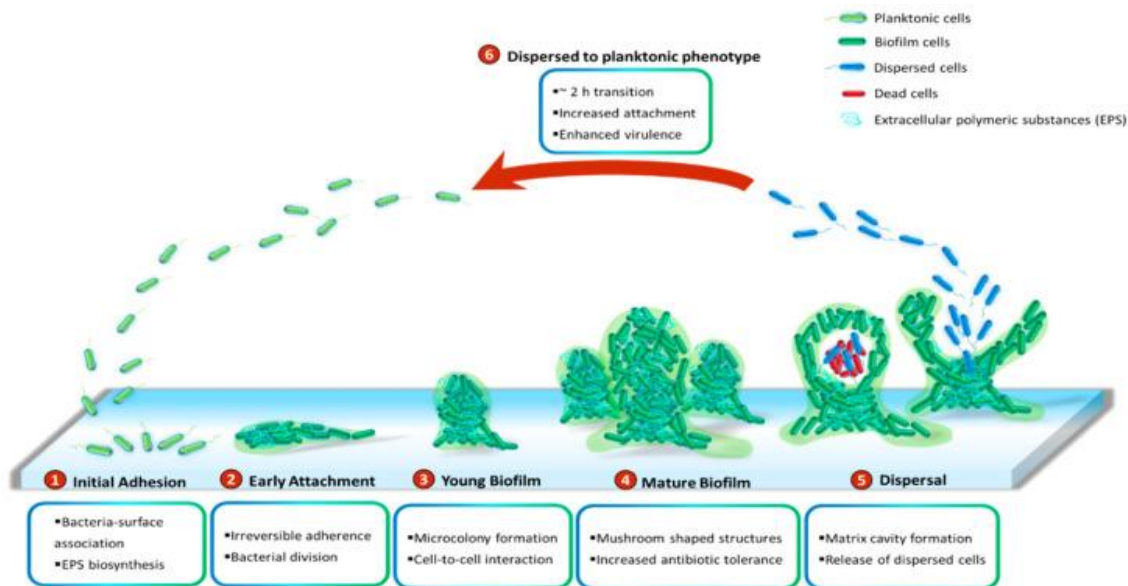


Figura 3. Fases de formación de biopelícula. Reimpreso de (84).

Una de las características más preocupantes de las biopelículas es su tolerancia intrínseca a antibióticos, provocando una persistencia en infecciones crónicas a pesar del tratamiento. Se ha visto que las células de biopelícula pueden tolerar concentraciones de antibióticos hasta 1000 veces mayores en comparación a las células en estado planctónico (85).

La resistencia de las células en biopelícula depende de varios factores:

- El primer factor, y el más evidente, es la limitada penetración de los antibióticos como resultado de la matriz extracelular. Las células dentro de la biopelícula son más resistentes a los antibióticos y a las defensas inmunitarias del huésped en comparación con las células planctónicas, tanto *in vivo* como *in vitro* (86). Las interacciones con los componentes de la matriz, como el ADN extracelular aniónico y el alginato, pueden capturar antibióticos con carga positiva, como la colistina o la tobramicina, y, en consecuencia, reducir su actividad (87). Por otro lado, antibióticos, como el ciprofloxacino, penetran las biopelículas con mayor facilidad (88).
- La existencia de gradientes tanto de nutrientes como de oxígeno da lugar a diferentes microambientes, generando dos subpoblaciones principales: una metabólicamente activa, más frecuente en las zonas externas, y una menos activa,

o células persistentes, en las capas más profundas (89). En consecuencia, la falta de oxígeno desempeña un papel importante en la tolerancia de algunos antibióticos que funcionan en condiciones aeróbicas, como los betalactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y las tetraciclinas (90), pero que solo son activos en la periferia de la biopelícula como el aztreonam (91). Algunos antibióticos como la colistina, entre otros compuestos que actúan sobre la membrana, mantienen su actividad a pesar de la falta de oxígeno, pudiendo penetrar y alcanzar las capas más profundas de las biopelículas (92,93).

- En biopelículas que se encuentran bajo tratamiento, la limitada penetración de los antibióticos por la matriz da lugar a que diferentes áreas experimenten bajas concentraciones. Esto, sumado a la limitación de nutrientes, puede ser propenso a respuestas de estrés y conducir a mutaciones que generen resistencia (94). Por lo tanto, la heterogeneidad en la disponibilidad de nutrientes y oxígeno permite nichos ecológicos que aseguran la existencia de diferentes subpoblaciones, facilitando la aparición de mutaciones que sean beneficiosas para el microorganismo (95). Una característica relevante de las biopelículas de *P. aeruginosa*, particularmente en pacientes con FQ, es una alta prevalencia de cepas hipermutables, y que estos mutantes se asocian comúnmente con altas tasas de resistencia a los antibióticos (96).
- La transferencia horizontal de genes (THG) por conjugación, transformación o transducción es una causa importante de variación genética y una fuente de resistencia a los antimicrobianos. La conjugación en biopelículas ocurre con más frecuencia en comparación con las células planctónicas. Por lo que las biopelículas actúan como reservas, ya que mantienen plásmidos que otorgan resistencia a antibióticos (97,98). La estructura de la biopelícula y la elevada densidad bacteriana facilitan el encuentro de las células donantes y receptoras, así como la conjugación entre ellas. Además, la presencia de ADN extracelular en la matriz desencadena un estado natural de competencia que promueve la estabilización de la biopelícula y la adquisición de genes de resistencia (99).

1.8 Resistencia cromosomal de *P. aeruginosa*

Las cepas *Wild Type* (WT) de *P. aeruginosa* tienen un perfil de susceptibilidad disminuido a una amplia variedad de clases de antibióticos, como betalactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Presentan resistencia natural a muchos betalactámicos, como bencilpenicilina y oxacilina, aminopenicilinas (incluidas aquellas con inhibidores de betalactamasas), cefalosporinas de primera y segunda generación (como cefoxitina y cefuroxima), algunas cefalosporinas de tercera generación (como cefotaxima) y el carbapenémico ertapenem. Asimismo, presenta resistencia intrínseca al aminoglucósido kanamicina y baja susceptibilidad a las fluoroquinolonas (100).

1.8.1 Cefalosporinasa cromosomal *AmpC* de *P. aeruginosa*

AmpC es una cefalosporinasa cromosómica presente en bacterias Gramnegativas (101). Según la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros, *AmpC* es una serin betalactamasa perteneciente al grupo I. Por otro lado, según la clasificación estructural de Ambler, pertenece a la clase C de betalactamasas (102,103). Se ha reportado en otras bacterias como *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morgannii*; sin embargo, también juega un papel crucial en la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* (104,105). La inducción de *AmpC* desempeña un papel importante en la reducción de la susceptibilidad de *P. aeruginosa* a imipenem, ya que la relativa estabilidad de esta molécula a la hidrólisis por esta cefalosporinasa se ve, en cierta medida, comprometida por su alta potencia como inductor (106).

En *P. aeruginosa*, la sobreexpresión de la betalactamasa cromosómica de clase C, conocida como *AmpC* o cefalosporinasa derivada de *Pseudomonas* (PDC) es el mecanismo de resistencia adquirida más relevante frente a los betalactámicos, ya que actúa frente a penicilinas clásicas (como piperacilina) y cefalosporinas (como ceftazidima o cefepima), y está estrechamente vinculada a múltiples genes implicados en el reciclaje de la pared celular (107).

Uno de los elementos clave en este proceso es DacB/PBP4, una proteína fijadora de penicilina (PBP) de bajo peso molecular que suele encontrarse inactiva en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a betalactámicos. La pérdida de función de esta enzima representa el principal mecanismo de resistencia mutacional, ya que favorece la

sobreproducción de AmpC mediada por AmpR. Esto ocurre debido a la saturación de AmpD y la acumulación de muropéptidos activadores, lo que conduce a niveles de producción de AmpC hasta 100 veces superiores a los observados en cepas WT, generando así una elevada resistencia a los betalactámicos (108,109). En este contexto, el papel de AmpR resulta crucial. Su inactivación, ya sea por desplazamientos del marco de lectura, codones de terminación prematuros o mutaciones puntuales como G102E, producen problemas en la regulación de AmpC y con ello una reducción en la producción basal (110). Por el contrario, ciertas mutaciones pueden activar AmpR, como D135N (111) o G154R, esta última es característica de aislamientos pertenecientes a la clona ST175, considerada de alto riesgo y ampliamente distribuida (112).

Por otro lado, la resistencia se asocia no solo a su sobreproducción, sino también a modificaciones estructurales de la propia enzima. Hasta la fecha, se han descrito más de 350 variantes alélicas de PDC, lo que refleja que es una enzima altamente polimórfica con una notable tolerancia a cambios genómicos (113). Recientemente se ha evidenciado que la resistencia clínica a nuevos betalactámicos se debe, principalmente, a mutaciones en sitios de unión conservados de la PDC los cuales generan reordenamientos conformacionales y aumentan la eficiencia catalítica de la enzima (114).

1.8.2 Baja permeabilidad de la membrana externa

P. aeruginosa se caracteriza por una baja permeabilidad en su membrana externa, lo que contribuye en cierta medida a la resistencia intrínseca e inducida a los antibióticos (115). La membrana externa de *P. aeruginosa* tiene numerosas proteínas, incluyendo lipoproteínas y porinas (116). Los nutrientes entran en *P. aeruginosa* a través de la membrana externa mediante las proteínas de barril- β , lo que produce canales de difusión. Estos canales se denominan porinas debido a su forma y función (117). Las porinas se pliegan en la membrana externa en forma de barriles compuestos de láminas β antiparalelas, en las que los aminoácidos hidrofóbicos y los residuos hidrofílicos se enfrentan entre sí dentro del barril, generando un recubrimiento interno que estrecha el canal (118). Se han predicho más de 163 proteínas de membrana externa en *P. aeruginosa*, de las cuales 64 pertenecen a tres familias de porinas: la específica de OprD, la dependiente de TonB y la de eflujo/secreción de OprM (119).

Asimismo, las porinas desempeñan un papel fundamental en el transporte de azúcares, aminoácidos, fosfatos, cationes divalentes y sideróforos (119), además de estar implicadas en el transporte de ciertos antibióticos hidrofílicos, como betalactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas y algunas fluoroquinolonas (120,121). Por lo tanto, estas proteínas contribuyen a la resistencia antimicrobiana intrínseca de *P. aeruginosa* al regularse su expresión. La proteína de membrana externa OprF, la cual es la más abundante en *P. aeruginosa*, es capaz de formar canales aunque tiene una baja eficiencia de permeabilidad. Esto se debe a dos conformaciones distintas: una estructura monomérica altamente abundante que forma canales cerrados con una estructura de barril transmembranal de 8 hebras; y una forma oligomérica menos común que comprende un canal abierto con una estructura de barril similar a los porinas de difusión general (122). Aunque es abundante en la membrana externa, se encuentra comúnmente en su conformación cerrada. Por lo tanto, se ha visto que la adquisición de resistencia a betalactámicos en *P. aeruginosa* no implica la pérdida o modificación de esta porina (123). Por el contrario, la resistencia a carbapenémicos puede explicarse por la pérdida o modificación de la porina específica OprD (124).

OprD es una proteína específica que facilita la difusión de aminoácidos básicos, péptidos pequeños y carbapenémicos en la célula (125,126). Por lo tanto, su pérdida reduce significativamente la susceptibilidad de *P. aeruginosa* a los carbapenémicos (125,127,128). Para que se produzca la resistencia a imipenem en *P. aeruginosa* se requiere la producción de la betalactamasa cromosómica AmpC, además de la pérdida de la porina OprD.

Los mutantes deficientes de AmpC y OprD siguen siendo casi tan susceptibles a imipenem como aquellos deficientes en la producción de la betalactamasa, pero que aún presentan la porina OprD. Además, la pérdida de OprD por sí sola no provoca resistencia a los carbapenémicos, como sí ocurre con el meropenem frente a la acción de las carbapenemasas (106).

1.8.3 Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo son un sistema de transporte activo entre el citoplasma bacteriano y el medio extracelular. Participan en la entrada de nutrientes, iones, secreción

de metabolitos y sustancias tóxicas, además de la comunicación entre diferentes células del entorno. Existen cinco superfamilias de bombas de eflujo, dependiendo de la homología en su secuencia, fuente de energía y especificidad de sustrato (Figura 4) (129). Las más frecuentes son:

- MFS: *Major Facilitator Superfamily*. Fuente de energía: H^+/Na^+ . Sustratos: azúcares, intermediarios del ciclo de Krebs, aminoácidos, péptidos, sideróforos y nucleósidos.
- ABC: *ATP-Binding Cassette*. Fuente de energía: ATP. Sustratos: péptidos, sideróforos, lípidos, lipopolisacáridos.
- RND: *Resistance Nodulation Division*. Fuente de energía: H^+ . Sustratos: antibióticos, metales pesados, biocidas, pigmentos.
- MATE: *Multidrug and Toxic compound Extrusion*. Fuente de energía: H^+/Na^+ . Sustratos: cationes metálicos, cationes orgánicos y toxinas.
- SMR: *Small Drug Resistance*. Fuente de energía: H^+ . Sustratos: derivados de amonio cuaternario, bromuro de etidio, acriflavina, antibióticos.

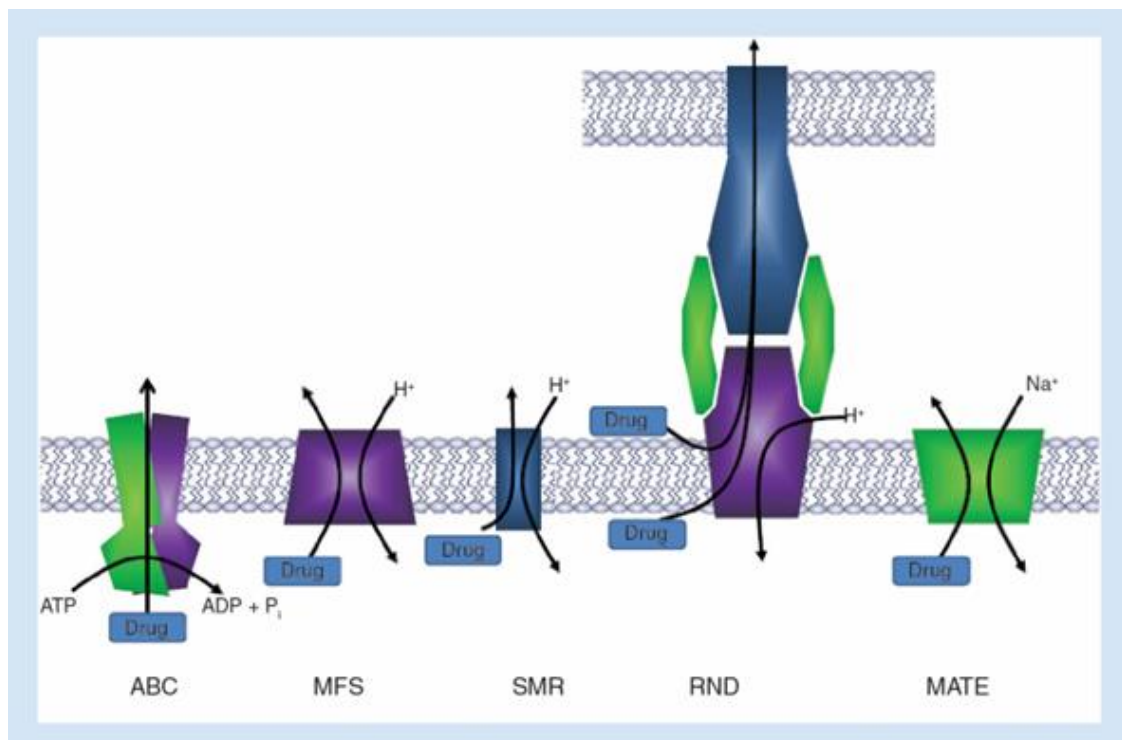


Figura 4. Principales familias de bombas de eflujo. Reimpreso de (130).

La mayoría de las bombas de eflujo de *P. aeruginosa* pertenecen a la familia RND con 12 operones diferentes (53). Están compuestas por tres proteínas diferentes: una proteína adaptadora periplásmica, comúnmente conocida como proteína de fusión de membrana periplásmica, como MexA, MexX, MexC o MexE; un transportador de la familia de RND, como MexB, MexY, MexD o MexF y una proteína de membrana externa (porina) que forma el canal como OprM, OprJ u OprN (Figura 5).

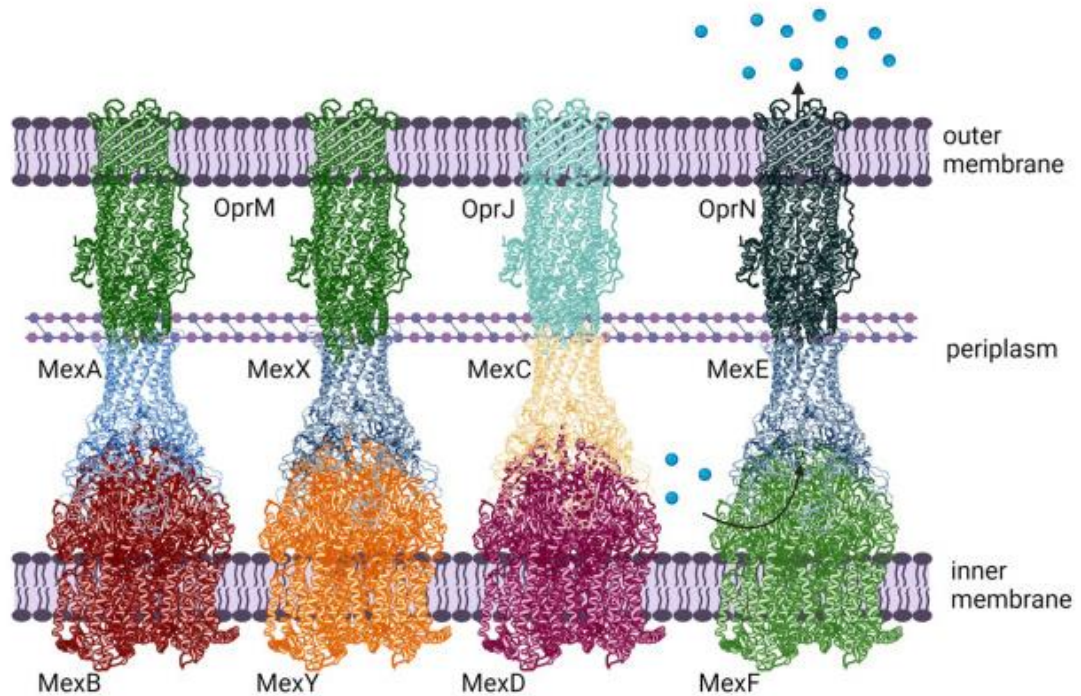


Figura 5. Principales bombas de eflujo involucradas en la resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa*. Reimpreso de (131).

La función principal de estas bombas de eflujo reside en su capacidad para expulsar una amplia variedad de sustratos, lo que contribuye a la resistencia a antibióticos aunque no estén estructuralmente relacionados. Es por ello que se clasifican como sistemas de eflujo inespecíficos. La tabla 3 muestra las bombas de eflujo más representativas de *P. aeruginosa* (132).

Tabla 3. Principales bombas de eflujo de *P. aeruginosa*, el operón donde se codifican genes reguladores y sus sustratos. Adaptado de (132).

Sistema	Operón	Gen regulador	Sustratos
MexAB-OprM	mexAB-oprM	<i>mexR</i> , <i>nalC</i> , <i>nalD</i> , <i>armR</i> , <i>rocS1/2-A2</i> , <i>brlR</i> , <i>mexT</i> , <i>cpxR</i> , <i>PA3225</i>	FQL, BL, TMP, CMP, TET NOV, ERY, LMB415, AVI, REL SUL
MexXY (OprM)	mexXY	<i>mexZ</i> , <i>armZ</i> , <i>amgRS</i> , <i>parRS</i> , <i>suhB</i> , <i>rplU</i> , <i>rpmA</i> , <i>PA2572</i> , <i>PA2573</i>	FQL, AG, FEP, CPO, CBO, TET, ERY, LMB415
MexCD-OprJ	MexCD-OprJ	<i>nfxB</i> , <i>esrC</i> , <i>algU</i> , <i>vqsM</i> , <i>PA2572</i>	FQL, CPO, FEP, TMP, TET, ERY, LMB415
MexEF-OprN	MexEF-OprN	<i>mexT</i> , <i>mexS</i> , <i>mvaT</i> , <i>ampR</i> , <i>briR</i> , <i>parRS</i> , <i>mxtR</i> , <i>nmoR</i> , <i>PA2449</i>	FQL, TMP, CMP, TET
MexGHI- OpmD	MexGHI-opmD	<i>soxR</i>	FQL, TET
MexJK(OprM)	MexJK	<i>mexL</i>	TET, ERY
MexPQ-OpmE	MexPQ-OpmE	Desconocido	FQL, ERY
MexVW (OprM)	MexVW (OprM)	Desconocido	FQL, BL, CMP, TET, ERY
CzcBA-OpmN	opmN-czcBA	<i>CzCRS</i> , <i>copRS</i>	Cd ²⁺ , Zn ²⁺
TriABC-OpmH	triABC	Desconocido	TRI
MuxABC- OpmB	muxABC-opm	Desconocido	NOV, ATM, ERY, TET

Fluoroquinolonas (FQL), betalactámicos (excepto imipenem) (BL), trimetoprima (TMP), cloranfenicol (CMP), tetraciclina (TET), novobiocina (NOV), eritromicina (ERY), aminoglucósidos (AG), cefepima (FEP), cefpiroma (CPO), ceftobiprol (CBO), aztreonam (ATM), inhibidor de la peptidil deformilasa (LMB415), avibactam (AVI), relebactam (REL), sulfonamidas (SUL), triclosán (TRI).

1.8.3.1 MexAB-OprM

Esta bomba de eflujo de *P. aeruginosa* es la única que puede expulsar compuestos como inhibidores de betalactamasas, aparte de tetraciclinas, fluoroquinolonas, cloranfenicol, macrólidos, novobiocina, trimetoprima y sulfonamidas. Además, puede expulsar antibióticos antipseudomonas, ampliamente utilizados en la práctica clínica, como ticarcilina, aztreonam, ceftazidima y meropenem (133). Desempeña un papel importante en la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa*, debido a su expresión constitutiva en cepas WT. Se ha demostrado que un mutante *knockout* (KO) del efector MexB es sensible a un gran número de inhibidores de betalactamasas (134). La regulación de MexAB-OprM implica una compleja red de genes. El principal regulador de esta bomba es *mexR* (también conocido como *nalB*), que actúa sobre el promotor distal de la bomba y se localiza río arriba como represor (135). La actividad de esta bomba también es gestionada por reguladores secundarios, ubicados en zonas más alejadas en el cromosoma, que actúan como reguladores globales. Uno de estos es *armR*, cuyo producto, ArmR, actúa como antirrepresor de MexR, bloqueando su unión a MexAB-OprM. Por otro lado, *armR* se encuentra en el operón PA3720-*armR* y está regulado negativamente por NalC. Además, NalD modula el promotor proximal de MexAB-OprM (136). Por ello, las mutaciones inactivadoras en *mexA*, *nalC*, *nalD* o *armR* conducen a la hiperexpresión de MexAB-OprM y resistencia a muchos betalactámicos (137,138). Las mutaciones en *mexR* suelen ser los principales genotipos identificados entre los aislamientos clínicos (138–140). A su vez, RocA2, un regulador involucrado en el ensamblaje de pili, también tiene un efecto regulador negativo en la expresión de MexAB-OprM, lo que indica una fuerte relación entre la bomba de eflujo MexAB-OprM y la formación de biopelícula (141). BrIR, un regulador de tipo MerR específico de la biopelícula, activa la expresión de MexAB-OprM mediante su unión a la región promotora durante la formación de la biopelícula en *P. aeruginosa* (142). AmpR también tiene un efecto regulador positivo sobre la expresión de MexAB-OprM al reprimir MexR (143). Además, se ha observado que CpxR activa la expresión de MexAB-OprM y aumenta la resistencia a múltiples fármacos en aislamientos de *P. aeruginosa* con mutaciones en *nalB* (144). Otra característica relevante de esta bomba de eflujo es que su expresión es directamente proporcional a la fase de crecimiento. A mayor densidad poblacional, mayor producción

de MexAB-OprM (145). Algunos estudios sugieren que esta regulación está determinada por el QS (146).

1.8.3.2 MexXY-OprM

Como se mencionó previamente (Ver tabla #3), la bomba de eflujo MexXY está formada por MexX y MexY, y es el único operón de bombas de eflujo en *P. aeruginosa* que no posee su propia proteína de membrana externa, pero puede asociarse con OprM (131,147,148). Los principales sustratos de esta bomba son las fluoroquinolonas, penicilinas (excepto carbenicilina y sulbenicilina), cefalosporinas (excepto ceftazidima y cefsulodina), aminoglucósidos, meropenem, tetraciclinas, cloranfenicol y eritromicina (149). La presencia de algunos compuestos, principalmente tetraciclinas, eritromicina y gentamicina inducen la expresión de MexXY, y se ha observado que al retirar estos elementos en cepas de *P. aeruginosa* WT se produce susceptibilidad a estos compuestos (133). Sin embargo, la inducción de MexXY se ve comprometida por un mecanismo de protección ribosomal, lo que sugiere que este sistema de eflujo se activa en respuesta a la disrupción ribosomal o a defectos en la traducción (150).

En cuanto a su regulación, MexZ, que se encuentra en el mismo operón, es un regulador transcripcional que actúa como represor de esta bomba. Se ha observado que mutaciones en este gen o en la región intergénica *mexZ-mexX* regulan la expresión de esta bomba hasta cinco veces más en comparación con una cepa WT (151,152). Además, los inductores de MexXY no alteran las interacciones MexZ y *mexZ-mexX*, y se ha demostrado que su inducción depende de las interacciones fármaco-ribosoma, incluso en un mutante KO de *mexZ* (150).

Si bien se ha demostrado que la disrupción ribosomal afecta a una gran cantidad de genes, haciendo uso de una biblioteca de mutantes por inserción de transposones, se ha visto que el producto de *arm*, previamente conocido como PA5471, no solo es inducible por fármacos, sino también necesario para la expresión inducida por *mexX-mexY* (136). Se ha demostrado que ArZ interactúa con el represor MexZ y, por lo tanto, interfiere con su actividad de unión al ADN (153). También se ha observado la participación del operón *parRS*, que codifica el sistema regulador de dos componentes de ParRS, en la regulación positiva de *mexX-mexY*. Además, se demostró que este operón también está implicado en

la regulación negativa de la porina OprD y en la modificación de LPS a través de los operones *pmrAB* y *arn-ugd* de manera independiente de MexZ (154–156).

1.8.3.3 MexCD-OprJ

Esta bomba es capaz de expulsar numerosos compuestos, como fluoroquinolonas, algunos betalactámicos (cefalosporinas de cuarta generación, meropenem y penicilina, excepto carbenicilina y sulbenicilina), cloranfenicol, tetraciclinas, novobiocina y trimetoprima (157–159). Su expresión se induce durante la exposición a algunos compuestos como el bromuro de etidio, la rodamina, el benzalconio o la clorhexidina (160).

El operón de la bomba de eflujo MexCD-OprJ está regulado por genes inhibidores como *nfxB*, que se encuentra aguas arriba, y *esrC*, que se encuentra aguas abajo. Las mutaciones en *nfxB* resultan en la sobreproducción de la bomba de eflujo MexCD-OprJ, mayor resistencia a las fluoroquinolonas y cambios generales en la fisiología y el metabolismo de *P. aeruginosa* (161). Las mutaciones en estos reguladores negativos causan la hiperexpresión de la bomba de eflujo (162). Aunque las mutaciones en *nfxB* causan hiperproducción y resistencia a compuestos que pueden expulsarse a través de esta bomba, esto los puede volver susceptibles a la mayoría de los betalactámicos que no son sustratos y a aminoglucósidos. La complementación de estas mutantes posteriormente revierte el fenotipo (157,163).

1.8.3.4 MexEF-OprN

Esta bomba de eflujo tiene como sustratos al cloranfenicol, fluoroquinolonas y la trimetoprima, pero carece de afinidad por los betalactámicos. Se ha demostrado que los mutantes deficientes en la producción de MexEF-OprN se vuelven sensibles a los betalactámicos y aminoglucósidos (164,165). Esta hipersusceptibilidad se asocia con una disminución de la actividad de MexEF-OprN debido a la represión del sistema QS a través de MexT (146). Aunque su expresión no está regulada por un represor, varios factores pueden afectarla como MexT, ubicado aguas arriba del operón MexEF-OprN, que codifica una proteína activadora transcripcional similar a LysR (127).

MexEF-OprN se expresa en niveles bajos en cepas WT y no tiene (o tiene poco) impacto en el desarrollo de resistencia a antibióticos (166). Su regulación estable a través de MexT

generalmente se asocia con una mayor resistencia a fluoroquinolonas, cloranfenicol, trimetoprima y carbapenémicos (166,167). Existen ciertas variaciones entre las secuencias de MexT, ya que la cepa WT PAO1 tiene dos alelos de este gen, que contienen una o más copias de una secuencia repetida de 8 nucleótidos, lo que causa un desplazamiento del marco de lectura que cambia MexT a su forma activa (168). En algunas cepas, MexT permanece en su forma inactiva debido a mutaciones suprimidas en la región codificante. Sin embargo, mutaciones o deleciones adicionales pueden revertir MexT a su forma activa (146). En otras cepas, la activación transcripcional de MexEF-OprN ocurre tras una mutación inactivadora en MexS (también conocida como Qrh o PA2491) que se encuentra aguas arriba de MexT. Se cree que su inactivación causa la acumulación de metabolitos que actúan como señal para la activación de MexT y, por lo tanto, producción de MexEF-OprN (169). Otro regulador de esta bomba es MvaT, un regulador global que se ha descrito como represor de MexEF-OprN (170).

Una función importante de esta bomba de eflujo es su influencia en OprD. Aquellas cepas que producen MexEF-OprN a través de MexT se vuelven más resistentes a los antibióticos que pueden expulsarse a través de esta y a imipenem. Esta pérdida de susceptibilidad se debe a una disminución en la expresión de OprD, lo que resulta en una menor cantidad de OprD en la membrana externa y una menor entrada de este antibiótico al interior de la célula (171–173).

1.8.3.5 Otras bombas de eflujo

Las cuatro bombas de eflujo previamente mencionadas son las que tienen un mayor impacto en la RAM de *P. aeruginosa*, incluso en ausencia de inductores, como es el caso de MexAB-OprM. Sin embargo, se han descrito más bombas de eflujo en *P. aeruginosa*, como MexGHI-OpmD, cuya función principal es transportar una fenazina que controla la expresión génica y el desarrollo de biopelículas, además de conferir bajos niveles de resistencia a fluoroquinolonas, tetraciclina y vanadio (174). Aunque se ha mencionado que MexJK (OprM) es capaz de expulsar eritromicina y tetraciclina, se ha visto que esta bomba se encuentra involucrada en el QS y en la expresión de factores de virulencia regulados por Pqs, lo que sugiere que podría participar en la homeostasis del hierro dependiente de la pioverdina, en *P. aeruginosa* (175). Por otro lado, MexPQ-OpmE puede expulsar

fluoroquinolonas y eritromicina, y se ha observado que puede estar silenciada o tener una baja expresión en *P. aeruginosa* WT, necesitando altas concentraciones de fluoroquinolonas para inducir su expresión (176). Otra bomba de eflujo RND de *P. aeruginosa* es MexVW, la cual recientemente se ha descrito como un posible mecanismo de resistencia a las nuevas combinaciones ceftazidima/avibactam y ceftolozano/tazobactam cuando se ha perdido o inhibido MexAB-OprM (177). La bomba de eflujo CzcCBA, perteneciente a la familia de bombas de eflujo de metales pesados, está regulada por el sistema de dos componentes CzcRS, y aunque solo se encarga de expulsar Cu^{2+} y Zn^{2+} , a su vez puede regular la transcripción de OprD (178). Este mecanismo se conoce como coregulación (179). El triclosán, un biocida ampliamente utilizado en el ámbito clínico durante los últimos treinta años, solo se expulsa mediante la bomba de eflujo TriABC-OpmH (180). También se ha demostrado que MuxABC-OpmB influye en la resistencia a la novobiocina, el aztreonam, los macrólidos y la tetraciclina, pero solo en ausencia de otros RND (181).

1.9 Resistencia antimicrobiana transferible

La mayoría de los elementos genéticos móviles de RAM se codifican en plásmidos y transposones, lo que facilita el intercambio de material genético entre cepas de la misma especie, o incluso entre diferentes especies. Existen dos tipos de genes que pueden transferirse horizontalmente en *P. aeruginosa*: las betalactamasas y las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME), ambas presentes comúnmente en integrones de tipo 1. Sin embargo, las más relevantes y comunes que son detectadas en el ámbito clínico son las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y las carbapenemasas (182).

Por un lado, las BLEE son pertenecientes a las clases A y D de Ambler, algunas de las más prevalentes son PER, VEB, GES, TEM, SHV, CTX-M u OXA (182). Presentan patrones de hidrólisis variados como PER que confiere resistencia a penicilinas, cefotaxima, ceftazidima y aztreonam, pero no a carbapenémicos ni cefamicinas. Su actividad es inhibida eficazmente por clavulanato, sulbactam y tazobactam (183). Por otro lado, GES es inhibida por imipenem e incapaz de hidrolizar aztreonam. Su perfil es muy similar al de otras betalactamasas de clase A. Algunas de sus variantes están ampliamente distribuidas, como la GES-5, que puede hidrolizar carbapenémicos (184). La familia OXA

comprende más de 900 variantes alélicas, y tiene patrones de resistencia muy diferentes. En *P. aeruginosa*, las que se detectan con mayor frecuencia son OXA-2 y OXA-10 (185). Sin embargo, el gen OXA-50 (anteriormente PA5514) es un gen de oxacilinas identificado in silico en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1, que se expresa constitutivamente. En consecuencia, *P. aeruginosa* alberga dos genes de betalactamasa codificados naturalmente: uno que codifica una cefalosporinasa inducible y el otro una oxacilinas expresada constitutivamente (186).

Por otro lado, aunque la resistencia a los carbapenémicos en *P. aeruginosa* se debe principalmente a mutaciones cromosómicas, la producción de carbapenemasas tiene un papel secundario; sin embargo, durante la última década, su dispersión mundial ha aumentado. Cabe destacar que la proporción de cepas productoras de carbapenemasas ha aumentado entre los aislamientos XDR (187). Las principales clases de carbapenemasas son:

- Carbapenemasas de clase A: incluyen los tipos GES, IMI, KPC, NMC y SME. Entre ellas, KPC tiene el espectro de actividad más amplio, afectando a todos los betalactámicos; aunque pueden inhibirse con avibactam. Además, cuando se describió por primera vez GES-1, no tenía actividad carbapenemasa, sin embargo, se ha descrito que algunas de sus variantes, como la GES-5, poseen esta actividad (188).
- Carbapenemasas de clase B o metalobetalactamasas (MBL): este es el grupo más relevante en *P. aeruginosa* debido a su distribución mundial (187). Las más comunes son IMP, VIM, SPM, GIM, NDM y FIM que pueden ser inhibidas por quelantes de iones metálicos (189). El ceftiderocol ha sido aprobado para el tratamiento de infecciones ocasionadas por algunos microorganismos que presentan resistencia a carbapenémicos por la producción de MBL, ya que es estable frente a la hidrólisis por esta clase de enzimas (IMP, VIM y NDM).
- Oxacilinasas de clase D: aunque no desempeñan un papel importante en la resistencia de *P. aeruginosa* a los carbapenémicos, son capaces de hidrolizar carbapenémicos. Se han identificado variantes de BLEE de clase D que hidrolizan carbapenémicos, como OXA-23, OXA-40 (anteriormente OXA-24), OXA-51 y

OXA-58, en *A. baumannii* (190–193). Entre ellas, OXA-23 se considera la principal fuente de resistencia a los carbapenémicos debido a su diseminación mundial en aislamientos de *Acinetobacter* (194). Además, otro miembro importante de esta clase es la OXA-48, descrita por primera vez en *K. pneumoniae* en 2001 (195). Asimismo, se han descrito cepas productoras de OXA-48 en brotes nosocomiales y comunitarios en todo el mundo. La preocupante y rápida propagación de Enterobacteriaceae productoras de enzimas similares a OXA-48 en diferentes ecosistemas se ha convertido en un problema grave (196).

Asimismo, los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* pueden inactivar los aminoglucósidos mediante enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME), de las cuales existen tres familias: fosforiladoras ‘aph’, acetiladoras ‘aac’ y adeniladoras ‘ant’ (197,198), las cuales presentan actividad variable frente a los diferentes aminoglucósidos. De esta forma, aac (3), aac (6')-I, aac (6')-II y ant (2'') inactivan gentamicina; aac (3)-II, ant (2''), ant (4')-1 y ant (4')-II inactivan tobramicina; aac (6'')-Ib, aac (3)-x, ant (4')-I, ant (4')-II, aph (3')-IIIa y aph (3')-VIb inactivan amikacina. Otros mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos incluyen la sobreexpresión de bombas de eflujo, en particular MexXY-OprM; la modificación de las moléculas de ARN 16S por metilasas como rmtA y rmtB (lo que impide que los aminoglucósidos se unan eficazmente a los ribosomas); y la disminución de la permeabilidad a los aminoglucósidos (198).

1.10 Resistencia producida por mutaciones

Como se ha descrito, *P. aeruginosa* es intrínsecamente resistente a las aminopenicilinas, tanto individualmente como en combinación con ácido clavulánico, así como a casi todas las cefalosporinas de primeras generaciones, en particular la cefotaxima, una cefalosporina de tercera generación, debido principalmente a la inducción de AmpC, la expresión constitutiva de la bomba de eflujo MexAB-OprM y la disminución en permeabilidad de la membrana (199). Además, esta resistencia puede verse significativamente potenciada por la adquisición de múltiples mutaciones que alteran la expresión o la función de diversos genes (Tabla 4). Sin embargo, el problema de la resistencia a los antibióticos mediada por mutaciones se agrava aún más en el contexto de infecciones crónicas, debido a la altísima prevalencia de cepas hipermutables con tasas de

mutación espontánea elevadas causadas por sistemas defectuosos de reparación del ADN (96,200).

Tabla 4 . Genes del resistoma mutacional de *P. aeruginosa*, mecanismos y antibióticos afectados. Adaptado de (201).

Gen	Mecanismo de resistencia	Antibióticos afectados
<i>gyrA, gyrB</i>	ADN girasa	Quinolonas
<i>parC, parE</i>	ADN topoisomerasa IV	
<i>pmrA, pmrB, phoP, phoQ, cprS, colR, colS</i>	Modificación estructural de LPS	Polimixinas
<i>parR</i>	Modificación estructural de LPS	Polimixinas
	↓ OprD	Carbapenémicos
	↑ MexEF-OprN	Quinolonas
	↑ MexXY	Quinolonas, polimixinas, aminoglucósidos, cefepime
<i>parS</i>	Modificación estructural de LPS	Polimixinas
	↓ OprD	Carbapenémicos
	↑ MexEF-OprN	Quinolonas
	↑ MexXY	Quinolonas, aminoglucósidos, cefepime
<i>mexR, nalC, nalD</i>	↑↑ MexAB-OprM	Quinolonas, betalactámicos
<i>nfxB</i>	↑↑ MexCD-OprJ	Quinolonas, cefepime
<i>mexS, mexT</i>	↑ MexEF-OprN	Quinolonas
	↓ OprD	Carbapenémicos
<i>cmrA, mvaT, PA3721</i>	↑ MexEF-OprN	Quinolonas

<i>mexZ</i> , PA5471.1, <i>amgS</i>	↑ MexXY	Quinolonas, aminoglucósidos, cefepime
<i>oprD</i>	Inactivación	Carbapenémicos
<i>ampC</i>	Modificación estructural	Cefalosporinas
<i>ampD</i> , <i>dacB</i> , <i>ampR</i> , <i>ampDh2</i> , <i>ampDh3</i> , <i>mpl</i>	↑ AmpC	Betalactámicos
<i>ftsI</i>	Modificación estructural	Betalactámicos
<i>fusA1</i>	Modificación del factor de elongación ribosomal G	Aminoglucósidos
<i>glpT</i>	Inactivación	Fosfomicina
<i>rpoB</i>	Modificación de ARN polimerasa	Rifampicina

↓Regulación a la baja/inactivación, ↑Hiperproducción.

1.10.1 Resistoma a betalactámicos

La sobreproducción de la cefalosporinasa cromosómica AmpC es el mecanismo de resistencia más frecuente frente a piperacilina y cefalosporinas (ceftazidima y cefepima). Este mecanismo involucra a un gran número de genes involucrados en las vías reguladoras del reciclaje de la pared celular (107) como *dacB*, *ampD* y *ampR*, cuya inactivación o la selección de mutaciones puntuales específicas conduce a altos niveles de resistencia (108,202). Mutaciones en otros genes, también involucrados en el reciclaje de la pared celular, pueden aumentar ligeramente la expresión de AmpC, pero confieren niveles de resistencia más bajos. Estos genes son *ampDh2*, *ampDh3*, *dacC* (PBP5), *pbpG* (PBP7), algunas transglicosilasas líticas, *mpl* o *nuoN* (107). Se ha demostrado que la resistencia a los betalactámicos, incluyendo a los nuevos inhibidores de betalactámicos/betalactamasas, ceftolozano/tazobactam y ceftazidima/avibactam, puede ser resultado de mutaciones que modifican el centro catalítico de AmpC. Este mecanismo se detecta en hasta el 15 % de los pacientes tratados con estos agentes (203–206). Por otro lado, se han identificado variantes de AmpC asociadas con altos niveles de resistencia a estas nuevas combinaciones, presentes en una pequeña proporción (aproximadamente el

1%) de aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* que no habían sido tratados previamente con estos agentes (207). Sin embargo, las cepas que producen estas variantes muestran susceptibilidad colateral al imipenem y a piperacilina. El desarrollo de resistencia a estas combinaciones puede implicar mutaciones que conduzcan a la modificación estructural del OXA-2/10 pasando de un espectro reducido al de una BLEE (208,209). Además, las betalactamasas adquiridas desempeñan un papel importante en la resistencia de *P. aeruginosa*, incluyendo los nuevos betalactámicos. Las MBL son las carbapenemasas más frecuentes en *P. aeruginosa*. VIM, es la enzima más frecuentemente reportada, pero otras como NDM y GES-5 están aumentando su prevalencia (187,210,211). Aunque la producción de MBL es una causa común de resistencia a ceftolozano/tazobactam, ceftazidima/avibactam, meropenem/vaborbactam e imipenem/relebactam (212), la situación es diferente (con pocas excepciones) para cefiderocol (213).

Otra situación que se ha vuelto una preocupación creciente es la fuerte presión mutacional sobre la PBP3, como lo han demostrado datos de pacientes con fibrosis quística, clonas de alto riesgo epidémico y estudios *in vitro* (214–216). Las mutaciones específicas R504C/H y F533L son las más reportadas, y ambas se localizan dentro de los dominios involucrados en la formación y estabilización del complejo betalactámico-PBP (217). Además, se ha documentado que estas mutaciones se seleccionan *in vivo* en pacientes con fibrosis quística (215) o tras la exposición *in vitro* a diferentes betalactámicos (214,218).

La inactivación de la porina OprD de *P. aeruginosa* es la causa más frecuente de resistencia a carbapenémicos, principalmente imipenem (199). Su inactivación se debe a cambios en el marco de lectura o codones de parada prematuros, como el caso de Q142X en el clon de alto riesgo ST175 (214). Además, la resistencia a este carbapenémico también puede surgir de la inactivación de OprD mediante mutaciones en los reguladores MexEF-OprN, MexS/T o el sistema de dos componentes ParRS (219).

Las principales bombas de eflujo de *P. aeruginosa* también desempeñan un papel importante en la resistencia a las nuevas combinaciones de betalactámicos e inhibidores de betalactamasas, no solo por su capacidad para extruir al betalactámico sino por la expulsión de estos inhibidores. Como han revelado algunos estudios, mutaciones en

MexAB-OprM y MexEF-OprN desempeñan un papel fundamental en la resistencia a imipenem/relebactam (220).

Además, se ha descrito la selección de grandes deleciones cromosómicas (de hasta 600 kb) que afectan a partes específicas del genoma (214,218) como un mecanismo relevante de resistencia a betalactámicos. Estas deleciones se han descrito en aislamientos de FQ y en mutantes resistentes a betalactámicos desarrollados *in vitro* (218,221). Estas regiones incluyen el gen *galU*, descrito como un mecanismo de resistencia a ceftazidima y meropenem. Esta proteína codifica una UDP-glucosa-I-fosfato uridiltransferasa y participa en la síntesis del núcleo de LPS. En mutantes de *galU* se ha observado un aumento en las CMI de ceftazidima y meropenem (222,223).

1.10.2 Resistoma a aminoglucósidos

La resistencia a aminoglucósidos se encuentra estrechamente relacionada con la THG de *Aminoglycoside-Modifying Enzymes* (AME's), frecuentemente cotransferidas con carbapenemasas (188). No obstante, recientemente se han descrito las metilasas de ARN 16S transferibles, que modifican las dianas de los aminoglucósidos, confiriendo resistencia a todos los aminoglucósidos clínicamente aprobados (224,225).

Por otro lado, la sobreexpresión de la bomba de eflujo MexXY-OprM también se ha relacionado con la resistencia a estos antibióticos. La principal causa de la sobreproducción de MexX Y-OprM es la selección de mutaciones en los principales reguladores MexZ, AmgS o ParRS (156,226). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el clon de alto riesgo ST175, ampliamente distribuido en todo el mundo, sobreexpresa esta bomba de eflujo debido a una mutación específica en MexZ (G195D/E) (156).

Los altos niveles de resistencia a los aminoglucósidos pueden deberse a la acumulación de múltiples mutaciones en genes específicos, como en *fusA1*. Estos resultados se han detectado en estudios *in vitro*, pero también en aislamientos clínicos de FQ (69,215).

1.10.3 Resistoma a fluoroquinolonas

La resistencia a las fluoroquinolonas en *P. aeruginosa* se debe principalmente a mutaciones cromosómicas, incluyendo las de las ADN girasas (*gyrA* o *gyrB*) y las

topoisomerasas IV (*parC* o *parE*) (227). Se ha visto que los altos niveles de resistencia a fluoroquinolonas en clonas de alto riesgo de *P. aeruginosa* implican dos mutaciones específicas: GyrA(T831) y ParC(S87W) (216). Además, la sobreproducción de MexEF-OprN o MexCD-OprJ también se relaciona con la resistencia clínica a las fluoroquinolonas (228).

1.10.4 Resistoma a polimixinas

La prevalencia de aislamientos resistentes a polimixinas sigue siendo baja a nivel mundial (<5%), pero ha aumentado en los últimos años debido al uso de estas como antibióticos de último recurso para tratar los aislamientos XDR y DTR de *P. aeruginosa* (229). La modificación del lípido A del LPS se ha descrito como el principal mecanismo de resistencia a la colistina (230,231). Las mutaciones que causan este perfil se encuentran comúnmente en los sistemas de dos componentes PmrAB o PhoPQ, lo que lleva a la activación del operón *arnBCADTEF* (232). Otros estudios han descrito la participación de los sistemas de dos componentes ColRS y CprRS en la resistencia a la colistina (233).

1.10.5 Resistoma a fosfomicina

Los principales mecanismos que confieren resistencia a la fosfomicina en *P. aeruginosa* son mutaciones inactivadoras en el gen *glpT*, que codifica una permeasa de glicerol-3-fosfato, necesaria para la captación de fosfomicina (234). Las mutaciones en este gen se encuentran comúnmente en clonas de alto riesgo de *P. aeruginosa* MDR/XDR/DTR, y algunas mutaciones específicas, como T211P, se han visto en clonas como ST175 (112).

1.11 Secuenciación del genoma completo

La determinación del orden de los nucleótidos ha sido fundamental para comprender la biología microbiana. Aunque las primeras aproximaciones en los años sesenta permitieron acceder únicamente a secuencias cortas de RNA, no fue sino hasta la década de los setenta cuando Sanger desarrolló un método aplicable a moléculas de mayor tamaño, permitiendo posteriormente el desarrollo de proyectos de genómica a gran escala (235). Esta tecnología sentó las bases para que en 1995 se publicara el primer genoma bacteriano completo, correspondiente a *Haemophilus influenzae* (236). Esto marcó el

inicio de la secuenciación de genomas completos y abrió la posibilidad de explorar la organización y variación genética de microorganismos patógenos.

Sin embargo, la secuenciación basada en Sanger era lenta, costosa y limitada a un número reducido de fragmentos por corrida. La introducción de tecnologías de segunda generación aceleró exponencialmente la capacidad de lectura, disminuyendo costos y permitiendo que la secuenciación pueda ser aplicada a múltiples organismos clínicos de manera simultánea (237). De esta forma, el *Whole Genome Sequencing* (WGS) se ha convertido en una herramienta altamente accesible para la caracterización genómica de bacterias, con aplicaciones directas en diagnóstico, vigilancia epidemiológica, investigación de resistencia antimicrobiana y estudios evolutivos.

El WGS permite analizar de manera exhaustiva la composición genética de bacterias causantes de infección, proporcionando información sobre resistencia antimicrobiana, virulencia, mecanismos de diseminación y relaciones filogenéticas entre aislamientos clínicos. A diferencia de las pruebas fenotípicas tradicionales, que se enfocan en la resistencia expresada, el análisis genómico permite identificar mutaciones, transferencias horizontales, presencia de elementos móviles y genes adquiridos, incluso antes de que la característica sea fenotípicamente detectable (236).

En Microbiología clínica, el WGS ha mostrado utilidad creciente para la identificación de especies, tipificación genómica, vigilancia de brotes hospitalarios, detección de clones de alto riesgo, caracterización del resistoma y análisis comparativo entre aislamientos, llevando a considerar a WGS como una herramienta de referencia para epidemiología molecular (238).

A diferencia de los métodos clásicos utilizados en microbiología clínica, tales como el cultivo, la observación morfológica o la determinación fenotípica de susceptibilidad antimicrobiana, la secuenciación de genoma completo ofrece la posibilidad de analizar directamente el material genético del microorganismo, permitiendo identificar genes de resistencia, elementos móviles y mutaciones específicas que no siempre son detectables por procedimientos convencionales (238). En este sentido, el WGS no depende de la expresión fenotípica del gen o del mecanismo de resistencia, sino de su presencia genética, lo que permite detectar mecanismos emergentes incluso antes de que se manifiesten

clínicamente. De manera adicional, el análisis genómico supera a técnicas moleculares basadas en fragmentos, como PCR dirigida, MLST o PFGE, ya que proporciona información completa del genoma y permite realizar epidemiología de alta resolución, asociar mutaciones con patrones clínicos y evaluar relaciones filogenéticas con precisión, incluso entre aislamientos estrechamente relacionados (236).

1.11.1 Tecnología Illumina

Actualmente, la tecnología Illumina es la plataforma de secuenciación más utilizada para WGS debido a su alta precisión, elevada capacidad de multiplexación y a su capacidad para obtener millones de lecturas cortas en paralelo a través de la metodología de secuenciación por síntesis (237). En este proceso, el ADN genómico se fragmenta y posteriormente se prepara mediante la reparación de extremos y la ligación de adaptadores específicos que contienen secuencias necesarias para la amplificación en superficie y para la identificación de muestras, permitiendo la lectura simultánea de múltiples aislamientos en una misma corrida (239). En un siguiente paso, los fragmentos se unen a una superficie revestida de oligonucleótidos complementarios y se generan “clústeres” mediante amplificación en puente, lo que permite obtener miles de copias idénticas de cada molécula inicial y genera una señal suficientemente fuerte para ser detectada por el sistema óptico.

Posteriormente, durante el ciclo de síntesis, nucleótidos modificados con fluoróforos reversibles se incorporan de manera secuencial, registrándose una imagen en cada ciclo que identifica la base añadida. Una vez registrada la señal fluorescente, el grupo bloqueador se retira, permitiendo el siguiente ciclo de incorporación. La repetición controlada de estas etapas genera millones de lecturas, las cuales pueden posteriormente ensamblarse y analizarse con herramientas bioinformáticas. Esta estrategia permite obtener niveles altos de cobertura y profundidad, facilitando la identificación de variantes, detección de SNP's, descubrimiento de elementos genéticos móviles y análisis comparativos entre múltiples aislamientos bacterianos. La capacidad de multiplexación, la precisión de lectura y la estabilidad de la química de síntesis son aspectos que han permitido consolidar a Illumina como la tecnología dominante para análisis genómicos aplicados a patógenos clínicos (239).

1.11.2 Análisis bioinformático

El análisis bioinformático constituye un componente esencial del WGS, ya que transforma las lecturas crudas obtenidas en información biológica y clínica que se puede interpretar. El flujo de análisis típicamente inicia con la evaluación de la calidad de las lecturas, eliminación de adaptadores y filtrado de secuencias de baja calidad. Posteriormente, los datos pueden ensamblarse *de novo* o mapearse contra un genoma de referencia, generando contigs y eventualmente ensamblajes más completos que permitan interpretar el contenido genético. Después del ensamblaje, la anotación automatizada permite identificar genes codificantes, elementos móviles, regiones regulatorias, sistemas de resistencia antimicrobiana, bombas de eflujo, betalactamasas y otros determinantes relevantes (240).

Posteriormente, la comparación entre aislamientos puede realizarse mediante análisis de SNP, MLST, cgMLST o pan-genómica. Estas aproximaciones permiten explorar la relación genética entre aislamientos, identificar clonalidad, rastrear brotes hospitalarios y asociar características genéticas con patrones clínicos. Finalmente, la información puede integrarse con datos fenotípicos o clínicos para caracterizar genotipos de alto riesgo, identificar variantes relevantes y comprender los mecanismos subyacentes de resistencia y virulencia. Con ello, el análisis bioinformático convierte la secuenciación en una herramienta de vigilancia epidemiológica, diagnóstico molecular y comprensión evolutiva de patógenos (238).

1.12 Clonas de alto riesgo

Además de la resistencia intrínseca de este microorganismo y de su capacidad para conseguir nuevos determinantes de resistencia mediante la THG, *P. aeruginosa* presenta una estructura poblacional epidémica no clonal, conformada por un pequeño número de clonas ampliamente distribuidas, las cuales son seleccionadas a partir de una gran diversidad de genotipos raros no relacionados entre sí, que además se recombinan con alta frecuencia (241).

El análisis epidemiológico de aislamientos de *P. aeruginosa* procedentes de IAAS, el medio ambiente y pacientes con FQ muestra una notable variedad clonal, con la mayoría de los aislamientos representados por genotipos únicos (182). Sin embargo, se ha mostrado la diseminación en hospitales de todo el mundo de clonas MDR/XDR, las cuales

se han denominado como clonas de alto riesgo (242). Según la prevalencia de las clonas de alto riesgo, su propagación global y su asociación con los perfiles MDR/XDR, las 10 clonas de *P. aeruginosa* de alto riesgo más importantes a nivel mundial son los tipos de secuencia (ST) ST235, ST111, ST175, ST233, ST244, ST357, ST308, ST277, ST654 y ST298. Entre ellos, cabe destacar las clonas ST235, ST175 y ST111, ya que son las más extendidas y que causan más infecciones en hospitales a nivel mundial con perfiles MDR/XDR (182,243).

Cabe destacar que, en los últimos años, también se han reportado casos de ST773, alcanzando cifras similares a las de las otras 10 clonas principales. Este ST se asocia con fenotipos MDR y XDR debido a un amplio repertorio de genes de resistencia a antibióticos, tanto intrínsecos como adquiridos, como las MBL (VIM, IMP, NDM), ubicados principalmente en elementos genéticos móviles, que también contienen otros genes de resistencia. Además, se está convirtiendo en un clon ampliamente distribuido, con informes en Hungría, India, Nepal, Nigeria, Arabia Saudita, Corea del Sur, Reino Unido y Estados Unidos (244).

1.12.1 ST 175

ST175 es una de las clonas más prevalentes en el mundo (187). Este clon muestra el genotipo *exoS*⁺ T3SS y se asocia con niveles de virulencia muy bajos (216). Sin embargo, las infecciones causadas por este clon son difíciles de tratar debido a su fenotipo MDR/XDR, frecuentemente causado por una combinación de mutaciones específicas como AmpR (G154R), OprD (Q142X), MexZ (G195E), GyrA (T831/D87N) y ParC (S87W/L168Q) (112).

1.12.2 ST 235

Se ha determinado que ST235 es el clon de alto riesgo más relevante y extendido (245). Este clon está asociado con más de 60 variantes diferentes de betalactamasas y muestra asociación con genes de resistencia adquiridos horizontalmente (241). Se ha informado que las cepas identificadas como clonas ST235 son portadoras de diversas BLEE, como PER, PSE, BEL, GES y diversas variantes de OXA. La gran mayoría de las MBL reportadas en clonas ST235 son variantes de IMP, pero también algunos tipos de VIM (246). Es importante destacar que el gen *aac (6)-Ib* se ha descrito en clonas de

ST235, siendo responsable de conferir resistencia a los aminoglucósidos (245). Otros genes de resistencia a aminoglucósidos que se suelen encontrar en esta clona son AacA7 y AadA1 (187).

ST235 se caracteriza por una alta virulencia, principalmente debido a la sobreproducción de T3SS, codificado por el gen *exoU+* (216). Este ST se encuentra fuertemente asociado a las carbapenemasas GES y VIM, y con las enzimas modificadoras de aminoglucósidos AadA1/6. Sin embargo, los genes más prevalentes que confieren resistencia a betalactámicos y fluoroquinolonas en este ST presentan una amplia variedad de mutaciones (187).

1.12.3 ST 111

ST111 es el segundo clon de alto riesgo más extendido a nivel mundial. Se asocia con fenotipos MDR/XDR y, en particular, con la producción de MBL y oxacilinasas de espectro estrecho, generalmente OXA-46. Además, determinantes de resistencia a aminoglucósidos como *aac(6)-Ib* y *aacA29a* se encuentran en esta clona (246). Los mecanismos de resistencia comúnmente encontrados en este clon son sustituciones de aminoácidos en GyrA (T831), ParC (S87W y L168Q) y ParE (E459K), que confieren resistencia a las fluoroquinolonas (214,247). Además, este clon presenta *exoS+*, produce T3SS y muestra niveles de virulencia considerablemente altos (182).

1.13 Nuevos betalactámicos y combinaciones con inhibidores de betalactamasas

El tratamiento habitual de las infecciones producidas por *P. aeruginosa* incluye ocho clases de antibióticos: aminoglucósidos (amikacina y tobramicina), cefalosporinas (ceftazidima, cefepima), carbapenémicos (imipenem y meropenem), penicilinas con inhibidores de β -lactamasas (ticarcilina/ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam), fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino), monobactámicos (aztreonam), ácidos fosfónicos (fosfomicina) y polimixinas (colistina y polimixina B) (248). Sin embargo, durante la última década, el tratamiento de las infecciones provocadas por *P. aeruginosa* se ha vuelto cada vez más difícil debido a los altos niveles de resistencia alcanzados por ciertos linajes ampliamente distribuidos de este patógeno. El desarrollo de nuevos antibióticos es complejo y requiere mucho tiempo; por lo tanto, se han sintetizado nuevos inhibidores de betalactamasas para mitigar este problema. La eficacia de estos compuestos

y el consiguiente desarrollo de resistencia es una preocupación importante en todo el mundo (249).

Un enfoque que ha sido establecido para superar la resistencia a los betalactámicos es reducir o inhibir la actividad de las betalactamasas, preservando así la eficacia de las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. Por lo tanto, los dos enfoques existentes son: un inhibidor suicida o un inhibidor reversible. Los inhibidores suicidas (ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam) forman complejos acil-enzimáticos estables, que pueden experimentar reacciones químicas de postacilación y fragmentarse o desacilarse muy lentamente. Por el contrario, los inhibidores reversibles, como los diazabiciclooctanos (avibactam y relebactam) y los boronatos (vaborbactam y taniborbactam), pueden desacilarse de la betalactamasa sin modificarse e inhibir otra molécula de betalactamasa (250–252).

1.12.1 Ceftolozano/Tazobactam

Esta combinación de betalactámico e inhibidor de betalactamasas presenta una alta actividad contra *P. aeruginosa* MDR/XDR. El ceftolozano (CXA-101)/tazobactam (CL298741) (Figura 6) fue desarrollado por Merck y conocido comercialmente como Zerbaxa. Fue aprobado inicialmente por la Food & Drug Administration (FDA) en 2014 y por la European Medicines Agency (EMA) en 2015 para el tratamiento de infecciones urinarias intraabdominales complicadas, y posteriormente para el tratamiento de adultos con neumonías intrahospitalarias y asociadas con ventilación mecánica. El ceftolozano es una cefalosporina de quinta generación y uno de los agentes antipseudomonas más activos debido a su alta afinidad por las PBP y su estabilidad frente a las bombas de eflujo (253). Además, el ceftolozano es activo contra la cefalosporinasa cromosómica AmpC y las variantes de TEM y SHV, mientras que el tazobactam se encarga de las serin-betalactamasas de clase A y las BLEE. Por otro lado, el ceftolozano no es activo contra las carbapenemasas (254).

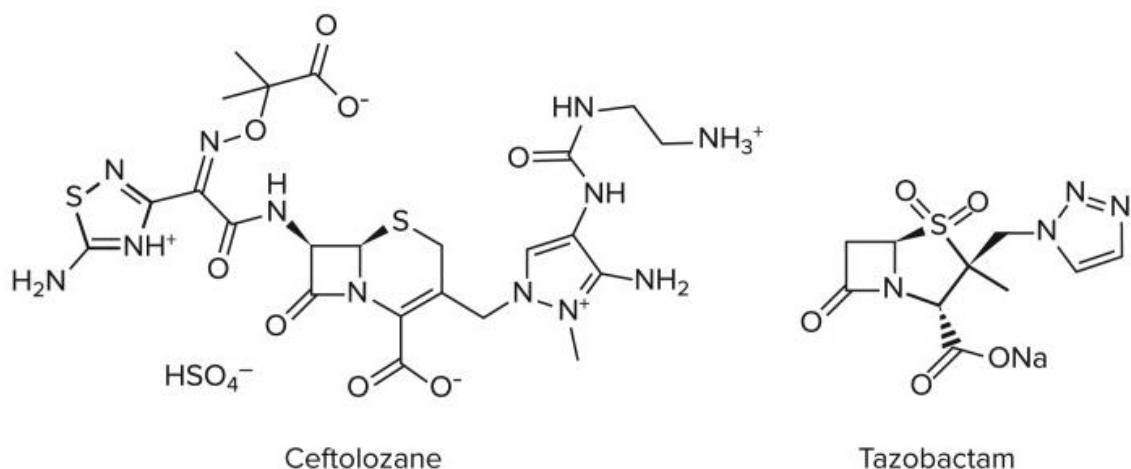


Figura 6. Estructura química de Ceftolozano/Tazobactam (255).

Varios estudios han evaluado la susceptibilidad de *P. aeruginosa* MDR/XDR a esta combinación, pero los resultados presentan variaciones (55-96.6 %) según el país del estudio (256). Se ha mostrado el desarrollo de resistencia *in vivo* a esta combinación, siendo las modificaciones en la cefalosporinasa cromosómica AmpC y las betalactamasas adquiridas el principal mecanismo de resistencia en *P. aeruginosa* MDR (206), aunque se ha descrito que el desarrollo de resistencia fue más difícil de lograr que para los agentes antipseudomonales clásicos (206).

1.12.2 Ceftazidima/Avibactam

Ceftazidima (GR-20263) es una cefalosporina de tercera generación con actividad contra *Pseudomonas* spp. y Enterobacteriaceae. (Figura 7). Además, es estable frente a variantes de betalactamasas como TEM, SHV y OXA. Esta cefalosporina puede utilizarse en combinación con el inhibidor de betalactamasas avibactam (NXL-104), cuya función es proteger a este antibiótico de la degradación causada por enzimas tipo AmpC, BLEE y carbapenemasas de clase A como GES, pero no de MBL (257). Este compuesto fue desarrollado por Pfizer y se comercializa como Avycaz. Fue aprobado inicialmente por la FDA en 2015 y por la EMA en 2016 para el tratamiento de infecciones urinarias intraabdominales complicadas, y en 2018 para el tratamiento de pacientes con neumonías intrahospitalarias y asociadas con ventilación mecánica. Finalmente, en 2019 se autorizó su uso en pediatría (258).

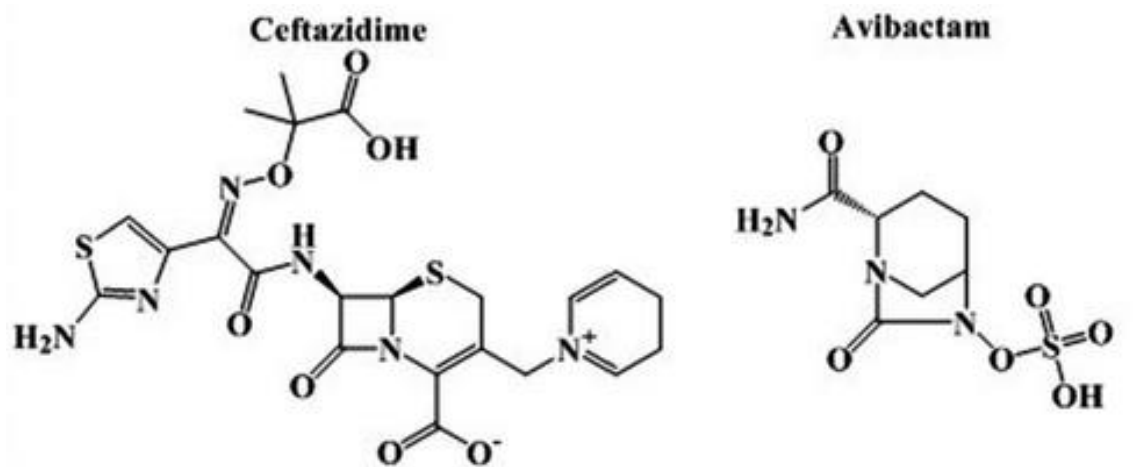


Figura 7. Estructura química de Ceftazidima/Avibactam (259).

La actividad *in vitro* de ceftazidima/avibactam contra Enterobacteriaceae spp. productoras de BLEE, betalactamasas tipo C o KPC, y carbapenemasas OXA-48 convierte a esta combinación en una opción eficaz para el tratamiento de infecciones por Enterobacteriaceae spp. multidrogosresistentes. Asimismo, la actividad de ceftazidima/avibactam contra *P. aeruginosa* es superior a la de otros betalactámicos disponibles y comparable a la de ceftolozano/tazobactam (260).

1.12.3 Imipenem/Cilastatina/Relebactam

Imipenem (MK-0787)/cilastatina/relebactam (MK-7655) es una combinación de betalactámico con un inhibidor de betalactamasas con actividad contra Enterobacterales resistentes a carbapenémicos y *P. aeruginosa* DTR (Figura 8). Cabe destacar que el relebactam es un potente inhibidor de AmpC que se disocia lentamente, por lo que tiene una eficacia de inhibición prácticamente similar a la de un inactivador irreversible. El relebactam no presenta actividad antimicrobiana directa, pero proporciona una inhibición fiable de muchas enzimas de clase A y clase C de Ambler. Esta combinación, también desarrollada por Merck y denominada comercialmente como Recarbrio, fue aprobada por la FDA en 2019 y por la EMA en 2020 para el tratamiento de infecciones urinarias complicadas, infecciones bacterianas intraabdominales complicadas, neumonías intrahospitalarias y asociadas con ventilación mecánica (261). Si bien se ha descrito que imipenem/relebactam es activo contra las BLEE, la AmpC mediada por plásmidos (pAmpC) y las mutaciones de reconocimiento de sustrato de las bombas de eflujo, han

sido detectados como los primeros mecanismos de resistencia a esta combinación en aislamientos clínicos (262). La cilastatina siempre se administra en combinación con imipenem para evitar su degradación por la dehidropeptidasa-I.

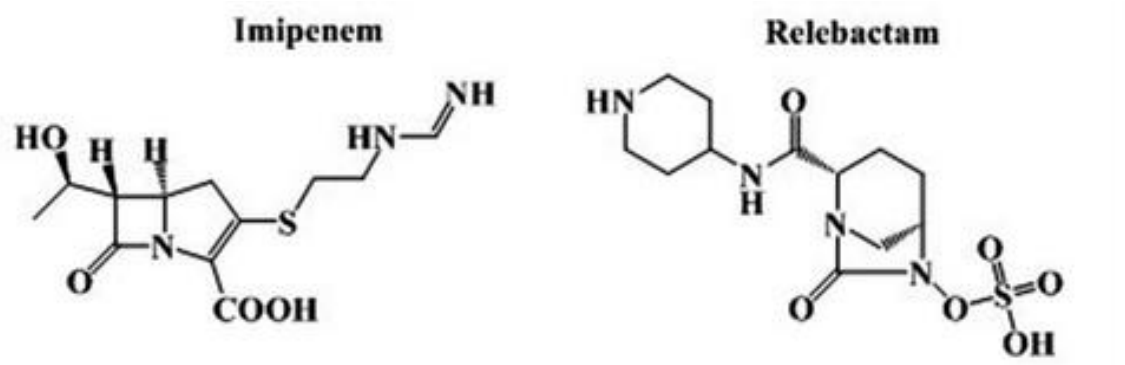


Figura 8. Estructura química de Imipenem/Relebactam (259).

1.12.4 Cefiderocol

Como se mencionó anteriormente, están surgiendo nuevos mecanismos de resistencia a las combinaciones de betalactámicos e inhibidores de betalactamasas desde su introducción en la práctica clínica hace algunos años. Por esta razón, el cefiderocol (S-649366) fue aprobado por la FDA en 2019 y por la EMA en 2020 para el tratamiento de infecciones urinarias y respiratorias complicadas, incluyendo las causadas por *P. aeruginosa* MDR/XDR resistente a carbapenémicos (Figura 9) (263). Este antibiótico fue desarrollado por Shionogi y se conoce comercialmente como Fetroja. En general, su estructura es la de una cefalosporina siderófora. Es similar a la cefepima, con un grupo piperidinio en la cadena lateral C-3, que ayuda a mejorar la actividad antibacteriana y la estabilidad contra las betalactamasas y también similar a la ceftazidima, con un grupo carboxipropanoxiimino en la cadena lateral C-7, que ayuda en el transporte a través de la membrana externa. Aparte de la estructura de la cefalosporina, el cefiderocol posee una fracción catecol en el extremo de la cadena lateral C-3, lo que le confiere su actividad como sideróforo. Gracias a su entrada masiva en la célula mediante la quelación del hierro, el cefiderocol se transporta al espacio periplásmico mediante sistemas de transporte de hierro férrico y, una vez allí, se disocia del hierro y se une a las PBP, inhibiendo la síntesis de la pared celular (264).

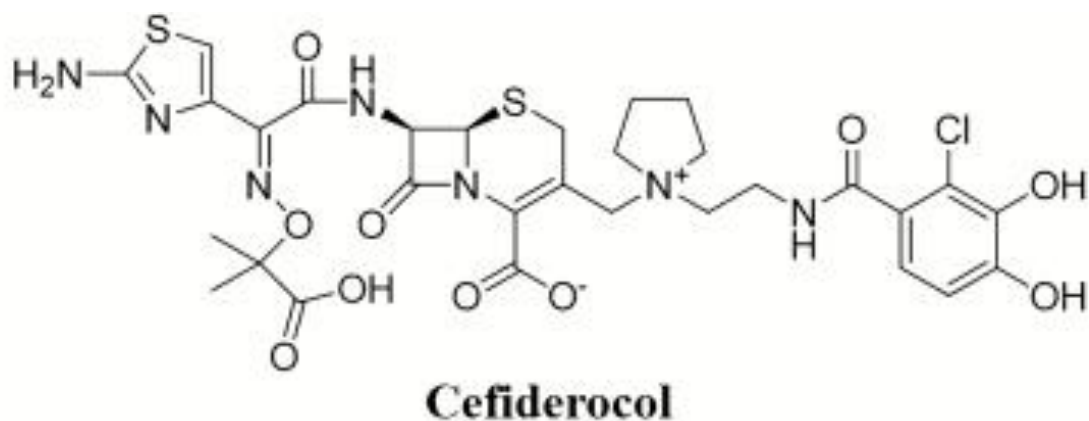


Figura 9. Estructura química de Cefiderocol (264).

1.13 Combinaciones de antimicrobianos

El uso de combinaciones de antimicrobianos surge como una estrategia frente al aumento a nivel global de aislamientos multirresistentes (MDR), extensamente resistentes (XDR) y, más recientemente, difíciles de tratar (DTR) de *P. aeruginosa* y otros bacilos Gramnegativos (265). La justificación para el uso de combinaciones incluye varios objetivos: ampliar el espectro de actividad frente a infecciones polimicrobianas, incrementar la potencia bactericida mediante sinergia, reducir la probabilidad de aparición de mutantes resistentes y, en algunos casos, mejorar la penetración en biopelícula (266). Sin embargo, la evidencia clínica y experimental muestra que estos beneficios no son uniformes y dependen fuertemente del mecanismo de resistencia implicado y de la combinación específica de antimicrobianos (267).

En una revisión sistemática y metaanálisis de más de 180 esquemas combinados evaluados frente a aislamientos resistentes a carbapenémicos, Scudeller *et al.* mostraron que, aunque ciertas combinaciones alcanzan tasas altas o moderadas de sinergia *in vitro*, los resultados son muy heterogéneos y aún no se ha demostrado de manera consistente una superioridad clara frente a la monoterapia en estudios clínicos. En el caso específico de *P. aeruginosa*, la combinación imipenem–amikacina destacó por presentar un efecto sinérgico alto en modelos de time-kill, lo que respalda la combinación tradicional de un betalactámico o agente antipseudomonas con un aminoglucósido (267).

En *P. aeruginosa* MDR/XDR/DTR, la combinación de antimicrobianos se vuelve especialmente relevante por la coexistencia de múltiples mecanismos de resistencia:

sobreexpresión de AmpC, pérdida de porinas (particularmente OprD), sobreexpresión de bombas de eflujo del sistema Mex, producción de carbapenemasas (incluyendo MBL y variantes de GES con actividad carbapenemasa) y elevada capacidad para formar biopelículas (268,269). Estos mecanismos no solo reducen la actividad de monoterapias, sino que también condicionan qué combinaciones de antimicrobianos tienen mayor probabilidad de mostrar sinergia. Por ejemplo, en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* XDR no productora de MBL pero con OprD disminuida, sobreexpresión o mutación en AmpC y bombas de eflujo, se ha demostrado que la combinación CZA–IPM puede restaurar la actividad de ambos agentes, con reducciones de hasta 16 veces en las CMI de CZA frente a cepas resistentes, un hallazgo congruente con el hecho de que el bloqueo parcial de betalactamasas asociado a un carbapenémico con diferente vía de entrada puede compensar parcialmente la pérdida de porina y la presión sobre AmpC por parte de IPM (270).

Desde el punto de vista experimental, varios trabajos han evaluado combinaciones frente a *P. aeruginosa* MDR/XDR o DTR utilizando metodologías distintas, lo que complica la comparación directa de resultados. Usman et al. analizaron 266 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, con una proporción elevada de MDR (25 %) y XDR (20 %), además de una frecuencia considerable de ESBL y carbapenemasas (incluyendo *blaNDM-1*, *blaOXA-48* y *blaKPC-2*). En este estudio, se evaluó la formación de biopelícula en microplacas y posteriormente se analizaron los efectos de gentamicina, cefepime y ciprofloxacino, de manera individual y en combinación. Aunque no utilizan estrictamente un índice de FIC, sí describen que la combinación gentamicina–cefepime logró la erradicación completa de biopelículas en un subconjunto de aislamientos productores fuertes, mientras que CIP–FEP mostró efectos sinérgicos o aditivos en la inhibición de biopelícula. Un punto fuerte de este trabajo es que se centra en la biopelícula, un fenotipo altamente relevante en infecciones crónicas respiratorias; sin embargo, la interpretación cuantitativa de la sinergia es limitada al no emplear sistemáticamente métodos estandarizados como *checkerboard* con FIC o estudios de *time-kill* específicos (268).

En Gramnegativos MDR/XDR productores de MBL, la combinación de ATM–CZA se basa en la estabilidad de aztreonam frente a MBL y en la capacidad de avibactam para

inhibir las β -lactamasas de clase A, C y algunas D que de otro modo hidrolizarían aztreonam. Khan et al. evaluaron cuatro métodos de laboratorio para determinar la susceptibilidad a la combinación ATM–CZA en 10 Enterobacterales y 6 aislamientos de *P. aeruginosa*, incluyendo productores de MBL y GES. Se demostró que todos los CRE productores de NDM y los aislamientos de *P. aeruginosa* productores de GES resistentes a ATM y CZA por separado se volvieron susceptibles a la combinación (269).

En cuanto a sinergia con nuevos inhibidores de β -lactamasas, Mikhail y colaboradores exploraron CZA en combinación con meropenem, amikacina, aztreonam, colistina y fosfomicina frente a 21 cepas de *P. aeruginosa* MDR y 21 cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos, caracterizadas mediante técnicas como WGS, RT-qPCR y SDS-PAGE para establecer los mecanismos de resistencia. Utilizaron tanto el método de tablero como ensayos de *time-kill*, observando sinergia de CZA con amikacina y aztreonam en la mayoría de los aislamientos, así como una reducción significativa de las MIC de CZA cuando se combinaba con otros agentes. En *P. aeruginosa*, la combinación CZA–meropenem fue particularmente efectiva, probablemente por la restauración de la actividad del carbapenémico al reducir la presión de betalactamasas y explotar vías de entrada y afinidades diferenciadas por las PBP's (271). De forma complementaria, Zhang et al. estudiaron 15 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* XDR resistentes a ceftazidima/avibactam en su mayoría no productores de MBL, caracterizados mediante WGS para identificar los mecanismos de resistencia (disminución de OprD, sobreexpresión/mutación de AmpC y sobreexpresión de bombas de eflujo). Sobre esta base, evaluaron la sinergia de CZA con varios agentes antipseudomonas y concluyeron que la combinación más prometedora era CZA–IPM con una disminución media de 16.6 veces en la MIC de CZA y sinergia en el análisis de los datos obtenidos por el método de tablero y curvas de crecimiento. La microscopía electrónica mostró daños estructurales más marcados con la combinación que con cualquiera de los fármacos por separado, lo que sugiere un efecto complementario sobre la pared y la membrana. Este estudio es de especial importancia dado que vincula directamente el perfil genómico de resistencia con la elección racional de la combinación, aunque el número de aislamientos sea pequeño y la evaluación esté limitada a ensayos *in vitro* (270).

En términos de nuevas combinaciones dirigidas a otros patógenos pero con aplicaciones para *P. aeruginosa*, Fouad *et al.* analizaron sulbactam–durlobactam, un inhibidor potente de β -lactamasas de clases A, C y D diseñado para *A. baumannii*, en combinación con cefepime frente a 14 aislamientos cefepime-resistentes. Mediante ensayos de time-kill a concentraciones que simulan exposiciones clínicas, observaron sinergia en todos los aislamientos de *P. aeruginosa*, sin antagonismo en ninguna de las especies evaluadas. Aunque el trabajo no está centrado en *P. aeruginosa*, éste muestra cómo combinaciones diseñadas para un patógeno prioritario pueden tener beneficios colaterales en otros bacilos Gramnegativos y refuerza la importancia de estudiar la sinergia a concentraciones farmacodinámicamente relevantes (272).

A nivel clínico, la evidencia sobre combinaciones en infecciones reales por bacilos Gramnegativos resistentes es más heterogénea. Zheng *et al.* reportaron una serie de 31 pacientes con infecciones por bacilos Gramnegativos resistentes a los carbapenémicos tratados con ceftazidima/avibactam más colistina; sólo una minoría correspondía a *P. aeruginosa*, predominando *K. pneumoniae* y *A. baumannii*. La mortalidad a 30 días fue del 29 % y la tasa de aclaramiento microbiológico a los siete días fue de 64,5 %, con nefrotoxicidad en un número no despreciable de pacientes. Al carecer de un grupo comparador con monoterapia, este estudio sugiere que la combinación puede ser una opción viable, pero no permite concluir si realmente mejora el pronóstico frente a esquemas alternativos (273). De forma más robusta, el ensayo OVERCOME (colistina vs colistina–meropenem) incluyó pacientes con neumonía o bacteriemia por *P. aeruginosa* XDR, *A. baumannii* XDR y CRE, y demostró que la combinación no fue superior a la monoterapia con colistina en términos de mortalidad a 28 días, fracaso clínico o aclaramiento microbiológico, esto implica que muchas veces la sinergia *in vitro* no siempre se relaciona con un beneficio en un contexto clínico (274).

Desde un punto de vista global, Aslan *et al.* realizaron una revisión exhaustiva de estudios *in vitro*, *in vivo* y clínicos que comparan ceftazidima/avibactam en monoterapia frente a combinaciones que lo incluyen tanto en CRE como en *P. aeruginosa* MDR, mostrando que existe sinergia *in vitro* bien documentada entre CZA y ATM frente a productores de MBL, así como sinergia en algunos casos con amikacina, meropenem, fosfomicina y

polimixinas; sin embargo, los estudios clínicos no han demostrado de forma consistente un beneficio en mortalidad, curación clínica o prevención de la aparición de resistencia al utilizar combinaciones en lugar de la monoterapia con CZA. Además, las combinaciones se asocian con mayor toxicidad (por ejemplo, nefrotoxicidad cuando se utilizan polimixinas) y mayor costo. En *P. aeruginosa* MDR, los datos clínicos son todavía más escasos, por lo que la ventaja del uso de combinaciones sigue siendo un tema que necesita demostrarse (265).

Varios estudios *in vitro* han utilizado combinaciones clásicas en *P. aeruginosa*, generalmente en modelos de células planctónicas, como el de Nazli *et al.* en el cual se evaluaron 60 aislamientos clínicos, de los cuales el 26,7 % eran MDR, frente a combinaciones de ceftazidima o imipenem con amikacina, levofloxacino y colistina utilizando tiras de gradiente (E-test modificado) y el índice de concentración inhibitoria fraccionaria (FIC) como criterio de sinergia. Todos los aislamientos fueron susceptibles a colistina, pero la sinergia fue limitada: únicamente la combinación CAZ-AN mostró sinergia en el 15 % de las cepas, sin antagonismo en ninguna combinación. Esto demuestra el hecho de que a pesar de que los resultados *in vitro* presenten sinergia, en el ámbito clínico, muchas combinaciones se comportan como efectos de adición o indiferencia (275).

Por otro lado Ma *et al.* se enfocaron en seis aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos (CRPA), todos resistentes al menos a tres clases de antimicrobianos y con sensibilidad casi exclusivamente a colistina. Utilizando métodos de microdilución y tablero con FIC, evaluaron múltiples combinaciones recomendadas para el manejo de Gramnegativos XDR. Encontraron proporciones muy elevadas de sinergia cuando se combinaban dos betalactámicos antipseudomonas (ceftazidima-cefoperazona/sulbactam con 100 % de sinergia, ceftazidima-piperacilina/tazobactam con 50 % y ceftazidima-aztreonam con 33,3 %), así como sinergia relevante en combinaciones de meropenem o cefoperazona/sulbactam con amikacina. Aunque el número de cepas es muy reducido, y la definición de CRPA se basa en criterios de sensibilidad sin caracterización molecular, destacan los casos de cepas con múltiples mecanismos enzimáticos y de permeabilidad, la

combinación de dos betalactámicos con diferentes afinidades por PBPs y distinto impacto frente a AmpC en donde puede recuperarse parcialmente la actividad (276).

Sin embargo, estudios más amplios, como el de Chen *et al.*, evaluaron 100 aislamientos consecutivos de *P. aeruginosa* de un hospital de Taiwán frente a nueve combinaciones diferentes de β -lactámicos, aminoglucósidos y ciprofloxacino mediante técnica de tablero y cálculo de FIC. La prevalencia de resistencia a agentes individuales fue elevada, reflejando un entorno con alta presión antimicrobiana. Piperacilina más amikacina mostró la mayor frecuencia de sinergia (59 %), seguida de combinaciones de amikacina con cefepima o aztreonam, mientras que los esquemas que incluían ciprofloxacino presentaron poca o nula sinergia. Un hallazgo relevante es que, incluso entre cepas resistentes a piperacilina, la combinación piperacilina–amikacina conservó sinergia, lo que refuerza la idea de que un aminoglucósido puede compensar parcialmente los mecanismos de resistencia dirigidos principalmente contra los betalactámicos. No obstante, el estudio carece de información sobre mecanismos específicos (presencia de MBL, niveles de AmpC o mutaciones en OprD), de modo que la interpretación de los mecanismos mediante los cuales se genera sinergia entre combinaciones se mantiene en un plano teórico (277).

Por su parte, Dundar y Otkun analizaron 25 aislamientos clínicos (12 MDR y 13 susceptibles) y compararon el comportamiento de varias combinaciones clásicas (ceftazidima–tobramicina, piperacilina/tazobactam–tobramicina, imipenem–tobramicina, imipenem–isepamicina, imipenem–ciprofloxacino y ciprofloxacino–tobramicina) mediante el método de tablero. En las cepas MDR, las tasas de sinergia fueron especialmente altas para ceftazidima–tobramicina (67 %) y piperacilina/tazobactam–tobramicina (50 %), sin antagonismo. En cepas susceptibles, las mismas combinaciones mantuvieron sinergia, aunque con porcentajes menores. Un punto a destacar es que muchas de las concentraciones que llevaron a FIC sinérgicas se sitúan por encima de las concentraciones plasmáticas alcanzables en el ámbito clínico, lo que remarca la falta de estudios que demuestren una relación entre la sinergia *in vitro* y la viabilidad clínica (278).

Más recientemente, se ha puesto atención en el impacto de las combinaciones sobre la biopelícula, un fenotipo particularmente relevante en infecciones respiratorias crónicas por *P. aeruginosa* y en pacientes con dispositivos médicos. Ghorbani et al. estudiaron 36

aislamientos clínicos, de los cuales 58,3 % eran MDR, determinaron el perfil de sensibilidad por difusión en disco, identificaron productores de biopelícula mediante ensayos en microplacas, y evaluaron la sinergia de varias combinaciones mediante tablero y FIC tanto en células planctónicas como en biopelícula. Encontraron altos niveles de resistencia frente a la mayoría de los antibióticos, con buena actividad conservada para colistina y polimixina, y documentaron sinergia frecuente para amikacina–ceftazidima, tobramicina–colistina y ceftazidima–colistina (55,6 %, 58,3 % y 52,8 % de los aislados, respectivamente). A su vez, la combinación tobramicina–claritromicina mostró un efecto sinérgico notable frente a biopelícula, aunque a concentraciones de claritromicina muy elevadas (256–512 µg/mL), difíciles de alcanzar de manera segura en pacientes (279).

Finalmente, el trabajo de Barbosa et al. introduce un componente evolutivo clave: mediante más de 1,600 experimentos de evolución con *P. aeruginosa* en entornos con monoterapia o combinaciones, se construyeron redes de eficacia de combinaciones de antibióticos (ACE) mostrando que las combinaciones que presentan sinergia incrementan la probabilidad de extinción de la población bacteriana, mientras que patrones de sensibilidad colateral entre fármacos reducen la velocidad de adaptación, sugiriendo que las mejores combinaciones no solo deben buscar sinergia, sino también limitar la capacidad evolutiva de la bacteria para generar resistencia a largo plazo, aspecto que raramente es considerado en la práctica clínica (266).

A pesar de que determinadas combinaciones muestran sinergia *in vitro*, el traslado de estos hallazgos al ámbito clínico sigue siendo limitada. Es por ello que la elección racional de combinaciones debería de considerar el perfil de resistencia predominante en las cepas circulantes y no basarse únicamente en combinaciones tradicionales que muestren sinergia (267).

2 JUSTIFICACIÓN

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista de alta relevancia clínica, caracterizado por su notable capacidad para desarrollar resistencia a múltiples agentes antimicrobianos y por la limitada disponibilidad de opciones terapéuticas efectivas, especialmente en aislamientos MDR, XDR y DTR. Ante este escenario, la evaluación de combinaciones de antimicrobianos de uso clínico representa una estrategia prometedora para potenciar la actividad antibacteriana, restaurar la eficacia de fármacos comprometidos por la resistencia y ampliar las alternativas terapéuticas disponibles para el tratamiento de infecciones causadas por este microorganismo.

3 HIPÓTESIS

Al menos una combinación de antimicrobianos de uso clínico actual presentará actividad sinérgica contra la biopelícula producida por *Pseudomonas aeruginosa*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto sinérgico de antimicrobianos en la biopelícula producida por *Pseudomonas aeruginosa*.

4.2 Objetivos específicos

1. Confirmar la identificación a nivel de especie de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Determinar el perfil de susceptibilidad a agentes antimicrobianos en células planctónicas de aislamientos de *P. aeruginosa*.
3. Evaluar la producción de biopelícula de los aislamientos de *P. aeruginosa*.
4. Determinar el perfil de susceptibilidad a antimicrobianos en células de biopelícula de *P. aeruginosa*.
5. Evaluar combinaciones de antimicrobianos sobre la biopelícula de *P. aeruginosa*.
6. Analizar el resistoma de los aislamientos mediante secuenciación del genoma completo.

5 MATERIAL Y MÉTODOS

La mayor parte del trabajo experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Laboratorios Especializados (CELAES) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina. Adicionalmente, parte de la metodología se desarrolló en el Instituto de Investigación Sanitaria de las Islas Baleares (IdISBa), en Palma de Mallorca, España.

5.1 Obtención de aislamientos

Para la realización del presente proyecto se emplearon aislamientos clínicos obtenidos en un trabajo previo (280). Dichos aislamientos fueron recolectados en un periodo comprendido de enero a agosto de 2021, en el contexto de la pandemia de COVID-19, y proceden de 23 centros participantes en la red temática de investigación y vigilancia de la farmacorresistencia (INVIFAR), conformada por 21 laboratorios hospitalarios y dos laboratorios externos.

De esta colección, se seleccionaron 48 aislamientos de *P.aeruginosa* caracterizados por su resistencia a carbapenémicos mediada por mecanismos no enzimáticos, confirmado mediante la ausencia de genes *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40} y *bla*_{OXA-58}.

5.2 Identificación de aislamientos

Para la identificación de los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, se obtuvo ADN total mediante el método de lisis térmica. Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación por PCR de un fragmento del gen *gyrB*, el cual codifica la subunidad β de la ADN girasa.

5.2.1 Extracción de ADN

La obtención de ADN se realizó a partir de cultivos puros de 18-24 horas en agar sangre. Se seleccionaron colonias aisladas y se suspendieron en 50 μ L de agua libre de nucleasas en microtubos estériles de 1.5 mL. La suspensión se homogeneizó mediante agitación en vórtex durante 10 segundos y posteriormente se sometió a lisis térmica a 95 °C durante 15 minutos. Después del tratamiento, las muestras se centrifugaron a 14,000

rpm durante 10 minutos, recuperándose 50 μ L del sobrenadante, los cuales fueron transferidos a microtubos de 0.6 mL estériles.

5.2.2 Identificación por PCR

La identificación de los aislamientos se llevó a cabo mediante una reacción de PCR punto final utilizando como molde el ADN obtenido previamente por lisis térmica. Para la amplificación se emplearon los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 5 (281).

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la identificación.

Primer	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplicón (pb)
gyrPA-398	CCT GAC CAT CCG TCG CCA CAA C	222
gyrPA-620	CGC AGC AGG ATG CCG ACG CC	

La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25 μ L, compuesta por: 0.5 μ L de ADN molde, 200 μ M de cada dNTP, buffer 1X (NH_4 1X, pH 8.8), 3 μ M de MgCl_2 , 0.1 μ M de cada oligonucleótido y 1 U de Taq polimerasa.

Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de: desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento a 62 °C por 30 segundos, y extensión a 72 °C por 30 segundos. Finalmente, se incluyó un paso de elongación final a 72 °C por 10 minutos.

5.2.3 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de amplificación obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, preparado con tampón TBE 0.5X y teñido previamente con GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, CA). Para la estimación del tamaño de los fragmentos amplificados se utilizó un marcador de peso molecular de 100 a 1,000 pb.

La visualización de las bandas se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm. Como control positivo de la amplificación se empleó la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853.

5.3 Determinación del perfil de susceptibilidad

El perfil de susceptibilidad de cada aislamiento se determinó mediante el método de microdilución en caldo, siguiendo las directrices establecidas en el documento CLSI M07 y considerando los puntos de corte descritos en el documento M100 (CLSI 2025) (282,283).

Para la preparación del inóculo, se partió de cultivos de 18 horas de crecimiento en agar Müeller-Hinton, incubados a 37 °C. De cada cultivo se seleccionaron colonias aisladas con morfología característica de *P. aeruginosa*, las cuales fueron suspendidas en solución salina al 0.85 %. La turbidez de la suspensión se ajustó a un intervalo de absorbancia de 0.08 a 0.13 a 625 nm, correspondiente al estándar 0.5 de la escala de McFarland. A partir de esta suspensión, se realizó una dilución 1:150 en caldo Müeller-Hinton, obteniendo una concentración final aproximada de 1×10^6 UFC/mL.

Para cada aislamiento, se emplearon placas estériles de 96 pocillos de fondo redondeado. Los antibióticos se prepararon en soluciones stock y se dispusieron en la primera columna de la placa. A partir de estas soluciones se realizaron diluciones seriadas 1:2, en un volumen de 100 µL por pocillo. Posteriormente, se adicionaron 100 µL del inóculo bacteriano a cada pocillo obteniendo una concentración final de 5×10^5 UFC/mL.

En cada ensayo se incluyó un control positivo de crecimiento (caldo con inóculo sin antibiótico) y un control negativo (caldo sin inóculo). Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 a 20 horas. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió como la concentración más baja de antibiótico que mostró inhibición completa del crecimiento visible.

La interpretación de los resultados y la clasificación de los aislamientos como sensibles, intermedios o resistentes se realizaron basándose en los puntos de corte dispuestos en el documento M100 (CLSI 2025) (283).

Tabla 6. Diseño de placa utilizada para evaluar el perfil de susceptibilidad.

CAZ µg/mL	FEP µg/mL	TM µg/mL	AN µg/mL	CIP µg/mL	LVX µg/mL	PB µg/mL	CL µg/mL	ATM µg/mL	IPM µg/mL	MEM µg/mL	Ctrl +
128	128	16	256	8	16	16	16	128	32	32	
64	64	8	128	4	8	8	8	64	16	16	
32	32	4	64	2	4	4	4	32	8	8	
16	16	2	32	1	2	2	2	16	4	4	
8	8	1	16	0.5	1	1	1	8	2	2	
4	4	0.5	8	0.25	0.5	0.5	0.5	4	1	1	
2	2	0.25	4	0.12	0.25	0.25	0.25	2	0.5	0.5	
1	1	0.125	2	0.06	0.125	0.125	0.125	1	0.25	0.25	Ctrl —

CAZ (Ceftazidima), FEP (Cefepime), TM (Tobramicina), AN (Amikacina), CIP (Ciprofloxacino), LVX (Levofloxacino), PB (Polimixina B), CL (Colistina), ATM (Aztreonam), IPM (Imipenem), MEM (Meropenem).

Tabla 7. Punto de corte para los antibióticos utilizados.

Antibiótico	Corte (µg/mL)
CAZ	≥32
FEP	≥32
TM	≥4
AN	≥64
CIP	≥2
LVX	≥4
PB	≥4
CL	≥4
ATM	≥32
IPM	≥8
MEM	≥8
FDC	≥2

5.3.1 Betalactámicos + inhibidores de betalactamasas

Para este ensayo, se utilizó el método de microdilución en caldo con algunas modificaciones. Los stocks de antibióticos se prepararon a 8X la concentración final, mientras que las soluciones de inhibidores de betalactamasas se ajustaron a una concentración de 16 µg/mL.

Cada pocillo de la placa se llenó inicialmente con 50 µL de caldo Müller-Hinton. Posteriormente, se adicionaron 50 µL del stock de antibiótico en el primer pocillo de cada fila, y se realizaron diluciones seriadas 1:2 a lo largo de la fila. Una vez completadas las diluciones, se agregaron 50 µL del inhibidor de betalactamasas a todos los pocillos.

Finalmente, se inocularon 100 µL de la suspensión bacteriana en cada pocillo (excepto en el control negativo). Se incluyó un control positivo de crecimiento (caldo con inóculo sin antibiótico ni inhibidor) y un control negativo (caldo sin inóculo). Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 a 20 horas, y la concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió como el pocillo con la menor concentración de antibiótico en combinación con el inhibidor que mostró inhibición completa del crecimiento.

Tabla 8. Diseño de placa utilizada para evaluar el perfil de susceptibilidad a betalactámicos + inhibidores de betalactamasas.

IMR µg/mL	CZA µg/mL	TZP µg/mL	CT µg/mL
32/4	64/4	256/4	64/4
16/4	32/4	128/4	32/4
8/4	16/4	64/4	16/4
4/4	8/4	32/4	8/4
2/4	4/4	16/4	4/4
1/4	2/4	8/4	2/4
0.5/4	1/4	4/4	1/4
0.25/4	0.5/4	2/4	0.5/4

IMR (Imipenem/Relebactam), CZA (Ceftazidima/Avibactam), TZP (Piperacilina/Tazobactam), CT (Ceftolozano/Tazobactam)

Tabla 9. Punto de corte para los antibióticos utilizados

Antibiótico	Corte ($\mu\text{g/mL}$)
IMR	≥ 8
CZA	≥ 16
TZP	≥ 64
CT	≥ 16

5.3.2 Cefiderocol

La determinación de la CMI de cefiderocol se realizó siguiendo las recomendaciones del documento CLSI M100 (283), considerando la necesidad de utilizar un medio con depleción de hierro para inducir la expresión de transportadores de hierro férrico (Fe^{3+}). Para ello, se preparó caldo Müller-Hinton ajustado con cationes y depletado de hierro (ID-CAMHB) de la siguiente manera: a 1 L de CAMHB estéril se adicionaron 100 g de resina Chelex® 100 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), manteniendo la suspensión bajo agitación durante 6 h a temperatura ambiente. Posteriormente, el medio se filtró con membranas de 0.2 μm (Vacuum filter, Biofil®) para eliminar la resina y se suplementó con CaCl_2 , MgCl_2 y ZnSO_4 a concentraciones finales de 22.5 $\mu\text{g/mL}$ (rango 20–25 $\mu\text{g/mL}$), 11.25 $\mu\text{g/mL}$ (rango 10–12.5 $\mu\text{g/mL}$) y 10 μM (0.56 $\mu\text{g/mL}$; rango 0.5–1 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente. El pH final se ajustó entre 7.2–7.4 con HCl 0.1 M y se volvió a filtrar con membranas de 0.2 μm .

Para la preparación de las placas de microdilución (rango de concentración de cefiderocol: 16–0.03 $\mu\text{g/mL}$), todos los pozos fueron llenados con 100 μL de ID-CAMHB, excepto los de la última columna, que recibieron 200 μL y fueron utilizados como control negativo. La solución inicial de cefiderocol se preparó a 64 $\mu\text{g/mL}$ a partir de un stock de 10 mg/mL . El primer pozo de cada fila fue inoculado con 100 μL de esta solución, obteniendo una concentración final de 32 $\mu\text{g/mL}$. A continuación, se realizaron diluciones seriadas al transferir 100 μL de un pozo al siguiente, hasta el pozo 10, donde tras la mezcla se descartaron 100 μL para mantener un volumen final de 100 μL . Los dos últimos pozos de cada fila no fueron inoculados con antibiótico, destinándose a controles positivo y negativo.

El inóculo bacteriano se preparó ajustando la suspensión de la cepa a una turbidez equivalente a 0.5 de McFarland, empleando un fotómetro. Posteriormente, se inocularon 50 µL en 5 mL de ID-CAMHB, obteniendo una dilución 1:100. Con esta suspensión, se inocularon 100 µL en cada pozo (excepto el control negativo), mezclando con micropipeta multicanal. Las placas fueron selladas y posteriormente incubadas a 37 °C durante 16–20 h.

La CMI fue definida como la menor concentración de cefiderocol capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, considerando como criterio de inhibición un 80% de reducción del crecimiento en comparación con el control positivo o la ausencia de botón visible en el fondo del pozo. Las cepas utilizadas como control de calidad se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Cepas utilizadas como parte del control de calidad.

Antibiótico	Rango µg/mL	Cepa control
CAZ	1 — 4	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853
FEP	0.5 — 4	
CIP	0.12 — 1	
LVX	0.5 — 4	
ATM	2 — 8	
IPM	1 — 4	
MEM	0.12 — 1	
AN	1 — 4	
TOB	0.25 — 1	
CL	0.25 — 2	
PB	0.25 — 2	
FDC	0.06 — 0.5	
CZA	0.25/4 — 2/4	
CT	0.5/4 — 2/4	
TZP	8/4 — 32/4	
IMR	0.03/4 — 0.25/4	<i>K. pneumoniae</i> ATCC® BAA-1705 TM

5.4 Búsqueda de carbapenemasas

La detección fenotípica de carbapenemasas se realizó mediante la prueba Carba NP (283). Esta prueba se realizó a los 38 aislamientos que presentaron resistencia a al menos uno de los 2 carbapenémicos evaluados.

Para cada cepa a evaluar, se prepararon tres tubos estériles identificados como control interno (tubo A), problema (tubo B) y EDTA (tubo C). Se añadieron 300 µL del reactivo C (buffer de lisis) al tubo A y, posteriormente, se suspendió una asada de la cepa a estudiar en el mismo tubo. La suspensión se agitó brevemente en vortex para homogenizar y se transfirieron 100 µL de esta suspensión al Tubo B y C.

A continuación, se adicionaron 100 µL de reactivo A (solución con indicador) al tubo A, 100 µL de reactivo B (solución con indicador e imipenem a 6 µg/mL) al tubo B y 100 µL de reactivo C (solución indicadora, imipenem a 6 µg/mL y EDTA) al tubo C agitando en vortex después de cada adición. Ambos tubos se incubaron a 37 °C y se revisaron cada 30 minutos durante un periodo máximo de dos horas para detectar cambios de color. La interpretación se basó en la comparación del color entre ambos tubos siendo una coloración amarilla considerada como positiva. En cada corrida se incluyó la cepa *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 como control positivo y la cepa de *E. coli* ATCC 25922 como control negativo.

5.5 Evaluación de la producción de biopelícula

La capacidad de formación de biopelícula de cada aislamiento de *P. aeruginosa* fue evaluada mediante tinción con cristal violeta (284). Los aislamientos fueron reactivados en agar sangre y posteriormente sembrados en agar soya tripticaseína (AST) suplementado con 0.5% de glucosa. A partir de estas colonias, se preparó un inóculo en 5 mL de solución salina estéril, ajustado a una absorbancia entre 0.08 y 0.13 a 625 nm.

Del inóculo previamente ajustado, se realizó una dilución 1:150 en caldo soya tripticaseína (CST) suplementado con 0.5% de glucosa, la cual fue utilizada para la inoculación de las microplacas. En cada aislamiento se dispusieron por triplicado 200 µL en pocillos de placas estériles de fondo plano, además de incluir tres pocillos con CST suplementado estéril como blancos negativos.

Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Posteriormente, se decantó el contenido de los pocillos y se realizaron tres lavados con 200 µL de buffer de fosfatos estéril (PBS). Una vez secas, las placas fueron teñidas con 200 µL de cristal violeta al 0.1% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la tinción, se efectuaron nuevamente tres lavados con PBS estéril para eliminar el exceso de cristal violeta.

Finalmente, la densidad óptica (DO) se midió a 590 nm en un lector de microplacas, para ello la biopelícula se solubilizó con 200 µL de ácido acético al 33% durante 60 minutos. La capacidad de formación de biopelícula se clasificó de acuerdo con los criterios (ver tabla #11) donde el valor de corte (DOc) correspondió a la media del control negativo más tres veces su desviación estándar (285).

Tabla 11. Criterios para la clasificación en función de la producción de biopelícula.

Clasificación	Valor de corte
No productor	$DO \leq DOc$
Productor débil	$DOc < DO \leq 2 \times DOc$
Productor moderado	$2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$
Productor fuerte	$DO > 4 \times DOc$

5.6 Determinación del perfil de susceptibilidad en biopelícula

Para evaluar la susceptibilidad de los aislamientos sobre biopelícula se empleó el *Calgary Biofilm Device*, el cual consiste en una placa de 96 pocillos con una tapa que contiene puntas de poliestireno, sobre los cuales se forma la biopelícula (286).

Los aislamientos fueron reactivados en agar sangre y resembrados en AST suplementado con 0.5% de glucosa. Colonias aisladas se suspendieron en 5 mL de solución salina estéril y se ajustó a una absorbancia de 0.08–0.13 a 625 nm. A partir de esta suspensión se realizó una dilución 1:150 en CST suplementado con 0.5% de glucosa (equivalente aproximadamente a 1×10^6 UFC/mL). En una placa de 96 pozos estéril de fondo plano se depositaron 200 µL de esta dilución por pozo y sobre ella se acopló la tapa del CBD con puntas estériles. Las placas con el dispositivo se incubaron a 37 °C durante 48 h para permitir la formación de biopelícula sobre las puntas. Simultáneamente, se prepararon las placas de dilución, siguiendo la metodología de microdilución descrita anteriormente.

Tras las 48 h de formación, la tapa con las puntas se retiró cuidadosamente y se enjuagó sumergiéndola en una placa con 200 μ L de PBS estéril para eliminar células planctónicas adheridas superficialmente. A continuación, la tapa se montó sobre la placa con las diluciones seriadas de antibióticos y se incubó 16-20 horas a 37 °C bajo las mismas condiciones.

Transcurrido el tiempo de incubación las placas se leyeron y se determinó la concentración mínima inhibitoria de biofilm, por sus siglas en inglés (MBIC), como la menor concentración de antibiótico que impidió el crecimiento tras el período de incubación.

5.7 Evaluación de combinaciones sobre la biopelícula

La evaluación de sinergia entre combinaciones de antimicrobianos sobre biopelícula se llevó a cabo utilizando el Calgary Biofilm Device (CBD), siguiendo lo descrito por Bellio et al. y las directrices del documento M100 del CLSI (287). El procedimiento se dividió en dos fases: formación de biopelícula y exposición a las combinaciones antimicrobianas.

En la primera fase, los aislamientos fueron reactivados en agar sangre y posteriormente resembrados en AST suplementado con 0.5 % de glucosa. Colonias aisladas se suspendieron en 5 mL de solución salina estéril ajustando a una absorbancia de 0.08–0.13 a 625 nm. A partir de esta suspensión se realizó una dilución 1:150 en caldo ST con 0.5 % de glucosa, equivalente a aproximadamente 1×10^6 UFC/mL. De esta dilución se pipetearon 200 μ L en cada pocillo de una microplaca estéril de fondo plano y sobre ella se acopló la tapa del CBD con puntas de poliestireno. Las placas se incubaron a 37 °C durante 48 h para permitir la formación de biopelícula sobre las puntas. Transcurrido este periodo, la tapa con las puntas se retiró cuidadosamente y se enjuagó en PBS estéril para remover células planctónicas.

En la segunda fase, se prepararon las placas de combinaciones antibióticas mediante el método de tablero (*checkerboard*). Para el fármaco A (SA), se preparó una solución stock en CAMHB, cuatro veces más concentrada que la concentración más elevada a probar, dispensando 100 μ L en los pocillos A1–A11, mientras que en el pocillo A12 se colocaron 100 μ L de 2XSA (ocho veces más concentrada). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas 1:2 desde la hilera A hasta la G.

De manera análoga, para el fármaco B (SB) se preparó una solución stock en CAMHB, cuatro veces más concentrada que la concentración máxima a evaluar, dispensando 100 µL en la columna 12 y realizando diluciones seriadas 1:2 hasta la columna 2. Al tratarse de combinaciones con inhibidores de betalactamasas, se añadió un paso extra: al final de la preparación, se incorporaron 100 µL del inhibidor a una concentración de 8 µg/mL en todos los pocillos.

En lugar de inocular con un cultivo en suspensión, las tapas del CBD con biopelículas preformadas fueron colocadas directamente sobre la placa con las combinaciones de antibióticos. Las placas se incubaron a 37 °C durante 18–20 h. Finalizado el tiempo de incubación, se determinó la MBIC para cada fármaco y combinación, definida como la menor concentración en la que se redujo en un 80 % el crecimiento bacteriano. El crecimiento se evaluó mediante lectura de densidad óptica a 600 nm con un lector de microplacas, utilizando como referencia los controles de crecimiento y los pozos con reactivos sin inóculo con la siguiente formula:

$$\% \text{ Crecimiento} = \frac{DO \text{ de la combinación de fármacos en pocillo} - DO \text{ de fondo}}{DO \text{ del pocillo sin fármaco} - DO \text{ de fondo}} \times 100$$

La densidad óptica de fondo fue el valor de DO en donde no se apreció crecimiento alguno.

Para definir si las combinaciones presentaban algún efecto de sinergia, indiferencia o antagonismo se consideraron los criterios de la tabla 12. La FIC de cada combinación se obtuvo mediante las siguientes formulas:

$$FIC A = \frac{MIC \text{ fármaco A en combinación}}{MIC \text{ fármaco A solo}}$$

$$FIC B = \frac{MIC \text{ fármaco B en combinación}}{MIC \text{ fármaco B solo}}$$

$$\Sigma FIC = FIC A + FIC B$$

Tabla 12. Criterios para definir efecto de combinaciones.

Criterio	Valor
Sinergia	$\sum \text{FIC} \leq 0.5$
Indiferencia	$0.5 < \sum \text{FIC} \leq 4$
Antagonismo	$\sum \text{FIC} > 4$

5.8 Análisis estadístico

Para evaluar la asociación entre los productores fuertes de biopelícula y la resistencia a antimicrobianos se empleó la prueba de chi cuadrada; por otra parte, para comparar las CMI obtenidas en condiciones planctónicas y en biopelícula se utilizó la prueba t de Student. El análisis estadístico se realizó utilizando el software IBM SPSS Statistics versión 29 (IBM Corporation, Somers, NY). Para todas las pruebas estadísticas, un valor de $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

5.9 Secuenciación del genoma completo

La secuenciación del genoma completo se obtuvo utilizando la tecnología de secuenciación La secuenciación del genoma completo se realizó mediante la tecnología de secuenciación de Illumina®, basada en síntesis, generando lecturas pareadas de 150 pares de bases (2×150 pb)

5.9.1 Extracción de ADN y comprobación de pureza

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el kit *High Pure PCR Template Preparation* (Roche®), siguiendo las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones. Brevemente, se preparó una suspensión bacteriana en 200 μL de solución salina estéril en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Posteriormente, se añadieron 5 μL de lisozima (10 mg/mL en Tris-HCl 10 mM, pH 8.0) y la mezcla se incubó durante 15 min a 37 °C en bloque térmico. Se incorporaron 200 μL de *Binding Buffer* y 40 μL de Proteinasa K previamente reconstituida, mezclando inmediatamente mediante pipeteo,

seguido de una incubación de 10 min a 70 °C. A continuación, se añadieron 100 µL de isopropanol y se homogeneizó por vortex.

La mezcla se transfirió a un *High Pure Filter Tube* acoplado a un tubo de recolección y se centrifugó 1 min a 8,000 g, desechando posteriormente el tubo de recolección. El filtro se colocó en un nuevo tubo de recolección, al que se añadieron 500 µL de *Inhibitor Removal Buffer*, seguido de centrifugación 1 min a 8,000 g. El proceso se repitió con 500 µL de *Wash Buffer* en dos ocasiones consecutivas, cada una con centrifugación de 1 min a 8,000 g. Posteriormente, el filtro se centrifugó durante 10 s a la máxima velocidad de la microcentrífuga para eliminar residuos líquidos.

Finalmente, el tubo de filtración se colocó en un tubo estéril de 1.5 mL, se añadieron 50 µL de agua estéril, y se centrifugó 1 min a 8,000 g para recuperar el ADN genómico, el cual fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

El rendimiento y la calidad del ADN genómico obtenido se evaluaron mediante espectrofotometría en un *NanoDrop™ One* (Thermo Scientific). Previamente, el pedestal de medición se limpió aplicando 5 µL de agua estéril sobre el pedestal inferior, formando una columna líquida al descender el brazo superior y dejándola reposar por 2–3 min. Posteriormente, se retiró el exceso de líquido con un papel libre de pelusa.

La medición se realizó seleccionando en la pantalla de inicio la opción de ácidos nucleicos en modo “ADNbc”. Para el ajuste en blanco, se colocaron 1.5 µL de agua estéril sobre el pedestal inferior, se bajó el brazo y se realizó la medida con la función de blanco. Una vez completada la lectura, se limpió nuevamente el equipo y se aplicaron 1.5 µL de la muestra de ADN sobre el pedestal inferior. Se bajó el brazo superior y se procedió a medir la muestra para obtener la absorbancia y los valores de concentración y pureza.

Tras cada lectura, los pedestales se limpiaron cuidadosamente y se repitió el procedimiento para las siguientes muestras. Los parámetros de calidad para las extracciones se muestran en la tabla #13.

Tabla 13. Parámetros de calidad para el ADN extraído.

Característica	Rango aceptable
Concentración de ADN	>20 ng/ μ L
Relación A 260/280	1.8 — 2
Relación A 260/230	2 — 2.2

5.9.2 Preparación de librerías

Para la preparación de bibliotecas se empleó el kit *Illumina DNA Prep* (Illumina®), siguiendo las indicaciones del fabricante.

5.9.2.1 Medición y ajuste de ADN bicatenario (QUBIT)

El primer paso en la preparación de bibliotecas consistió en medir y ajustar la cantidad inicial de ADN genómico de doble cadena (dsDNA) mediante un método fluorométrico. Para ello se utilizó el fluorómetro *Qubit™* (ThermoFisher Scientific®) junto con el kit *Qubit™ IX dsDNA HS Assay* (Q33231, Invitrogen™). El kit *Illumina DNA Prep* requiere cantidades de ADN entre 1 y 500 ng; en esta etapa, el ADN se ajustó a una concentración final de 3.5–15 ng/ μ L en Tris 10 mM (pH 8.5), con un volumen superior a 30 μ L.

Previo a la cuantificación, los reactivos del kit *Qubit™ IX dsDNA HS* se dejaron equilibrar a temperatura ambiente. Posteriormente, se calibró el fluorómetro mediante la preparación de los estándares #1 (0 ng/ μ L de dsDNA) y #2 (10 ng/ μ L de ADNbc), para lo cual se mezclaron 10 μ L de cada estándar con 190 μ L de la solución de trabajo en tubos específicos de *Qubit™*, se agitaron en vortex durante 3–5 s y se incubaron durante 2 min a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Una vez colocados en el equipo, se seleccionó el ensayo correspondiente (ADNbc) y se leyeron.

Para la medición de las muestras, se mezclaron 10 μ L de ADN con 190 μ L de solución de trabajo en tubos de *Qubit™*, agitando 3–5 s en vortex e incubando durante 2 min a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Posteriormente, se leyeron las muestras, especificando el volumen de esta y las unidades de concentración deseadas. En los casos

en los que la concentración inicial se encontraba fuera del rango de detección, se realizó una dilución 1:20 del ADN extraído con agua estéril o Tris-HCl 10 Mm (pH 8.0).

5.9.2.2 Fragmentación y etiquetado de ADNg

Las muestras de ADN genómico previamente ajustadas fueron fragmentadas y simultáneamente marcadas con los adaptadores necesarios para el multiplexado. Para ello, los reactivos se atemperaron durante 30 min a temperatura ambiente y se preparó la mezcla de tagmentación mediante la adición de 11 μ L de BLT (*bead-linked transposomes*) previamente vortexados y 11 μ L de TB1 (*tagment buffer*) por muestra. De esta mezcla, se dispensaron 20 μ L en cada pocillo de una placa estéril de PCR de 96 pozos, que contenían 30 μ L de ADN ajustado. Las soluciones se mezclaron por pipeteo y se centrifugaron brevemente.

La placa se colocó en el termociclador programado con el protocolo TAG (55 °C por 15 min, con la tapa a 100 °C, seguido de enfriamiento a 10 °C). Finalizado este paso, se añadieron 10 μ L de TSB (*tagmentation stop buffer*) a cada pocillo para detener la reacción, resuspendiendo cuidadosamente las perlas magnéticas mediante pipeteo lento. Posteriormente, la placa se sometió al programa PTC (37 °C por 15 min, con tapa a 100 °C, seguido de enfriamiento a 10 °C).

Al finalizar, el contenido de cada pocillo se transfirió a una placa estéril de 96 pocillos compatible con el soporte magnético. La placa se colocó sobre el imán hasta que el sobrenadante se aclaró y fue retirado cuidadosamente sin mover las perlas magnéticas. Estas perlas, que contenían el ADN tagmentado, se lavaron dos veces con 100 μ L de TWB (*tagment wash buffer*). En cada lavado, las perlas se resuspendieron lentamente por pipeteo, se colocó nuevamente la placa en el soporte magnético y, una vez aclarado el sobrenadante, este se descartó. Tras el segundo lavado, la placa permaneció sobre el imán sin retirar el sobrenadante, ya que la presencia de TWB previno la desecación de las perlas magnéticas hasta el siguiente paso del protocolo.

5.9.2.3 Multiplexado del ADN etiquetado

En esta etapa se incorporaron combinaciones únicas de adaptadores de índice para el multiplexado de las muestras de ADN tagmentado.

Los reactivos de la mezcla maestra de PCR (EPM) se descongelaron sobre hielo y se homogenizaron por inversión. Posteriormente, se preparó la mezcla maestra con 22 μL de EPM y 22 μL de agua libre de nucleasas por muestra. Tras una centrifugación breve, se retiró el sobrenadante de las perlas magnéticas contenidas en la placa de PCR y se añadieron 40 μL de la mezcla de PCR preparada a cada pocillo. Las perlas se resuspendieron cuidadosamente por pipeteo y se añadieron 10 μL de los adaptadores *Illumina Unique Dual Index* correspondientes a cada muestra. Las soluciones se mezclaron por pipeteo y la placa se centrifugó brevemente antes de iniciar la amplificación en el termociclador, utilizando el siguiente programa:

Tabla 14. Programa para BLT PCR.

68°C	3 min
98°C	3 min
98°C	5 ciclos
62°C	
68°C	
68°C	1 min
4-10°C	Mantener

Posteriormente, los productos de amplificación se purificaron mediante las perlas magnéticas (*Sample Purification Beads, SPB*), lo que además permitió la selección del tamaño de los fragmentos de ADN. Para ello, los reactivos SPB se equilibraron 30 min a temperatura ambiente y se preparó etanol al 80%. El contenido de cada pocillo se transfirió a una nueva placa estéril y se colocó en el soporte magnético hasta que el sobrenadante se aclaró. De cada muestra, se recuperaron 45 μL del sobrenadante, que se mezclaron con 40 μL de agua libre de nucleasas y 45 μL de SPB, incubando 5 min a temperatura ambiente. Tras separación magnética, se recogieron 125 μL del sobrenadante y se transfirieron a nuevos pocillos que contenían 15 μL de SPB, incubando nuevamente por 5 min.

Después de la separación en el soporte magnético, el sobrenadante fue descartado y las perlas se lavaron dos veces con 200 μL de etanol al 80% fresco, incubando 30 s en cada lavado. Finalmente, se dejaron secar las perlas durante 5 min en el soporte magnético para eliminar residuos de etanol. Las perlas se resuspendieron en 32 μL de RSB (*Resuspension Sample Buffer*), incubando 2 min a temperatura ambiente. Tras la separación magnética, se recuperaron 30 μL del sobrenadante, que contenían las bibliotecas de ADN fragmentado y etiquetado.

5.9.3 Cuantificación, normalización y agrupación de librerías

Con el fin de obtener una densidad óptima de clústeres y asegurar una cobertura uniforme de todas las muestras, las bibliotecas individuales fueron cuantificadas y normalizadas antes de su agrupamiento. Cada biblioteca fue ajustada a una concentración final de 1.5 nM, equivalente a 0.5 ng/ μL para fragmentos de aproximadamente 550 pb, tamaño estimado mediante el equipo 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). La conversión de nM a ng/ μL se realizó aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{concentración } \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}}{600 \frac{\text{g}}{\text{mol}} * \text{Tamaño promedio de librería}} * 10^6 = \text{Concentración nM}$$

La cuantificación de las bibliotecas se efectuó con el equipo Qubit™ Fluorometer utilizando el kit Qubit™ 1X dsDNA HS. Inicialmente, los reactivos fueron equilibrados a temperatura ambiente y el fluorómetro fue calibrado mediante la preparación de los estándares 1 y 2, adicionando 10 μL de cada uno a 190 μL de *Working Solution* en tubos Qubit™. Las soluciones se mezclaron por vortex durante 3–5 segundos, se incubaron a temperatura ambiente por 2 minutos, protegidas de la luz, y posteriormente se registraron las lecturas bajo el modo ADNbc.

Una vez calibrado el equipo, las bibliotecas fueron medidas añadiendo 5 μL de ADN diluido a 195 μL de *Working Solution* en tubos Qubit™, realizando vortex durante 3–5 segundos y dejando incubar a temperatura ambiente por 2 minutos en condiciones de oscuridad. Finalmente, las bibliotecas se ajustaron a una concentración de 0.5 ng/ μL y se

mezclaron en volúmenes equimolares (20 μ L por biblioteca) en un tubo estéril de 1.5 mL. La concentración del pool final se verificó nuevamente, confirmando el valor de 0.5 ng/ μ L (1.5 nM).

5.9.4 Secuenciación de ADN

5.9.4.1 Desnaturalización de librerías y carga de muestras en Novaseq 6000 ®

Previo a la introducción del pool en el secuenciador, las bibliotecas agrupadas fueron desnaturalizadas con NaOH. Para ello se preparó una dilución de NaOH 0.2 N, se descongeló el reactivo de hibridación HT1 en hielo y se templó el cartucho de reactivos. En un tubo estéril de 1.5 mL se mezclaron 100 μ L de la biblioteca ajustada a 0.5 ng/ μ L con 25 μ L de NaOH 0.2 N recién preparado, agitando brevemente por vortex y centrifugando suavemente. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y se añadieron 990 μ L de HT1 previamente atemperado. La preparación se mantuvo en hielo hasta su carga en el secuenciador. Finalmente, la corrida de secuenciación se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del sistema del equipo.

5.9.4.2 Evaluación de la calidad de la secuenciación

Al concluir la corrida de secuenciación, el desempeño del análisis fue evaluado mediante diferentes métricas de control de calidad, siendo el más relevante el parámetro %Q30, que representa el porcentaje de bases con un puntaje de calidad igual o superior a 30, cuyo valor esperado es mayor al 70%.

5.10 Análisis del resistoma de *P. aeruginosa*

5.10.1 Descompresión de archivos

La secuenciación tipo paired-end genera dos archivos por muestra en formato fastq.gz (R1.fastq.gz y R2.fastq.gz). Por ello lo primero que se realizó fue descomprimir los archivos en formato fastq.gz

5.10.2 Evaluación de la calidad de lecturas

Una vez descomprimidas, la calidad de las lecturas se evaluó utilizando FastQC.

5.10.3 Recorte de lecturas

Aunque los secuenciadores IlluminaNovaSeq® realizan una limpieza inicial del índice y los adaptadores, generalmente es necesario realizar un recorte adicional para eliminar fragmentos de baja calidad. Para ello, se utilizó la herramienta Trimmomatic, aplicando los siguientes parámetros como: LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:30 MINLEN:36. Una vez realizado el recorte, se volvió a ejecutar FastQC con el fin de comparar las métricas de calidad antes y después del procesamiento (288).

5.10.4 Ensamble de genomas *de novo*

Se realizó un ensamblado *de novo* utilizando la herramienta SPAdes. El resultado del ensamblado se obtuvo en el archivo contigs.fasta, que contiene los fragmentos genómicos (contigs) de distintas longitudes (289).

5.10.5 Resistoma adquirido

El ensamblado *de novo* se utilizó para la detección de determinantes de resistencia adquiridos por transferencia horizontal. Para ello, se empleó ResFinder, la cual identifica genes de resistencia basándose en bases de datos especializadas. Los resultados fueron revisados para distinguir entre genes de resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* (por ejemplo, *blaPAO*, que codifica la cefalosporinasa AmpC) y aquellos adquiridos.

5.10.6 Resistoma por mutaciones

El análisis del resistoma mutacional se llevó a cabo mediante alineamiento de las lecturas procesadas frente al genoma de referencia PAO1 (NC_002516.2), cuyo conjunto de genes relacionados con resistencia se encuentra ampliamente caracterizado. El alineamiento y la detección de variantes (variant calling) se realizaron con el programa Snippy, el cual genera un archivo snps.vcf que contiene las mutaciones y pequeñas inserciones/deleciones (SNPs e InDels) en comparación con la cepa de referencia. Las mutaciones detectadas se registraron para los principales genes asociados a resistencia cromosómica en *P. aeruginosa*, incluyendo *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *mexR*, *oprD*, *ampC*, *ampR*, *dacB*, *nalC*, *nalD*, *mexZ*, entre otros.

5.10.7 Estudio de OprD

El análisis se realizó mediante la herramienta BLAST, registrando las variaciones (SNPs e InDels) detectadas utilizando la referencia más adecuada entre las cepas PAO1, LESB58, UCBP-PA14, MTB-1, FRD1 o F23197.

5.10.8 Búsqueda de grandes deleciones cromosómicas

La detección de estas deleciones se realizó mediante la herramienta SeqMonk, utilizando los archivos generados por Snippy (BED, BAM o GFF). Se cargó el genoma de referencia PAO1 y las anotaciones correspondientes para visualizar y verificar la presencia de regiones ausentes en el genoma analizado.

5.10.9 Tipificación de secuencias multilocus (MLST)

La tipificación de secuencias multilocus (MLST) se realizó a partir de los genomas ensamblados utilizando la herramienta MLST 2.0 disponible en el Center for Genomic Epidemiology (CGE). Esta metodología permite la asignación de secuencias tipo (*sequence types*, STs) mediante la identificación y comparación de alelos de un conjunto de genes constitutivos altamente conservados(290).

Para *P. aeruginosa*, el esquema de MLST se basa en la secuenciación de fragmentos internos de siete genes housekeeping: *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* y *trpE*. Cada alelo identificado para estos genes fue comparado con la base de datos de referencia del esquema MLST, asignándose un número alélico específico. La combinación única de los siete números alélicos permitió determinar la secuencia tipo correspondiente a cada aislamiento.

5.11 Disposición de residuos

La disposición de los residuos generados durante el manejo de aislamientos clínicos de, así como de los materiales contaminados derivados de los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana, producción de biopelícula y pruebas de sinergia, se llevó a cabo conforme a los lineamientos establecidos por el Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

6 RESULTADOS

6.1 Aislamientos

Se procesaron un total de 63 aislamientos recolectados en un periodo comprendido de enero a agosto de 2021, procedentes de 23 centros participantes de la red de INVIFAR. Del conjunto de aislamientos, 49 (77.8%) fueron confirmados como *P. aeruginosa* por medio de la amplificación de un fragmento del gen *gyrB*.

6.2 Perfil de susceptibilidad.

El análisis de susceptibilidad en células planctónicas mostró una alta proporción de resistencia (>70 %) a aztreonam, levofloxacino y piperacilina/tazobactam. En contraste, se observaron porcentajes menores al 50 % frente a ceftazidima, cefepima, tobramicina, amikacina, ciprofloxacino, polimixina B y colistina. En cuanto a agentes de última generación, se detectó resistencia a ceftazidima/avibactam (26.3 %), ceftolozano/tazobactam (26.3 %), imipenem/relebactam (39.5 %) y cefiderocol (7.89%). Además, se encontró resistencia en al menos un carbapenémico en 38 (77.6%) de los aislamientos iniciales. Los resultados para cada antibiótico se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Susceptibilidad global de los aislamientos.

Antibiótico	CMI ₅₀ µg/mL	CMI ₉₀ µg/mL	Resistente n (%)	Intermedio n (%)	Susceptible n (%)
CAZ	16	128	15 (39.47)	8 (21.05)	15 (39.47)
FEP	8	64	8 (21.05)	3 (7.89)	27 (71.05)
TM	0.5	32	14 (36.84)	0 (0)	24 (63.16)
AN	1	64	5 (13.16)	2 (13.16)	31 (81.58)
CIP	0.5	16	18 (47.37)	0 (0)	20 (52.63)
LVX	12	32	28 (73.68)	6 (15.79)	6 (13.16)
PB	0.25	1	1 (2.63)	37 (97.37)	0 (0)
CL	0.25	1	1 (2.63)	37 (97.37)	0 (0)
ATM	64	128	31 (81.57)	4 (10.53)	3 (7.89)
MEM	16	32	32 (84.21)	3 (7.89)	3 (7.89)
IPM	32	64	38 (100)	0 (0)	0 (0)

TZP	64	256	27 (71.05)	2 (5.26)	9 (23.68)
CT	2	64	10 (26.32)	1 (2.63)	27 (71.05)
CZA	8	128	10 (26.32)	0 (0)	28 (73.68)
IMR	4	16	15 (39.47)	5 (13.16)	18 (47.37)
FDC	0.25	2	3 (7.89%)	0 (0)	35 (92.11)

CAZ (Ceftazidima), FEP (Cefepime), TM (Tobramicina), AN (Amikacina), CIP (Ciprofloxacino), LVX (Levofloxacino), PB (Polimixina B), CL (Colistina), ATM (Aztreonam), IPM (Imipenem), MEM (Meropenem), IMR (Imipenem/Relebactam), CZA (Ceftazidima/Avibactam), TZP (Piperacilina/Tazobactam), CT (Ceftolozano/Tazobactam), FDC (Cefiderocol).

6.3 Carba NP

Ninguno de los aislamientos presentó prueba de CarbaNP positiva.

6.4 Producción de biopelícula

El 55.3 % (n=21) de los aislamientos se clasificaron como productores fuertes, 18.4 % (n=7) como moderados y 26.3 % (n=10) como débiles o no productores.

Tabla 16. Producción de biopelícula de los aislamientos.

Aislamiento	Clasificación
681	Productor fuerte
684	Productor fuerte
694	Productor débil
936	Productor débil
21-105	Productor fuerte
21-128	Productor fuerte
21-220	Productor fuerte
21-221	Productor débil
21-249	Productor moderado
21-255	Productor moderado
21-259	Productor fuerte

21-269	Productor fuerte
21-282	Productor débil
21-283	Productor débil
21-322	Productor fuerte
21-429	Productor débil
21-447	Productor moderado
21-449	Productor moderado
21-474	Productor débil
21-618	Productor fuerte
21-629	Productor fuerte
21-631	Productor fuerte
21-632	Productor fuerte
21-634	Productor fuerte
21-650	Productor moderado
21-659	Productor fuerte
21-660	Productor fuerte
21-661	Productor fuerte
21-662	Productor fuerte
21-663	Productor fuerte
21-667	Productor moderado
21-674	Productor fuerte
21-788	Productor fuerte
21-805	Productor débil
21-807	Productor débil
21-808	Productor débil
21-811	Productor moderado
21-817	Productor fuerte

Por otro lado, se encontró una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre la producción fuerte de biopelícula y la resistencia a ceftazidima, ceftolozano/tazobactam y ceftazidima/avibactam.

Tabla 17. Asociación entre productores fuertes de biopelícula y resistencia a antimicrobianos.

Antimicrobiano	Valor <i>p</i>
Ceftazidima	0.013
Cefepima	0.912
Tobramicina	0.618
Amikacina	0.819
Ciprofloxacino	0.536
Levofloxacino	0.726
Polimixina B	0.362
Colistina	0.362
Aztreonam	0.465
Imipenem	—
Meropenem	0.239
Piperacilina/Tazobactam	0.438
Ceftolozano/Tazobactam	0.010
Ceftazidima/Avibactam	0.013
Imipenem/Relebactam	0.275

6.5 Perfil de susceptibilidad en biopelícula

El perfil de susceptibilidad en condiciones de biopelícula evidenció una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en las concentraciones inhibitorias de todos los antimicrobianos probados en comparación con las obtenidas en células planctónicas.

Tabla 18. Comparación entre células planctónicas y de biopelícula.

Antibiótico	CMI (µg/mL) planctónicas Media ± DE	CMI (µg/mL) biopelícula Media ± DE	Valor <i>p</i>
CAZ	143.20 ± 90.55	1945.60 ± 323.82	0.004
FEP	54.40 ± 80.43	972.80 ± 161.91	0.005
CIP	15.43 ± 15.05	230.40 ± 53.97	0.005
LVX	23.00 ± 24.39	217.60 ± 80.95	0.005
ATM	7.33 ± 6.60	146.40 ± 120.45	0.012
IPM	24.20 ± 12.66	243.20 ± 40.48	0.004
MEM	0.33 ± 0.23	16.00 ± 11.31	0.005
AN	0.46 ± 0.33	18.00 ± 10.54	0.001
TOB	86.40 ± 37.10	972.80 ± 161.91	0.004
CL	40.00 ± 21.66	691.20 ± 377.79	0.005
PB	32.80 ± 18.65	73.60 ± 42.13	0.023
CZA	283.20 ± 174.63	3481.60 ± 1295.27	0.005
CT	38.70 ± 24.74	180.63 ± 61.27	0.005
TZP	20.60 ± 18.28	563.20 ± 423.24	0.001
IMR	34.00 ± 40.23	166.40 ± 80.95	0.005

6.6 Combinaciones sobre biopelícula

Para la evaluación de combinaciones de antimicrobianos en la biopelícula, se seleccionaron diez aislamientos basándose en el perfil de susceptibilidad y producción de biopelícula (productores fuertes que fueran resistentes a ocho o más antimicrobianos). Se evaluaron las combinaciones entre Imipenem/Relebactam, Ceftazidima/Avibactam y Ceftolozano/Tazobactam con polimixina B, colistina y cefepime. La proporción de cepas que presentaron sinergia, indiferencia o antagonismo en cada una de las combinaciones se presenta en la tabla 19:

Tabla 19. Efectos de las combinaciones evaluadas sobre la biopelícula de los aislamientos seleccionados.

Efecto	Combinaciones								
	IMR- PB	IMR- CL	IMR- FEP	CZA- PB	CZA- CL	CZA- FEP	CT- PB	CT- CL	CT- FEP
Sinergia	10	10	10	8	4	10	5	6	8
Indiferencia	0	0	0	2	6	0	5	4	ND
Antagonismo	0	0	0	0	0	0	0	0	ND

IMR (Imipenem/Relebactam), CZA (Ceftazidima/Avibactam), CT (Ceftolozano/Tazobactam), PB (Polimixina B), CL (Colistina), FEP (Cefepime), ND (No determinado).

6.7 Secuenciación del genoma completo

6.7.1 Tipificación de los aislamientos

La clasificación de las secuencias tipo de los aislamientos se muestra en la tabla 20. El análisis de MLST reveló la presencia de 23 ST diferentes, dos de ellas nuevas, destacando la presencia de nueve aislamientos considerados como clonas de alto riesgo: ST235 (n= 7), ST244 (n= 1) y ST308 (n= 1).

Tabla 20. Resultados de tipificación de secuencias multi-locus (MLST).

Secuencia tipo	(n)
235	7
2281	3
3045	3
253	2
309	2
3579	2
-667	2
244	1
260	1
275	1

293	1
308	1
360	1
1284	1
1930	1
2130	1
2235	1
2734	1
3205	1
3426	1
3428	1
4409	1
6281	1

Además, a partir de los resultados de la tipificación (MLST), se construyó un árbol filogenético (Figura 10) con el objetivo de analizar las relaciones genéticas entre los aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*. Dicho árbol se basó en la comparación de los perfiles alélicos de los siete genes housekeeping incluidos en el esquema MLST, lo que permitió agrupar los aislamientos de acuerdo con su similitud genética y con las secuencias tipo (ST) asignadas.

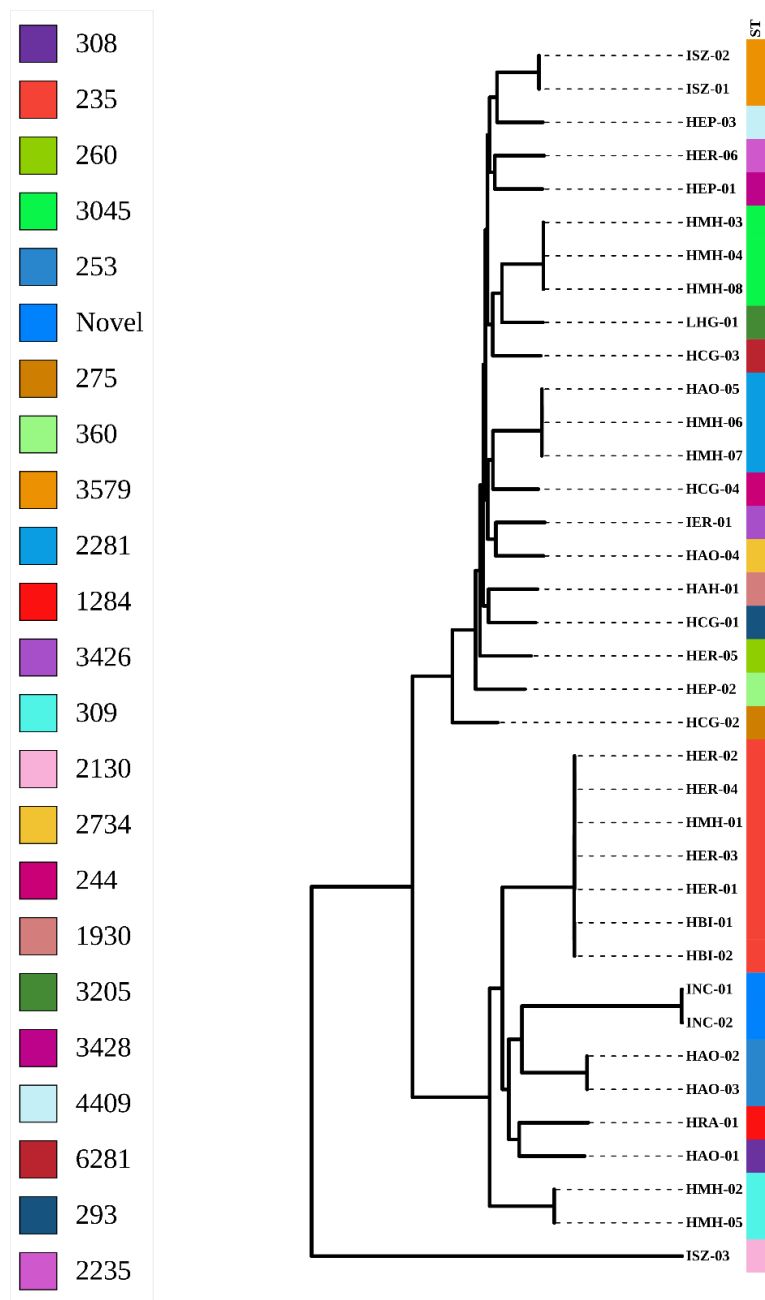


Figura 10. Árbol filogenético basado en el análisis de MLST.

6.7.3 Resistoma adquirido

En la tabla 21 y 22 se presentan los genes de resistencia adquiridos presentes en los aislamientos. Se encontraron genes que codifican betalactamasas, enzimas modificadoras de aminoglucósidos y genes de resistencia a otras familias de antimicrobianos (sulfonamidas, tetraciclinas y anfenicoles) en 13 de los 37 aislamientos, siendo la

betalactamasa de clase D, OXA-2 la más frecuente. Así mismo, se encontraron variantes de GES con actividad carbapenemasa (GES-20 y GES-59).

Tabla 21. Genes de resistencia a betalactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas presentes en los aislamientos.

Betalactamasas	Enzimas modificadoras de aminoglucósidos	Fluoroquinolonas
blaOXA-2 (n=9)	aac(6')-Ib9 (n=1)	qnrVC1 (n=1)
blaGES-9 (n=1)	aac(6')-I33-like (n=1)	
blaGES-19 (n=2)	aac(6')-33 (n=2)	
blaGES-20 (n=1)	aac(6')-Ib4 (n=10)	
blaGES-59 (n=4)	aac(6')-Ib-Hangzhou-like (n=1)	
blaOXA-226 (n=1)	aph(3')-VIa (n=1)	
	ant(2'')-Ia-like (n=1)	
	aac(6')-29b-like (n=1)	

Tabla 22. Genes de resistencia a otros antimicrobianos presentes en los aislamientos.

Sulfonamidas	Tetraciclinas	Anfenicoles
sul1 (n=12)	tet (G) (n=6)	cmlA9 (n=5)
		catB2 (n=1)

6.7.4 Resistoma mutacional

En la tabla 23 se presentan las mutaciones presentes en diferentes genes que confieren resistencia a antimicrobianos (bombas de eflujo, porinas, genes reguladores, variantes de PDC, modificación de sitio diana, etc.).

Tabla 23. Mutaciones en diferentes genes asociadas con resistencia antimicrobiana en los aislamientos.

Mecanismos de resistencia	Gen (n)
----------------------------------	----------------

Porinas	<i>oprD</i> (31), <i>oprN</i> (4)
Proteínas fijadoras de penicilina	<i>ponA</i> (5), PBP2 (1), PBP7 (2), <i>dacB</i> (2)
PDC	<i>ampD</i> (5), <i>ampR</i> (1), <i>mpl</i> (3)
Bombas de eflujo	<i>armZ</i> (5), <i>cpxR</i> (1), <i>cpxS</i> (1), <i>nalC</i> (2), <i>nalD</i> (12), <i>nfxB</i> (2), <i>mexA</i> (2), <i>mexC</i> (4), <i>mexD</i> (12), <i>mexE</i> (1), <i>mexF</i> (2), <i>mexR</i> (3), <i>mexS</i> (8), <i>mexT</i> (4), <i>mexX</i> (9), <i>mexY</i> (9), <i>mexZ</i> (6), <i>pmrA</i> (1), <i>pmrB</i> (10)
ADN girasa	<i>gyrA</i> (17), <i>gyrB</i> (1)
Topoisomerasa IV	<i>parC</i> (18), <i>parE</i> (2), <i>parR</i> (6), <i>parS</i> (6)

6.7.5 Variantes de PDC

En la tabla 24 se presentan las diferentes variantes de la cefalosporinasa derivada de *Pseudomonas* (PDC) en los aislamientos. Se encontraron 15 variantes diferentes (3 nuevas).

Tabla 24. Variantes de PDC en los aislamientos.

Variante de PDC	(n)
<i>PDC-1</i>	1
<i>PDC-3</i>	4
<i>PDC-5</i>	10
<i>PDC-6</i>	1
<i>PDC-8</i>	1
<i>PDC-23</i>	2
<i>PDC-34</i>	2
<i>PDC-35</i>	6
<i>PDC-39</i>	1
<i>PDC-62</i>	1
<i>PDC-80</i>	1
<i>PDC-113</i>	2

Nueva	2
Nueva	1
Nueva	3

7 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La resistencia antimicrobiana es un problema de salud pública global. La aparición de microorganismos resistentes a todas las clases de antibióticos disponibles ha vuelto necesario el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos o la búsqueda de nuevas opciones para tratarlas. Entre los microorganismos de mayor importancia se encuentra *P. aeruginosa*, un patógeno prácticamente ubicuo involucrado en una gran variedad de infecciones. Este patógeno se caracteriza por tener una alta capacidad de adaptación y supervivencia y resistencia a muchos antibióticos. Uno de los mecanismos que le permiten adaptarse y sobrevivir a ambientes adversos es su capacidad de formar biopelícula, la cual dificulta el tratamiento. Es por ello que en este trabajo se buscó evaluar el efecto sinérgico de antimicrobianos de uso clínico actual en células de biopelícula de *P. aeruginosa*.

Se procesaron un total de 63 aislamientos previamente identificados como *P. aeruginosa* por medio de MALDI-TOF MS. La confirmación por PCR amplificando un fragmento del gen *gyrB* tuvo una concordancia del 77.8% con respecto a la identificación por MALDI-TOF. La discrepancia observada no invalida el rendimiento de ninguno de los métodos, sino que resalta la importancia de una confirmación con otro método. Mientras que MALDI-TOF MS es mucho más rápido y robusto para el cribado de rutina, la confirmación por medio de PCR con genes altamente específicos como *gyrB* aporta la especificidad adicional de la que MALDI-TOF MS carece en algunos aislamientos atípicos o cuando las librerías de espectros pueden limitar la discriminación final(291–294).

Para la identificación de *P. aeruginosa* se han utilizado ensayos dúplex *ecfX/gyrB* que han mostrado sensibilidades y especificidades muy altas para (292), y la qPCR dirigida a *gyrB* ha sido validada con límites de detección bajos y excelente especificidad frente a otras especies del género (293). Estudios recientes basados en pangenoma reafirman que *gyrB* y *ecfX* son dianas con alto poder discriminativo a nivel de especie (294). Por su parte, MALDI-TOF MS ofrece tasas de concordancia elevadas con métodos moleculares cuando las bases de referencia son adecuadas (291).

Por otro lado, de los 38 aislamientos seleccionados por su resistencia a carbapenémicos (todos resistentes a imipenem), se documentó un perfil de resistencia con porcentajes de

resistencia altos. Las CMI fueron altas para betalactámicos y fluoroquinolonas, con mejor comportamiento en aminoglucósidos, polimixinas y cefiderocol.

Estos hallazgos son coherentes con reportes internacionales en los que se ha descrito históricamente mejor actividad relativa de amikacina y colistina frente a *P. aeruginosa* MDR, con tasas de susceptibilidad que superan globalmente a las de betalactámicos tradicionales (295). En Europa, el reporte EARS-Net 2023 indica que la resistencia a piperacilina/tazobactam, ceftazidima y carbapenémicos continúa siendo alta y muy heterogénea por país (296). A escala nacional, la red INVIFAR ha descrito datos relevantes de resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa*, lo que sitúa los resultados de este trabajo dentro de una tendencia epidemiológica nacional (297,298). Las diferencias claramente observables en cuanto a resistencia a carbapenémicos se explican por el sesgo de selección de cepas resistentes a carbapenémicos. Es relevante que ningún aislamiento fue Carba NP positivo, sugiriendo mecanismos no enzimáticos como pérdida/alteración de OprD, sobreexpresión/variantes de AmpC y bombas de eflujo como mecanismo de resistencia a carbapenémicos, lo cual fue posteriormente confirmado mediante el análisis del resistoma (299–301).

En el caso de las combinaciones de betalactámicos con nuevos inhibidores de betalactamasas, los porcentajes de resistencia a ceftazidima/avibactam (26.32%) y ceftolozano/tazobactam (26.32%) fueron menores que las observadas en reportes de aislamientos MDR europeas (302). El cefiderocol mostró una actividad destacada (MIC₅₀ 0.25 µg/mL; MIC₉₀ 2 µg/mL; 7.89% de resistencia), en concordancia con reportes internacionales donde su potencia frente a *P. aeruginosa* MDR/XDR es alta (302,303).

Se ha demostrado que imipenem puede inducir AmpC incluso en ausencia de OprD (300), comprometiendo la actividad de otros betalactámicos si la presión selectiva es constante; a la inversa, relebactam restaura la actividad de imipenem frente a cepas con AmpC y pérdida parcial de OprD (299). Con los datos obtenidos, se puede mencionar que el uso de CZA, CT y cefiderocol es más adecuado en aislamientos resistentes a carbapenémicos siempre y cuando la resistencia no esté mediada por carbapenemasas, en concordancia con estudios recientes (301,304).

Aplicando el método de cristal violeta en microplaca, todos los aislamientos resistentes a los carbapenémicos formaron biopelícula: 55.3% fuertes, 18.4% moderados y 26.3% débiles. Este hallazgo subraya la elevada capacidad de persistencia de los aislamientos de *P. aeruginosa* y concuerda con estudios donde los aislamientos resistentes presentan la capacidad de formar biopelículas (305).

En el análisis de asociación, se observó que la producción fuerte de biopelícula se relacionó significativamente con la resistencia a ceftazidima, ceftolozano/tazobactam y ceftazidima/avibactam ($p < 0.05$). Esto sugiere que, aun en ausencia de carbapenemasas, la matriz extracelular, los gradientes de nutrientes/oxígeno, el enlentecimiento metabólico y la subpoblación de células persistentes promueven una clara tolerancia a los betalactámicos, fenómeno que ha sido ampliamente descrito en *P. aeruginosa* (268,306).

La evaluación de MBIC mediante el Calgary Biofilm Device (CBD) en diez aislamientos seleccionados (productores fuertes y con perfiles de MDR) mostró un incremento significativo de la concentración requerida para inhibir el crecimiento respecto al estado planctónico, ya que todos los aislamientos presentaron un fenotipo resistente frente a los 15 antibióticos probados bajo condiciones de biopelícula. Esto es consistente con la literatura, donde las MBIC/MBEC superan las CMI entre 1–3 diluciones de acuerdo al antibiótico evaluado, y dependiendo del tipo de cepa hasta 1000 veces (85,144,268,286). Este patrón puede deberse a la difusión limitada a través de la matriz, la quelación con compuestos de esta, la adsorción del fármaco, la disminución del potencial de membrana y la expresión de bombas de eflujo que reducen la eficacia en biopelícula (307). Los resultados de la prueba t de Student confirman diferencias significativas entre MIC (planctónica) y MBIC (biopelícula) para los 15 antibióticos ($p < 0.05$); lo anterior, plantea la necesidad de evaluar el perfil de susceptibilidad sobre biopelícula en aislamientos clínicos. Esto remarca la importancia de que la susceptibilidad planctónica no es adecuada para establecer tratamientos donde la formación de biopelícula esté involucrada. En infecciones de este tipo las MIC planctónicas pueden subestimar la concentración necesaria para controlar el crecimiento, y, por ende, las decisiones terapéuticas deberían considerar datos como la MBIC/MBEC o estrategias de combinación y optimización con parámetros PK/PD (268,286,307,308).

En cuanto a las combinaciones sobre biopelícula, aquellas basadas en IMR y CZA-FEP fueron las más activas. Esto es coherente con los datos fenotípicos ya que relebactam inhibe AmpC y puede restaurar la actividad de imipenem cuando va acompañada de la pérdida de OprD y sobreexpresión de AmpC (299), un fenotipo que posiblemente sea muy frecuente dados los resultados de la prueba de Carba NP donde ninguno de los aislamientos fue positivo. Además, se ha reportado sinergia entre imipenem y CZA/avibactam en cepas XDR no productoras de MBL, asociada a sobreexpresión/mutaciones de AmpC y defectos de OprD (270). En modelos de decisión terapéutica basados en pruebas fenotípicas personalizadas, combinaciones de betalactámicos + polimixinas o cefepime mostraron actividad bactericida frente a *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos (309).

Por el contrario, se observó indiferencia en las combinaciones con CT y CZA (a excepción de FEP). La literatura reporta que no todas las combinaciones entre betalactámicos/inhibidores de betalactamasas y polimixina son aditivas; la permeabilización de membrana inducida por polimixinas, cambios del potencial transmembrana y efectos sobre la matriz pueden interferir con la entrada y cinética de unión del betalactámico/inhibidor especialmente en biopelículas maduras (266,306). Asimismo, una revisión de CZA en monoterapia vs combinación no encontró beneficio clínico consistente de añadir otro agente, pese a reportes *in vitro* de sinergia con aztreonam, aminoglucósidos o polimixinas (265).

En biopelícula, las combinaciones con IMR y CZA-FEP representan estrategias prometedoras, mientras que las combinaciones con CT y CZA (a excepción de la combinación con FEP) presentan efectos de indiferencia. Estas diferencias entre los aislamientos hace necesaria la validación de combinaciones por cada aislamiento (266,309).

En *P. aeruginosa*, la resistencia a antimicrobianos rara vez depende de un solo mecanismo de resistencia; con frecuencia es el resultado de un conjunto de mecanismos adquiridos y un resistoma mutacional altamente versátil que modula permeabilidad, eflujo, afinidad por PBPs y sensibilidad a fluoroquinolonas (310,311). Esto demuestra que aun dentro de un mismo linaje clonal, pueden observarse perfiles fenotípicos diferentes por mutaciones

adicionales y fenómenos como pérdida de codones de terminación, inserciones y deleciones que pueden cambiar el fenotipo de cada aislamiento (311,312).

Desde una perspectiva poblacional, la presencia de clones de alto riesgo, como ST235, ST244 y ST308 así como ST no descritas, demuestra que ciertos linajes tienden a seleccionar múltiples determinantes de resistencia tanto adquiridos como mutaciones cromosomales, dificultando la predicción entre el genotipo-fenotipo (311,312). En *P. aeruginosa*, los mecanismos cromosomales clave (PDC, OprD y bombas de eflujo) no solo confieren resistencia individualmente, sino que también se ven involucrados en procesos de corregulación que derivan en fenotipos MDR/XDR (310,313).

En el resistoma de los aislamientos se observó una elevada frecuencia de alteraciones en oprD, principalmente deleciones, inserciones y codones de terminación prematuros, un mecanismo de resistencia a carbapenémicos por pérdida de permeabilidad que se ha reportado con frecuencia (310).

De la misma manera, los aislamientos presentaron numerosas mutaciones en bombas de eflujo tipo y sus reguladores, incluyendo mexR, nalC, nalD, mexZ, mexS y mexT, así como cambios en mexD, mexC, mexX y mexY. Se ha demostrado que mutaciones en estos reguladores conducen con frecuencia a la sobreexpresión de MexAB-OprM y MexXY-OprM, contribuyendo a resistencia a la mayoría de betalactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas (310,311). En el caso de cefiderocol, el eflujo suele desempeñar un papel menos relevante, sin embargo, dada la permeabilidad reducida y truncamiento de los mecanismos de captación de hierro, la combinación de ambos mecanismos pueden aumentar las CMI hacia rangos de resistencia (314).

En cuanto a betalactámicos, se identificó una diversidad de variantes de PDC, incluyendo alelos previamente descritos y variantes no catalogadas. Es importante resaltar que no todas las variantes de PDC confieren necesariamente resistencia a nuevos betalactámicos, y que algunas sustituciones pueden representar polimorfismos naturales sin impacto funcional evidente. Por ello, la interpretación del resistoma debe integrar no solo la variante, sino también la presencia de mutaciones en genes reguladores como ampD, ampR y dacB, así como el contexto de permeabilidad y eflujo (187,310,315,316). Se ha observado que la inactivación aislada de ampD no necesariamente represente un

incremento de forma marcada en la CMI de cefiderocol, mientras que la pérdida de sistemas de captación de hierro sí produce aumentos significativos, reforzando el hecho de que PDC actúa como un agregado dentro de un contexto donde se incluyan varios mecanismos de resistencia (187,314,317).

Por otro lado, se identificaron mutaciones en proteínas fijadoras de penicilina (PBP), particularmente en *ftsI* (PBP3) y *ponA*, las cuales pueden contribuir al fenotipo de resistencia frente a betalactámicos. Se ha descrito que PBP3 es un gen sometido a fuerte presión selectiva y que determinadas sustituciones pueden modificar la afinidad por diferentes betalactámicos, especialmente en combinación con la desrepresión de AmpC y pérdida de porinas (317,318).

En cuanto a fluoroquinolonas, las mutaciones detectadas en *gyrA* (T83I, D87N y D87H) y *parC* (S87L, S87W, E91K) corresponden a cambios que generan resistencia a quinolonas (310,312,319). El agregado de estas mutaciones con alteraciones en bombas de eflujo refuerza el hecho de que ciertas clonas se encuentran altamente adaptadas a la presión por el uso de antimicrobianos, y que en algunos casos, facilitan la emergencia de resistencia a fármacos de reciente uso.

Si bien OprD no constituye la principal vía de entrada de cefiderocol, su inactivación refleja un trasfondo MDR/XDR que reduce el margen terapéutico y favorece que reducciones relativamente pequeñas en la captación de hierro tengan un impacto clínicamente relevante sobre la actividad del antibiótico (311,313).

Tres aislamientos presentaron resistencia a cefiderocol y, de manera consistente con lo descrito previamente para *P. aeruginosa*, el análisis del resistoma sugiere un conjunto de mecanismos más que uno aislado, en el cual el componente más específico para cefiderocol se asocia a alteraciones en los sistemas de captación de hierro y síntesis de sideróforos, más que a la presencia de un único gen de resistencia adquirido. A diferencia de los nuevos betalactámicos (ceftazidima/avibactam, ceftolozano/tazobactam e imipenem/relebactam), se ha demostrado que la resistencia a cefiderocol requiere de modificaciones en los sistemas de transporte de hierro, como *piuA/D*, *PiuC* o *pirA/pirR*, debido al mecanismo de entrada de este antimicrobiano conocido como “caballo de Troya”, mimetizando sideróforos para atravesar la membrana externa (314,315,320).

Los aislamientos resistentes a cefiderocol presentaron múltiples sustituciones en genes implicados en la captación y transporte de hierro, así como en la biosíntesis y regulación de sideróforos. En uno de los aislamientos se observaron mutaciones en *pirR*, junto con cambios en *pvdP*, *pvdN* y *pvdR*, además de sustituciones en *piuB*, *piuC* y *piuD*, genes asociados a sideróforos como *pchD/pchE/pchF* y delección en *fepG*. En los otros aislamientos resistentes se detectaron mutaciones en *cirA*, *pvdP*, variantes en *pchE*, *pchF* y sustituciones en *piuD*, también asociadas a una delección en *fepG*. Este perfil genómico es coherente con el fenotipo de los aislamientos representando un conjunto de mecanismos de resistencia. Algunos estudios han demostrado que la inactivación de componentes del sistema *piu* puede incrementar la CMI de cefiderocol en varias diluciones (315).

No obstante, la resistencia a cefiderocol no ocurre de forma aislada, sino que se superpone a la resistencia cromosómica clásica característica de *P. aeruginosa*. Aunque cefiderocol fue diseñado para evadir parcialmente mecanismos como la sobreexpresión de AmpC, la pérdida de OprD o la acción de bombas de eflujo, se ha documentado que la resistencia puede emerger mediante acumulación de mutaciones cromosómicas, incluyendo cambios estructurales en PDC, modificaciones en reguladores de eflujo y, el principal; las alteraciones en los sistemas de transporte de hierro (314,317,320).

En conjunto, los resultados obtenidos muestran que la resistencia a cefiderocol y a otros antimicrobianos en los aislamientos se debe a un resistoma complejo, donde la combinación de pérdida de permeabilidad, sobreexpresión de bombas de eflujo, variantes de PDC y, de forma distintiva para cefiderocol, alteraciones en sistemas de captación de hierro y sideróforos, representan la razón de los fenotipos observados. Los datos del resistoma refuerzan la necesidad de interpretar la resistencia antimicrobiana en *P. aeruginosa* desde un enfoque tanto fenotípico como genotípico.

8 CONCLUSIONES

- La identificación molecular mediante PCR dirigida al gen *gyrB* evidenció la necesidad de métodos moleculares complementarios a MALDI-TOF MS para la correcta identificación a nivel de especie.
- El perfil de susceptibilidad en células planctónicas evidenció altos niveles de resistencia frente a carbapenémicos, monobactámicos y fluoroquinolonas, lo que refleja la distribución de cepas MDR en nuestro país.
- La ausencia de carbapenemasas detectables por la prueba Carba NP sugiere la participación de mecanismos no enzimáticos en la resistencia a carbapenémicos.
- Existe una asociación entre la producción fuerte de biopelícula y la resistencia a betalactámicos de última generación como ceftazidima/avibactam y ceftolozano/tazobactam, lo que refuerza el papel de la biopelícula como determinante de persistencia clínica.
- En condiciones de biopelícula, las CMI para todos los antibióticos se incrementa significativamente, lo que demuestra la marcada tolerancia asociada al estado de biopelícula y la limitada eficacia de las terapias convencionales.
- Las combinaciones con imipenem/relebactam y ceftazidima-cefepime presentan sinergia , mientras que aquellas que involucraron polimixinas con ceftazidima/avibactam o ceftolozano/tazobactam presentan indiferencia.
- El fenotipo de resistencia presente en cada uno de los aislamientos está asociado a la presencia de genes de resistencia y mutaciones determinadas mediante el análisis del resistoma.
- Las combinaciones de antimicrobianos son una opción terapéutica que tiene potencial para el tratamiento de infecciones producidas por *P. aeruginosa* en las que se vea involucrado un fenotipo productor de biopelícula.

9 PERSPECTIVAS

- La caracterización genómica mediante WGS sugiere la necesidad de estudios funcionales que permitan confirmar el papel específico de genes y mutaciones asociados tanto a la resistencia como al fenotipo de biopelícula.
- La elevada diferencia entre la susceptibilidad en células planctónicas y de biopelícula resalta la importancia de desarrollar metodologías estandarizadas que permitan evaluar combinaciones terapéuticas en condiciones que reflejen mejor los escenarios clínicos.
- Los patrones de sinergia observados hacen necesario el análisis genotipo–fenotipo, integrando herramientas bioinformáticas y modelos experimentales más complejos que permitan predecir combinaciones óptimas según el resistoma de cada aislamiento. Además, validar estas combinaciones en modelos *in vivo* aportaría evidencia más sólida para su posible aplicación clínica. Para ello, y teniendo en cuenta que algunas combinaciones mostraron sinergia *in vitro*, se podrían optimizar para regímenes farmacodinámicos específicos mediante modelos como PK/PD.
- La integración de datos genómicos en estrategias de vigilancia y diagnóstico podría contribuir a la detección temprana de clones de alto riesgo y al diseño de terapias dirigidas, optimizando el manejo de infecciones por *P. aeruginosa* MDR/XDR/DTR con fenotipo productor de biopelícula.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. O'Neill J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. Review on Antimicrobial Resistance. 2016 May.
2. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018 Mar 1;18(3):318–27. doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3 PubMed PMID: 29276051.
3. Tang KWK, Millar BC, Moore JE. Antimicrobial Resistance (AMR). *British Journal of Biomedical Science*. Institute of Biomedical Science (IBMS); 2023. doi:10.3389/bjbs.2023.11387 PubMed PMID: 37448857.
4. Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol*. 2010;1(DEC). doi:10.3389/fmicb.2010.00134 PubMed PMID: 21687759.
5. Hutchings M, Truman A, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd; 2019. p. 72–80. doi:10.1016/j.mib.2019.10.008 PubMed PMID: 31733401.
6. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis*. 1988;10(4):677–8. PubMed PMID: 3055168.
7. Lobanovska M, Pilla G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *Yale J Biol Med*. 2017 Mar;90(1):135–45. PubMed PMID: 28356901.
8. World Health Organization. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. 2024.
9. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2013. p. 297–308. doi:10.1586/eri.13.12 PubMed PMID: 23458769.

10. Vincent JL. Nosocomial infections in adult intensive-care units. *The Lancet*. 2003 Jun 14;361(9374):2068–77. doi:10.1016/S0140-6736(03)13644-6 PubMed PMID: 12814731.
11. Erdem I, Yıldırım I, Safak B, Karaali R, Erdal B, Ardic E, et al. A 5-year surveillance of healthcare-associated infections in a university hospital: A retrospective analysis. *SAGE Open Med*. 2022 Apr 1;10. doi:10.1177/20503121221091789
12. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control*. 2008 Jun;36(5):309–32. doi:10.1016/j.ajic.2008.03.002 PubMed PMID: 18538699.
13. Revelas A. Healthcare - associated infections: A public health problem. *Nigerian Medical Journal*. 2012;53(2):59. doi:10.4103/0300-1652.103543
14. Klevens RM, Edwards JR, Richards CL, Horan TC, Gaynes RP, Pollock DA, et al. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. *Public Health Rep*. 2007;122(2):160–6. doi:10.1177/003335490712200205 PubMed PMID: 17357358.
15. Haque M, Sartelli M, McKimm J, Bakar MA. Health care-associated infections – An overview. *Infection and Drug Resistance*. Dove Medical Press Ltd.; 2018. p. 2321–33. doi:10.2147/IDR.S177247 PubMed PMID: 30532565.
16. Magill SS, O’Leary E, Janelle SJ, Thompson DL, Dumyati G, Nadle J, et al. Changes in Prevalence of Health Care–Associated Infections in U.S. Hospitals. *New England Journal of Medicine*. 2018 Nov;379(18):1732–44. doi:10.1056/nejmoa1801550 PubMed PMID: 30380384.
17. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. *New England Journal of Medicine*. 2014 Mar 27;370(13):1198–208. doi:10.1056/nejmoa1306801 PubMed PMID: 24670166.

18. Oliver A, Alarcón T, Caballero E, Cantón R. Diagnóstico microbiológico de la colonización- infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2009. p. 89–104. doi:10.1016/j.eimc.2008.05.004 PubMed PMID: 19232782.
19. Malhotra S, Hayes D, Wozniak DJ. Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the Host-Microbe Interface. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Jun 19;32(3). doi:10.1128/CMR.00138-18 PubMed PMID: 31142499.
20. Gomila A, Carratalà J, Eliakim-Raz N, Shaw E, Wiegand I, Vallejo-Torres L, et al. Risk factors and prognosis of complicated urinary tract infections caused by *pseudomonas aeruginosa* in hospitalized patients: A retrospective multicenter cohort study. *Infect Drug Resist*. 2018;11:2571–81. doi:10.2147/IDR.S185753
21. Cottalorda A, Leoz M, Dahyot S, Gravey F, Grand M, Froidure T, et al. Within-Host Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* Urinary Isolates: A Seven-Patient Longitudinal Genomic and Phenotypic Study. *Front Microbiol*. 2021 Jan 14;11. doi:10.3389/fmicb.2020.611246
22. Fujitani S, Sun HY, Yu VL, Weingarten JA. Pneumonia due to *pseudomonas aeruginosa*: Part I: Epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest*. American College of Chest Physicians; 2011. p. 909–19. doi:10.1378/chest.10-0166 PubMed PMID: 21467058.
23. Cilloniz C, Martin-Loeches I, Garcia-Vidal C, Jose AS, Torres A. Microbial etiology of pneumonia: Epidemiology, diagnosis and resistance patterns. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2016. doi:10.3390/ijms17122120 PubMed PMID: 27999274.
24. Luyt CE, Hékimian G, Koulenti D, Chastre J. Microbial cause of ICU-acquired pneumonia: Hospital-acquired pneumonia versus ventilator-associated pneumonia. *Current Opinion in Critical Care*. Lippincott Williams and Wilkins; 2018. p. 333–8. doi:10.1097/MCC.0000000000000526 PubMed PMID: 30036192.

25. Rello J, Borgatta B, Lisboa T. Risk factors for pseudomonas aeruginosa pneumonia in the early twenty-first century. *Intensive Care Med.* 2013 Dec;39(12):2204–6. doi:10.1007/s00134-013-3046-1 PubMed PMID: 24146002.
26. Chung DR, Song JH, Kim SH, Thamlikitkul V, Huang SG, Wang H, et al. High prevalence of multidrug-resistant nonfermenters in hospital-acquired pneumonia in Asia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 Dec 15;184(12):1409–17. doi:10.1164/rccm.201102-0349OC PubMed PMID: 21920919.
27. Weber DJ, Rutala WA, Sickbert-Bennett EE, Samsa GP, Brown V, Niederman MS. Microbiology of Ventilator–Associated Pneumonia Compared With That of Hospital-Acquired Pneumonia. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007 Jul;28(7):825–31. doi:10.1086/518460 PubMed PMID: 17564985.
28. Revathi G, Puria'k J, Jaid BK. Bacteriology of burns. *Burns.* 1998.
29. Tredget EE, Shankowsky HA, Joffe AM, Inkson TI, Volpel K, Paranchych W, et al. Epidemiology of Infections with Pseudomonas aeruginosa in Burn Patients: The Role of Hydrotherapy. *Clinical Infectious Diseases.* 1992 Dec 1;15(6):941–9. doi:10.1093/clind/15.6.941
30. Vasil ML, Ochsner UA. The response of Pseudomonas aeruginosa to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol Microbiol.* 1999 Nov;34(3):399–413. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01586.x
31. Chen J, Huang H, Liu C, Fu Y qiang. Risk factors for mortality in pseudomonas aeruginosa bacteremia in children. *Pediatr Neonatol.* 2024 Jan 1;65(1):31–7. doi:10.1016/j.pedneo.2023.03.012 PubMed PMID: 37517970.
32. Guo J, Garratt A, Hill A. Worldwide rates of diagnosis and effective treatment for cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2022 May 1;21(3):456–62. doi:10.1016/j.jcf.2022.01.009 PubMed PMID: 35125294.
33. Reisin IL, Prat AG, Abraham EH, Amara JF, Gregory RJ, Ausiello DA, et al. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride

- channel. *Journal of Biological Chemistry*. 1994 Aug 12;269(32):20584–91. doi:10.1016/s0021-9258(17)32033-1 PubMed PMID: 7519611.
34. Shteinberg M, Haq IJ, Polineni D, Davies JC. Cystic fibrosis. *Lancet*. 2021 Jun 5;397(10290):2195–211. doi:10.1016/S0140-6736(20)32542-3 PubMed PMID: 34090606.
 35. Button B, Cai LH, Ehre C, Kesimer M, Hill DB, Sheehan JK, et al. A periciliary brush promotes the lung health by separating the mucus layer from airway epithelia. *Science (1979)*. 2012 Aug 24;337(6097):937–41. doi:10.1126/science.1223012 PubMed PMID: 22923574.
 36. Hogardt M, Heesemann J. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *International Journal of Medical Microbiology*. Elsevier GmbH; 2010. p. 557–62. doi:10.1016/j.ijmm.2010.08.008 PubMed PMID: 20943439.
 37. Bhagirath AY, Li Y, Somayajula D, Dadashi M, Badr S, Duan K. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulm Med*. 2016 Dec 5;16(1). doi:10.1186/s12890-016-0339-5 PubMed PMID: 27919253.
 38. Bartell JA, Sommer LM, Haagensen JAJ, Loch A, Espinosa R, Molin S, et al. Evolutionary highways to persistent bacterial infection. *Nat Commun*. 2019 Dec 1;10(1). doi:10.1038/s41467-019-08504-7 PubMed PMID: 30733448.
 39. Marvig RL, Sommer LM, Molin S, Johansen HK. Convergent evolution and adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* within patients with cystic fibrosis. *Nat Genet*. 2015;47(1):57–64. doi:10.1038/ng.3148 PubMed PMID: 25401299.
 40. Li H, Gao T, Fang W, Xian-Yu C, Deng N, Zhang C, et al. Global, regional and national burden of chronic obstructive pulmonary disease over a 30-year period: Estimates from the 1990 to 2019 Global Burden of Disease Study. *Respirology*. 2023 Jan 23;28(1):29–36. doi:10.1111/resp.14349
 41. Rodrigo-Troyano A, Melo V, Marcos PJ, Laserna E, Peiro M, Suarez-Cuartin G, et al. *Pseudomonas aeruginosa* in chronic obstructive pulmonary disease patients with

- frequent hospitalized exacerbations: A prospective multicentre study. 2018 Oct 1;96(5):417–24. doi:10.1159/000490190 PubMed PMID: 30041176.
42. Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, Romagnoli M, Casolari P, Caramori G, et al. Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 May 15;173(10):1114–21. doi:10.1164/rccm.200506-859OC PubMed PMID: 16484677.
 43. Miravittles M. Long-term antibiotics in COPD: More benefit than harm? *Primary Care Respiratory Journal*. 2013. p. 261–2. doi:10.4104/pcrj.2013.00074 PubMed PMID: 23966215.
 44. Garcia-Vidal C, Almagro P, Romaní V, Rodríguez-Carballeira M, Cuchi E, Canales L, et al. *Pseudomonas aeruginosa* in patients hospitalised for COPD exacerbation: A prospective study. *European Respiratory Journal*. 2009 Nov;34(5):1072–8. doi:10.1183/09031936.00003309 PubMed PMID: 19386694.
 45. Eklöf J, Sørensen R, Ingebrigtsen TS, Sivapalan P, Achir I, Boel JB, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and risk of death and exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease: an observational cohort study of 22 053 patients. *Clinical Microbiology and Infection*. 2020 Feb 1;26(2):227–34. doi:10.1016/j.cmi.2019.06.011 PubMed PMID: 31238116.
 46. Almagro P, Cabrera FJ, Diez J, Boixeda R, Alonso Ortiz MB, Murio C, et al. Comorbidities and short-term prognosis in patients hospitalized for acute exacerbation of COPD: The EPOC en servicios de medicina interna (ESMI) study. *Chest*. 2012;142(5):1126–33. doi:10.1378/chest.11-2413 PubMed PMID: 23303399.
 47. Yang G, Han L, Wen J, Zhou S. *Pseudomonas guangdongensis* sp. nov., isolated from an electroactive biofilm, and emended description of the genus *Pseudomonas* Migula 1894. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013 Dec;63(PART 12):4599–605. doi:10.1099/ijs.0.054676-0 PubMed PMID: 23918787.
 48. Palleroni NJ. The *Pseudomonas* story. *Environmental Microbiology*. 2010. p. 1377–83. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x PubMed PMID: 20553550.

49. Hugh R, Leifson E. The proposed Neotype Strains of *Pseudomonas Aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*. 1964 Apr 1;14(2):69–84. doi:10.1099/0096266X-14-2-69
50. Diggle SP, Whiteley M. Microbe profile: *Pseudomonas aeruginosa*: Opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology (United Kingdom)*. 2020;166(1):30–3. doi:10.1099/mic.0.000860 PubMed PMID: 31597590.
51. Besse A, Groleau MC, Trottier M, Vincent AT, Déziel E. *Pseudomonas aeruginosa* Strains from Both Clinical and Environmental Origins Readily Adopt a Stable Small-Colony-Variant Phenotype Resulting from Single Mutations in c-di-GMP Pathways. *J Bacteriol*. 2022 Oct 1;204(10). doi:10.1128/jb.00185-22 PubMed PMID: 36102640.
52. Wagner VE, Frelinger JG, Barth RK, Iglewski BH. Quorum sensing: dynamic response of *Pseudomonas aeruginosa* to external signals. *Trends Microbiol*. 2006 Feb;14(2):55–8. doi:10.1016/j.tim.2005.12.002
53. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature [Internet]*. 2000. Available from: www.nature.com
54. Cigana C, Curcuru L, Leone MR, Ierano T, Lore NI, Bianconi I, et al. *Pseudomonas aeruginosa* exploits lipid a and muropeptides modification as a strategy to lower innate immunity during cystic fibrosis lung infection. *PLoS One*. 2009;4(12). doi:10.1371/journal.pone.0008439 PubMed PMID: 20037649.
55. Hilliam Y, Kaye S, Winstanley C. *Pseudomonas aeruginosa* and microbial keratitis. *J Med Microbiol*. 2020 Jan 1;69(1):3–13. doi:10.1099/jmm.0.001110
56. Lindestam Arlehamn CS, Evans TJ. *Pseudomonas aeruginosa* pilin activates the inflammasome. *Cell Microbiol*. 2011 Mar;13(3):388–401. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01541.x PubMed PMID: 20955240.

57. Hahn HP. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*-a review. *Gene*. 1997.
58. Dasgupta N, Wolfgang MC, Goodman AL, Arora SK, Jyot J, Lory S, et al. A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*. 2003 Nov;50(3):809–24. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03740.x PubMed PMID: 14617143.
59. Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Int J Med Microbiol*. 2007 Sep;297(5):277–95. doi:10.1016/j.ijmm.2007.03.012 PubMed PMID: 17466590.
60. de Sousa T, Hébraud M, Enes Dapkevicius MLN, Maltez L, Pereira JE, Capita R, et al. Genomic and metabolic characteristics of the pathogenicity in *pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021. doi:10.3390/ijms222312892 PubMed PMID: 34884697.
61. Delepelaire P. Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2004. p. 149–61. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.05.001 PubMed PMID: 15546664.
62. Wu W, Jin Y, Bai F, Jin S. *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier; 2015. p. 753–67. doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00041-X
63. Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by injection. *Nature Reviews Microbiology*. 2009. p. 654–65. doi:10.1038/nrmicro2199 PubMed PMID: 19680249.
64. Russell AB, Hood RD, Bui NK, Leroux M, Vollmer W, Mougous JD. Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*. 2011 Jul 21;475(7356):343–9. doi:10.1038/nature10244 PubMed PMID: 21776080.

65. Martin DW, Schurr MJ, Mudd MH, Deretic V. Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* into the alginate-producing form: inactivation of *mucS* causes conversion to mucoidy. *Molecular Microbiology*. 1993.
66. Boucher JC, Yu H, Mudd MH, Deretic V. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis: Characterization of *muc* Mutations in Clinical Isolates and Analysis of Clearance in a Mouse Model of Respiratory Infection. *INFECTION AND IMMUNITY*. 1997.
67. Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, Lynne Howell P. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Research Foundation; 2011. doi:10.3389/fmicb.2011.00167
68. Bjarnsholt T, Jensen PØ, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB, et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol*. 2009 Jun;44(6):547–58. doi:10.1002/ppul.21011 PubMed PMID: 19418571.
69. Chung JCS, Becq J, Fraser L, Schulz-Trieglaff O, Bond NJ, Foweraker J, et al. Genomic variation among contemporary *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically infected cystic fibrosis patients. *J Bacteriol*. 2012 Sep;194(18):4857–66. doi:10.1128/JB.01050-12 PubMed PMID: 22753054.
70. La Rosa R, Johansen HK, Molina S. Convergent metabolic specialization through distinct evolutionary paths in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*. 2018 Mar 1;9(2). doi:10.1128/mBio.00269-18 PubMed PMID: 29636437.
71. Schick A, Kassen R. Rapid diversification of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung-like conditions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018 Oct 16;115(42):10714–9. doi:10.1073/pnas.1721270115 PubMed PMID: 30275334.
72. Mena A, Smith EE, Burns JL, Speert DP, Moskowitz SM, Perez JL, et al. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. *J Bacteriol*. 2008 Dec;190(24):7910–7. doi:10.1128/JB.01147-08 PubMed PMID: 18849421.

73. Sakai A, Nakanishi M, Yoshiyama K, Maki H. Impact of reactive oxygen species on spontaneous mutagenesis in *Escherichia coli*. *Genes to Cells*. 2006 Jul;11(7):767–78. doi:10.1111/j.1365-2443.2006.00982.x PubMed PMID: 16824196.
74. Band VI, Weiss DS. Heteroresistance to beta-lactam antibiotics may often be a stage in the progression to antibiotic resistance. *PLoS Biol*. 2021 Jul 1;19(7). doi:10.1371/journal.pbio.3001346 PubMed PMID: 34283833.
75. El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Jan;28(1):191–207. doi:10.1128/CMR.00058-14 PubMed PMID: 25567227.
76. Chen Z. Mechanisms and Clinical Relevance of *Pseudomonas aeruginosa* Heteroresistance. *Surg Infect (Larchmt)*. 2023 Feb;24(1):27–38. doi:10.1089/sur.2022.349 PubMed PMID: 36622941.
77. Balaban NQ, Helaine S, Lewis K, Ackermann M, Aldridge B, Andersson DI, et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat Rev Microbiol*. 2019 Jul 1;17(7):441–8. doi:10.1038/s41579-019-0196-3 PubMed PMID: 30980069.
78. Dewachter L, Fauvart M, Michiels J. Bacterial Heterogeneity and Antibiotic Survival: Understanding and Combatting Persistence and Heteroresistance. *Molecular Cell*. Cell Press; 2019. p. 255–67. doi:10.1016/j.molcel.2019.09.028 PubMed PMID: 31626749.
79. Nicoloff H, Hjort K, Levin BR, Andersson DI. The high prevalence of antibiotic heteroresistance in pathogenic bacteria is mainly caused by gene amplification. *Nat Microbiol*. 2019 Mar 1;4(3):504–14. doi:10.1038/s41564-018-0342-0 PubMed PMID: 30742072.
80. Jia X, Ma W, He J, Tian X, Liu H, Zou H, et al. Heteroresistance to cefepime in *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents*. 2020 Mar 1;55(3). doi:10.1016/j.ijantimicag.2019.10.013 PubMed PMID: 31669739.

81. He J, Jia X, Yang S, Xu X, Sun K, Li C, et al. Heteroresistance to carbapenems in invasive *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2018 Mar 1;51(3):413–21. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.10.014 PubMed PMID: 29127047.
82. Lin J, Xu C, Fang R, Cao J, Zhang X, Zhao Y, et al. Resistance and Heteroresistance to Colistin in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Wenzhou, China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Oct;63(10). doi:10.1128/AAC.00556-19 PubMed PMID: 31383654.
83. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:49–79. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.49 PubMed PMID: 11018124.
84. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–25. doi:10.3390/ijms21228671 PubMed PMID: 33212950.
85. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010. p. 322–32. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011 PubMed PMID: 20149602.
86. Hengzhuang W, Wu H, Ciofu O, Song Z, Høiby N. In vivo pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 May;56(5):2683–90. doi:10.1128/AAC.06486-11 PubMed PMID: 22354300.
87. Walters MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Jan 1;47(1):317–23. doi:10.1128/AAC.47.1.317-323.2003 PubMed PMID: 12499208.
88. Tseng BS, Zhang W, Harrison JJ, Quach TP, Song JL, Penterman J, et al. The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the

- penetration of tobramycin. *Environ Microbiol.* 2013 Oct;15(10):2865–78. doi:10.1111/1462-2920.12155 PubMed PMID: 23751003.
89. Pamp SJ, Gjermansen M, Johansen HK, Tolker-Nielsen T. Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. *Mol Microbiol.* 2008 Apr;68(1):223–40. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06152.x PubMed PMID: 18312276.
90. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nature Reviews Microbiology.* 2010. p. 423–35. doi:10.1038/nrmicro2333 PubMed PMID: 20440275.
91. Borriello G, Werner E, Roe F, Kim AM, Ehrlich GD, Stewart PS. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jul;48(7):2659–64. doi:10.1128/AAC.48.7.2659-2664.2004 PubMed PMID: 15215123.
92. Brochmann RP, Toft A, Ciofu O, Briales A, Kolpen M, Hempel C, et al. Bactericidal effect of colistin on planktonic *Pseudomonas aeruginosa* is independent of hydroxyl radical formation. *Int J Antimicrob Agents.* 2014 Feb;43(2):140–7. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.10.015 PubMed PMID: 24315789.
93. Kolpen M, Appeldorff CF, Brandt S, Mousavi N, Kragh KN, Aydogan S, et al. Increased bactericidal activity of colistin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in anaerobic conditions. *Pathog Dis.* 2016 Feb;74(1):ftv086. doi:10.1093/femspd/ftv086 PubMed PMID: 26458402.
94. Poole K. Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Multidrug efflux and more. *Canadian Journal of Microbiology.* Canadian Science Publishing; 2014. p. 783–91. doi:10.1139/cjm-2014-0666 PubMed PMID: 25388098.
95. Coenye T, Bové M, Bjarnsholt T. Biofilm antimicrobial susceptibility through an experimental evolutionary lens. *npj Biofilms and Microbiomes.* Nature Research; 2022. doi:10.1038/s41522-022-00346-4 PubMed PMID: 36257971.

96. Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* (1979). 2000 May 19;288(5469):1251–3. doi:10.1126/science.288.5469.1251 PubMed PMID: 10818002.
97. Madsen JS, Burmølle M, Hansen LH, Sørensen SJ. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2012. p. 183–95. doi:10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x PubMed PMID: 22444301.
98. Abe K, Nomura N, Suzuki S. Biofilms: Hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism. *FEMS Microbiology Ecology*. Oxford University Press; 2021. doi:10.1093/FEMSEC/FIAA031 PubMed PMID: 32109282.
99. Molin S, Tolker-Nielsen T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd; 2003. p. 255–61. doi:10.1016/S0958-1669(03)00036-3 PubMed PMID: 12849777.
100. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc.; 2019. p. 177–92. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.013 PubMed PMID: 30500353.
101. Jacoby GA. AmpC B-Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009. p. 161–82. doi:10.1128/CMR.00036-08 PubMed PMID: 19136439.
102. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010. p. 969–76. doi:10.1128/AAC.01009-09 PubMed PMID: 19995920.
103. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980 May 16;289(1036):321–31. doi:10.1098/rstb.1980.0049 PubMed PMID: 6109327.

104. Harris PNA, Ferguson JK. Antibiotic therapy for inducible AmpC β -lactamase-producing Gram-negative bacilli: What are the alternatives to carbapenems, quinolones and aminoglycosides? *International Journal of Antimicrobial Agents*. Elsevier B.V.; 2012. p. 297–305. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.06.004 PubMed PMID: 22824371.
105. Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 May;53(5):1766–71. doi:10.1128/AAC.01410-08 PubMed PMID: 19258272.
106. Livermore DM. Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992 Sep;36(9):2046–8. doi:10.1128/AAC.36.9.2046 PubMed PMID: 1329641.
107. Juan C, Torrens G, González-Nicolau M, Oliver A. Diversity and regulation of intrinsic β -lactamases from non-fermenting and other Gram-negative opportunistic pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford University Press; 2017. p. 781–815. doi:10.1093/femsre/fux043 PubMed PMID: 29029112.
108. Moya B, Dötsch A, Juan C, Blázquez J, Zamorano L, Haussler S, et al. β -lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS Pathog*. 2009;5(3). doi:10.1371/journal.ppat.1000353 PubMed PMID: 19325877.
109. Zamorano L, Moyà B, Juan C, Mulet X, Blázquez J, Oliver A. The *Pseudomonas aeruginosa* CreBC two-component system plays a major role in the response to β -lactams, fitness, biofilm growth, and global regulation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(9):5084–95. doi:10.1128/AAC.02556-14 PubMed PMID: 24936599.
110. Jacobs C, Jean-Marie †. Cytosolic Intermediates for Cell Wall Biosynthesis and Degradation Control Inducible-Lactam Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Cell*. 1997.

111. Caille O, Zincke D, Merighi M, Balasubramanian D, Kumari H, Kong KF, et al. Structural and functional characterization of *Pseudomonas aeruginosa* global regulator AmpR. *J Bacteriol.* 2014;196(22):3890–902. doi:10.1128/JB.01997-14 PubMed PMID: 25182487.
112. Cabot G, López-Causapé C, Ocampo-Sosa AA, Sommer LM, Domínguez MÁ, Zamorano L, et al. Deciphering the resistome of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 175 international high-risk clone through whole-genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Dec 1;60(12):7415–23. doi:10.1128/AAC.01720-16 PubMed PMID: 27736752.
113. Shirai T, Akagawa M, Makino M, Ishii M, Arai A, Nagasawa N, et al. Molecular Evolutionary Analyses of the *Pseudomonas*-Derived Cephalosporinase Gene. *Microorganisms.* 2023 Mar 1;11(3). doi:10.3390/microorganisms11030635
114. Karthik M, Kacha S, Rajendran S, Bakthavatchalam YD, Lal B, Walia K, et al. Genetic characteristics and diversity of PDC variants of *Pseudomonas aeruginosa* and its clinical relevance. *Infection, Genetics and Evolution.* 2024 Dec 1;126. doi:10.1016/j.meegid.2024.105701 PubMed PMID: 39653106.
115. Hancock RE. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clinical Infectious Diseases.* 1998 Aug;27 Suppl 1:S93-9. doi:10.1086/514909 PubMed PMID: 9710677.
116. Remans K, Vercammen K, Bodilis J, Cornelis P. Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* 2010. p. 2597–607. doi:10.1099/mic.0.040659-0 PubMed PMID: 20616104.
117. Hancock REW, Decad GM, Nikaido H. Identification of the protein producing transmembrane diffusion pores in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* pa01 *. Vol. 554, *Biochimica et Biophysica Acta.* 1979..
118. Fernández L, Hancock REW. Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2012 Oct;25(4):661–81. doi:10.1128/CMR.00043-12 PubMed PMID: 23034325.

119. Hancock REW, Brinkman FSL. Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annual Review of Microbiology*. 2002. p. 17–38. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160310 PubMed PMID: 12142471.
120. Yoshimura F, Nikaido H. Diffusion of beta-lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985 Jan;27(1):84–92. doi:10.1128/AAC.27.1.84 PubMed PMID: 2580479.
121. Nikaido H, Nikaido K, Harayama S. Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*. 1991 Jan 15;266(2):770–9. doi:10.1016/s0021-9258(17)35239-0 PubMed PMID: 1702438.
122. Sugawara E, Nestorovich EM, Bezrukov SM, Nikaido H. *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF exists in two different conformations. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Jun 16;281(24):16220–9. doi:10.1074/jbc.M600680200 PubMed PMID: 16595653.
123. Bratu S, Landman D, Gupta J, Quale J. Role of AmpD, OprF and penicillin-binding proteins in β -lactam resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol*. 2007 Jun;56(6):809–14. doi:10.1099/jmm.0.47019-0 PubMed PMID: 17510267.
124. Huang H, Hancock REW. The Role of Specific Surface Loop Regions in Determining the Function of the Imipenem-Specific Pore Protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Of Bacteriology*. 1996.
125. Trias J, Nikaido H. Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990 Jan;34(1):52–7. doi:10.1128/AAC.34.1.52 PubMed PMID: 2109575.
126. Trias J, Nikaido H. Protein D2 channel of the *pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *Journal of Biological Chemistry*. 1990 Sep 15;265(26):15680–4. doi:10.1016/s0021-9258(18)55452-1 PubMed PMID: 2118530.

127. Köhler T, Michea-Hamzhepour M, Epp SF, Pechere JC. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999 Feb;43(2):424–7. doi:10.1128/AAC.43.2.424 PubMed PMID: 9925552.
128. Mushtaq S, Ge Y, Livermore DM. Doripenem versus *Pseudomonas aeruginosa* in vitro: Activity against characterized isolates, mutants, and transconjugants and resistance selection potential. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Aug;48(8):3086–92. doi:10.1128/AAC.48.8.3086-3092.2004 PubMed PMID: 15273124.
129. Teelucksingh T, Thompson LK, Cox G. The evolutionary conservation of *Escherichia coli* drug efflux pumps supports physiological functions. *Journal of Bacteriology.* American Society for Microbiology; 2020. doi:10.1128/JB.00367-20 PubMed PMID: 32839176.
130. Blair JMA, Richmond GE, Piddock LJV. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiology.* Future Medicine Ltd.; 2014. p. 1165–77. doi:10.2217/FMB.14.66 PubMed PMID: 25405886.
131. Lorusso AB, Carrara JA, Barroso CDN, Tuon FF, Faoro H. Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI; 2022. doi:10.3390/ijms232415779
132. Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Apr;28(2):337–418. doi:10.1128/CMR.00117-14 PubMed PMID: 25788514.
133. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Dec;44(12):3322–7. doi:10.1128/AAC.44.12.3322-3327.2000 PubMed PMID: 11083635.
134. Srikumar R, Tsang E, Poole K. Contribution of the MexAB-OprM multidrug efflux system to the beta-lactam resistance of penicillin-binding protein and beta-

- lactamase-derepressed mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1999 Oct;44(4):537–40. doi:10.1093/jac/44.4.537 PubMed PMID: 10588316.
135. Adewoye L, Sutherland A, Srikumar R, Poole K. The MexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: Characterization of mutations compromising activity. *J Bacteriol*. 2002;184(15):4308–12. doi:10.1128/JB.184.15.4308-4312.2002 PubMed PMID: 12107151.
136. Morita Y, Sobel ML, Poole K. Antibiotic inducibility of the MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of the antibiotic-inducible PA5471 gene product. *J Bacteriol*. 2006 Mar;188(5):1847–55. doi:10.1128/JB.188.5.1847-1855.2006 PubMed PMID: 16484195.
137. Cao L, Srikumar R, Poole K. MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Identification and characterization of the nalC gene encoding a repressor of PA3720-PA3719. *Mol Microbiol*. 2004 Sep;53(5):1423–36. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04210.x PubMed PMID: 15387820.
138. Morita Y, Cao L, Gould VC, Avison MB, Poole K. nalD encodes a second repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2006 Dec;188(24):8649–54. doi:10.1128/JB.01342-06 PubMed PMID: 17028276.
139. Saito K, Yoneyama H, Nakae T. nalB-type mutations causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the mexR gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *FEMS Microbiol Lett*. 1999 Oct 1;179(1):67–72. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb08709.x PubMed PMID: 10481088.
140. Srikumar R, Paul CJ, Poole K. Influence of Mutations in the mexR Repressor Gene on Expression of the MexA-MexB-OprM Multidrug Efflux System of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Of Bacteriology*. 2000.

141. Sivaneson M, Mikkelsen H, Ventre I, Bordi C, Filloux A. Two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An intricate network mediating fimbrial and efflux pump gene expression. *Mol Microbiol*. 2011 Mar;79(5):1353–66. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07527.x PubMed PMID: 21205015.
142. Liao J, Schurr MJ, Sauera K. The merR-like regulator brlR confers biofilm tolerance by activating multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol*. 2013 Aug;195(15):3352–63. doi:10.1128/JB.00318-13 PubMed PMID: 23687276.
143. Balasubramanian D, Schneper L, Merighi M, Smith R, Narasimhan G, Lory S, et al. The regulatory repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -lactamase regulator AmpR includes virulence genes. *PLoS One*. 2012 Mar 29;7(3). doi:10.1371/journal.pone.0034067 PubMed PMID: 22479525.
144. Tian ZX, Yi XX, Cho A, O’Gara F, Wang YP. CpxR Activates MexAB-OprM Efflux Pump Expression and Enhances Antibiotic Resistance in Both Laboratory and Clinical nalB-Type Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog*. 2016 Oct 1;12(10). doi:10.1371/journal.ppat.1005932 PubMed PMID: 27736975.
145. Evans K, Passador L, Srikumar R, Tsang E, Nezezon J, Poole K. Influence of the MexAB-OprM Multidrug Efflux System on Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Of Bacteriology*. 1998.
146. Maseda H, Sawada I, Saito K, Uchiyama H, Nakae T, Nomura N. 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*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Apr;48(4):1320–8. doi:10.1128/AAC.48.4.1320-1328.2004 PubMed PMID: 15047536.
147. Murata T, Gotoh N, Nishino T. Characterization of outer membrane efflux proteins OpmE, OpmD and OpmB of *Pseudomonas aeruginosa*: molecular cloning and development of specific antisera. *FEMS Microbiol Lett*. 2002 Nov 19;217(1):57–63. doi:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11456.x PubMed PMID: 12445646.

148. Chuanchuen R, Murata T, Gotoh N, Schweizer HP. Substrate-dependent utilization of OprM or OpmH by the *Pseudomonas aeruginosa* MexJK efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 May;49(5):2133–6. doi:10.1128/AAC.49.5.2133-2136.2005 PubMed PMID: 15855547.
149. Schweizer HP. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res.* 2003 Mar 31;2(1):48–62. PubMed PMID: 12917802.
150. Jeannot K, Sobel ML, El Garch F, Poole K, Plésiat P. Induction of the mexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction. *J Bacteriol.* 2005 Aug;187(15):5341–6. doi:10.1128/JB.187.15.5341-5346.2005 PubMed PMID: 16030228.
151. Islam S, Jalal S, Wretling B. Expression of the MexXY efflux pump in amikacin-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection.* 2004;10(10):877–83. doi:10.1111/j.1469-0691.2004.00991.x PubMed PMID: 15373880.
152. Vogne C, Aires JR, Bailly C, Hocquet D, Plésiat P. Role of the Multidrug Efflux System MexXY in the Emergence of Moderate Resistance to Aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 May;48(5):1676–80. doi:10.1128/AAC.48.5.1676-1680.2004 PubMed PMID: 15105120.
153. Yamamoto M, Ueda A, Kudo M, Matsuo Y, Fukushima J, Nakae T, et al. Role of MexZ and PA5471 in transcriptional regulation of mexXY in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (N Y).* 2009;155(10):3312–21. doi:10.1099/mic.0.028993-0 PubMed PMID: 19589837.
154. Fernández L, Gooderham WJ, Bains M, McPhee JB, Wiegand I, Hancock REW. Adaptive resistance to the “last hope” antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Aug 1;54(8):3372–82. doi:10.1128/AAC.00242-10 PubMed PMID: 20547815.

155. Muller C, Plésiat P, Jeannot K. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Mar;55(3):1211–21. doi:10.1128/AAC.01252-10 PubMed PMID: 21149619.
156. Guénard S, Muller C, Monlezun L, Benas P, Broutin I, Jeannot K, et al. Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of *pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Jan;58(1):221–8. doi:10.1128/AAC.01252-13 PubMed PMID: 24145539.
157. Masuda N, Gotoh N, Ohya S, Nishino T. Quantitative Correlation between Susceptibility and OprJ Production in NfxB Mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 1996.
158. Gotoh N, Tsujimoto H, Tsuda M, Okamoto K, Nomura A, Wada T, et al. Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in DeltamexA-mexB-oprM mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Aug;42(8):1938–43. doi:10.1128/AAC.42.8.1938 PubMed PMID: 9687387.
159. Srikumar R, Kon T, Gotoh N, Poole K. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998 Jan;42(1):65–71. doi:10.1128/AAC.42.1.65 PubMed PMID: 9449262.
160. Fraud S, Campigotto AJ, Chen Z, Poole K. MexCD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement in chlorhexidine resistance and induction by membrane-damaging agents dependent upon the AlgU stress response sigma factor. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Dec;52(12):4478–82. doi:10.1128/AAC.01072-08 PubMed PMID: 18838593.
161. Suresh M, Narayanan N, Puthurath Vimal K, Jayasree PR, Manish Kumar PR. Mutational and Phylogenetic Analysis of *nfxB* Gene in Multidrug-Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*; Hyperexpressing MexCD-OprJ Efflux Pump. *Adv Microbiol*. 2019;09(12):993–9. doi:10.4236/aim.2019.912064

162. Purssell A, Poole K. The NfxB repressor of the mexCD-oprJ multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (United Kingdom)*. 2013 Oct;159(PART 10):2058–73. doi:10.1099/mic.0.069286-0 PubMed PMID: 23924707.
163. Poole K, Gotoh N, Tsujimoto H, Zhao Q, Wada A, Yamasaki T, et al. Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*. 1996 Aug;21(4):713–24. doi:10.1046/j.1365-2958.1996.281397.x PubMed PMID: 8878035.
164. Fukuda H, Hosaka M, Iyobe S, Gotoh N, Nishino T, Hirai K. nfxC-Type Quinolone Resistance in a Clinical Isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 1995.
165. Poole K. Outer Membranes and Efflux: The Path to Multidrug Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2002.
166. Llanes C, Köhler T, Patry I, Dehecq B, Van Delden C, Plésiat P. Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Dec;55(12):5676–84. doi:10.1128/AAC.00101-11 PubMed PMID: 21911574.
167. Kumar A, Schweizer HP. Evidence of mexT-independent overexpression of mexEF-oprN multidrug efflux pump of *pseudomonas aeruginosa* in presence of metabolic stress. *PLoS One*. 2011 Oct 24;6(10). doi:10.1371/journal.pone.0026520 PubMed PMID: 22039504.
168. Maseda H, Saito K, Nakajima A, Nakae T. Variation of the mexT gene, a regulator of the MexEF-oprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*. 2000 Nov 1;192(1):107–12. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09367.x PubMed PMID: 11040437.
169. Sobel ML, Neshat S, Poole K. Mutations in PA2491 (mexS) promote MexT-dependent mexEF-oprN expression and multidrug resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2005 Feb;187(4):1246–53. doi:10.1128/JB.187.4.1246-1253.2005 PubMed PMID: 15687188.

170. Westfall LW, Carty NL, Layland N, Kuan P, Colmer-Hamood JA, Hamood AN. *mvaT* mutation modifies the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux operon *mexEF-oprN*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006 Feb;255(2):247–54. doi:10.1111/j.1574-6968.2005.00075.x PubMed PMID: 16448502.
171. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S. Outer Membrane Proteins Responsible for Multiple Drug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy.* 1995.
172. Köhler T, Michéa-Hamzhepour M, Henze U, Gotoh N, Curty LK, Pechère JC. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 1997;23(2):345–54. doi:10.1046/j.1365-2958.1997.2281594.x PubMed PMID: 9044268.
173. Ochs MM, Mccusker MP, Bains M, Hancock REW. Negative Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Porin OprD Selective for Imipenem and Basic Amino Acids. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy.* 1999.
174. Sakhtah H, Koyama L, Zhang Y, Morales DK, Fields BL, Price-Whelan A, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump MexGHI-OpmD transports a natural phenazine that controls gene expression and biofilm development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Jun 21;113(25):E3538–47. doi:10.1073/pnas.1600424113 PubMed PMID: 27274079.
175. Amieva R, Gil-Gil T, Martínez JL, Alcalde-Rico M. The MexJK Multidrug Efflux Pump Is Not Involved in Acquired or Intrinsic Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, but Modulates the Bacterial Quorum Sensing Response. *Int J Mol Sci.* 2022 Jul 1;23(14). doi:10.3390/ijms23147492 PubMed PMID: 35886841.
176. Mima T, Sekiya H, Mizushima T, Kuroda T, Tsuchiya T. Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Immunol.* 2005;49(11):999–1002. doi:10.1111/j.1348-0421.2005.tb03696.x PubMed PMID: 16301811.

177. Chiang AD, Patil PP, Beka L, Youn JH, Launay A, Bonomo RA, et al. Hypermutator strains of *Pseudomonas aeruginosa* reveal novel pathways of resistance to combinations of cephalosporin antibiotics and beta-lactamase inhibitors. *PLoS Biol.* 2022 Nov 1;20(11). doi:10.1371/journal.pbio.3001878 PubMed PMID: 36399436.
178. Perron K, Caille O, Rossier C, Van Delden C, Dumas JL, Köhler T. CzcR-CzcS, a Two-component System Involved in Heavy Metal and Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry.* 2004 Mar 5;279(10):8761–8. doi:10.1074/jbc.M312080200 PubMed PMID: 14679195.
179. Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur J V. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology.* 2006. p. 176–82. doi:10.1016/j.tim.2006.02.006 PubMed PMID: 16537105.
180. Mima T, Joshi S, Gomez-Escalada M, Schweizer HP. Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins. *J Bacteriol.* 2007 Nov;189(21):7600–9. doi:10.1128/JB.00850-07 PubMed PMID: 17720796.
181. Yang L, Chen L, Shen L, Surette M, Duan K. Inactivation of MuxABC-OpmB Transporter System in *Pseudomonas aeruginosa* Leads to Increased Ampicillin and Carbenicillin Resistance and Decreased Virulence. *Journal of Microbiology.* 2011 Feb;49(1):107–14. doi:10.1007/s12275-011-0186-2 PubMed PMID: 21369987.
182. del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Oliver A. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with horizontally-acquired β -lactamases: 2020 update. *International Journal of Antimicrobial Agents.* Elsevier B.V.; 2020. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106196 PubMed PMID: 33045347.
183. Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum β -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection.* Blackwell Publishing Ltd; 2008. p. 42–52. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01861.x PubMed PMID: 18154527.
184. Viedma E, Juan C, Acosta J, Zamorano L, Otero JR, Sanz F, et al. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa*

- isolates producing the extended-spectrum β -lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Nov;53(11):4930–3. doi:10.1128/AAC.00900-09 PubMed PMID: 19738007.
185. Danel F, Hall LM, Gur D, Livermore DM. OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995 Aug;39(8):1881–4. doi:10.1128/AAC.39.8.1881 PubMed PMID: 7486940.
186. Girlich D, Naas T, Nordmann P. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jun;48(6):2043–8. doi:10.1128/AAC.48.6.2043-2048.2004 PubMed PMID: 15155197.
187. Sastre-Femenia MÀ, Fernández-Muñoz A, Gomis-Font MA, Taltavull B, López-Causapé C, Arca-Suárez J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic susceptibility profiles, genomic epidemiology and resistance mechanisms: a nation-wide five-year time lapse analysis. *The Lancet Regional Health - Europe.* 2023 Nov 1;34. doi:10.1016/j.lanepe.2023.100736
188. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents.* 2015 Jun;45(6):568–85. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001 PubMed PMID: 25857949.
189. Hong DJ, Bae IK, Jang IH, Jeong SH, Kang HK, Lee K. Epidemiology and characteristics of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother.* 2015;47(2):81–97. doi:10.3947/ic.2015.47.2.81
190. Bou G, Oliver A, Martínez-Beltrán J. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000 Jun;44(6):1556–61. doi:10.1128/AAC.44.6.1556-1561.2000 PubMed PMID: 10817708.
191. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem

- resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(2):583–8. doi:10.1128/AAC.45.2.583-588.2001 PubMed PMID: 11158758.
192. Poirel L, Marqué S, Héritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Jan;49(1):202–8. doi:10.1128/AAC.49.1.202-208.2005 PubMed PMID: 15616297.
193. Corvec S, Poirel L, Naas T, Drugeon H, Nordmann P. Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-23 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Apr;51(4):1530–3. doi:10.1128/AAC.01132-06 PubMed PMID: 17220422.
194. Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 Carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*1. *Emerg Infect Dis.* 2010 Jan;16(1):35–40. doi:10.3201/eid1601.090852 PubMed PMID: 20031040.
195. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jan;48(1):15–22. doi:10.1128/AAC.48.1.15-22.2004 PubMed PMID: 14693513.
196. Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 May;55(5):2420–3. doi:10.1128/AAC.01452-10 PubMed PMID: 21343451.
197. Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2005. p. 479–87. doi:10.1128/AAC.49.2.479-487.2005 PubMed PMID: 15673721.
198. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates.* 2010;13(6):151–71. doi:10.1016/j.drug.2010.08.003 PubMed PMID: 20833577.

199. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009. p. 582–610. doi:10.1128/CMR.00040-09 PubMed PMID: 19822890.
200. Macía MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Pérez JL, Oliver A. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Aug;49(8):3382–6. doi:10.1128/AAC.49.8.3382-3386.2005 PubMed PMID: 16048951.
201. López-Causapé C, Cabot G, del Barrio-Tofiño E, Oliver A. The versatile mutational resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2018. doi:10.3389/fmicb.2018.00685
202. Juan C, Maciá MD, Gutiérrez O, Vidal C, Pérez JL, Oliver A. Molecular mechanisms of β -lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Nov;49(11):4733–8. doi:10.1128/AAC.49.11.4733-4738.2005 PubMed PMID: 16251318.
203. Cabot G, Bruchmann S, Mulet X, Zamorano L, Moyá B, Juan C, et al. *Pseudomonas aeruginosa* ceftolozane-tazobactam resistance development requires multiple mutations leading to overexpression and structural modification of ampC. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(6):3091–9. doi:10.1128/AAC.02462-13 PubMed PMID: 24637685.
204. Lahiri SD, Johnstone MR, Ross PL, McLaughlin RE, Olivier NB, Alm RA. Avibactam and class C β -lactamases: Mechanism of inhibition, conservation of the binding pocket, and implications for resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Oct 1;58(10):5704–13. doi:10.1128/AAC.03057-14 PubMed PMID: 25022578.
205. Haidar G, Philips NJ, Shields RK, Snyder D, Cheng S, Potoski BA, et al. Ceftolozane-Tazobactam for the Treatment of Multidrug-Resistant *Pseudomonas*

- aeruginosa Infections: Clinical Effectiveness and Evolution of Resistance. *Clinical Infectious Diseases*. 2017 Jul 1;65(1):110–20. doi:10.1093/cid/cix182 PubMed PMID: 29017262.
206. Fraile-Ribot PA, Cabot G, Mulet X, Periañez L, Luisa Martín-Pena M, Juan C, et al. Mechanisms leading to in vivo ceftolozane/tazobactam resistance development during the treatment of infections caused by MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018 Mar 1;73(3):658–63. doi:10.1093/jac/dkx424 PubMed PMID: 29149337.
207. Berrazeg M, Jeannot K, Ntsogo Enguéné VY, Broutin I, Loeffert S, Fournier D, et al. Mutations in β -lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to antipseudomonal cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Oct 1;59(10):6248–55. doi:10.1128/AAC.00825-15 PubMed PMID: 26248364.
208. Fraile-Ribot PA, Mulet X, Cabot G, Del Barrio-Tofiño E, Juan C, Pérez JL, et al. In Vivo Emergence of Resistance to Novel Cephalosporin- β -Lactamase Inhibitor Combinations through the Duplication of Amino Acid D149 from OXA-2 β -Lactamase (OXA-539) in Sequence Type 235 *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Sep;61(9). doi:10.1128/AAC.01117-17 PubMed PMID: 28674059.
209. Arca-Suárez J, Lasarte-Monterrubbio C, Rodiño-Janeiro BK, Cabot G, Vázquez-Ucha JC, Rodríguez-Iglesias M, et al. Molecular mechanisms driving the in vivo development of OXA-10-mediated resistance to ceftolozane/tazobactam and ceftazidime/avibactam during treatment of XDR *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2021;76(1):91–100. doi:10.1093/JAC/DKAA396 PubMed PMID: 33083833.
210. Torrens G, Van Der Schalk TE, Cortes-Lara S, Timbermont L, Del Barrio-Tofiño E, Xavier BB, et al. Susceptibility profiles and resistance genomics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from European ICUs participating in the ASPIRE-ICU trial. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2022 Jul 1;77(7):1862–72. doi:10.1093/jac/dkac122 PubMed PMID: 35451008.

211. Fortunato G, Vaz-Moreira I, Gajic I, Manaia CM. Insight into phylogenomic bias of blaVIM-2 or blaNDM-1 dissemination amongst carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*. 2023 May 1;61(5). doi:10.1016/j.ijantimicag.2023.106788 PubMed PMID: 36924802.
212. Ruedas-López A, Alonso-García I, Lasarte-Monterrubio C, Guijarro-Sánchez P, Gato E, Carlos Vázquez-Ucha J, et al. Selection of AmpC b-Lactamase Variants and Metallo-b-Lactamases Leading to Ceftolozane/Tazobactam and Ceftazidime/Avibactam Resistance during Treatment of MDR/ XDR *Pseudomonas aeruginosa* Infections Mechanisms Of Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* aac.asm.org. 2022.
213. Takemura M, Wise MG, Hackel MA, Sahm DF, Yamano Y. In vitro activity of cefiderocol against MBL-producing Gram-negative bacteria collected in North America and Europe in five consecutive annual multinational SIDERO-WT surveillance studies (2014-2019). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2023 Aug 1;78(8):2019–27. doi:10.1093/jac/dkad200 PubMed PMID: 37390312.
214. Cabot G, Zamorano L, Moyà B, Juan C, Navas A, Blázquez J, et al. Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance and fitness under low and high mutation rates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Mar 1;60(3):1767–78. doi:10.1128/AAC.02676-15 PubMed PMID: 26729493.
215. López-Causapé C, Sommer LM, Cabot G, Rubio R, Ocampo-Sosa AA, Johansen HK, et al. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* mutational resistome in an international Cystic Fibrosis clone. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1). doi:10.1038/s41598-017-05621-5 PubMed PMID: 28717172.
216. Del Barrio-Tofinõ E, Zamorano L, Cortes-Lara S, López-Causape C, Sánchez-Diener I, Cabot G, et al. Spanish nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance mechanisms and epidemiology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019 Jul 1;74(7):1825–35. doi:10.1093/jac/dkz147 PubMed PMID: 30989186.

217. Han S, Caspers N, Zaniewski RP, Lacey BM, Tomaras AP, Feng X, et al. Distinctive attributes of β -lactam target proteins in *Acinetobacter baumannii* relevant to development of new antibiotics. *J Am Chem Soc.* 2011 Dec 21;133(50):20536–45. doi:10.1021/ja208835z PubMed PMID: 22050378.
218. Cabot G, Florit-Mendoza L, Sánchez-Diener I, Zamorano L, Oliver A. Deciphering β -lactamase-independent β -lactam resistance evolution trajectories in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2018 Dec 1;73(12):3322–31. doi:10.1093/jac/dky364 PubMed PMID: 30189050.
219. Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(2):337–418. doi:10.1128/CMR.00117-14 PubMed PMID: 25788514.
220. Shields RK, Stellfox ME, Kline EG, Samanta P, Van Tyne D. Evolution of Imipenem-Relebactam Resistance Following Treatment of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases.* 2022 Aug 15;75(4):710–4. doi:10.1093/cid/ciac097 PubMed PMID: 35136967.
221. Hocquet D, Petitjean M, Rohmer L, Valot B, Kulasekara HD, Bedel E, et al. Pyomelanin-producing *Pseudomonas aeruginosa* selected during chronic infections have a large chromosomal deletion which confers resistance to pyocins. *Environ Microbiol.* 2016 Oct 1;18(10):3482–93. doi:10.1111/1462-2920.13336 PubMed PMID: 27119970.
222. Dötsch A, Becker T, Pommerenke C, Magnowska Z, Jänsch L, Häussler S. Genomewide identification of genetic determinants of antimicrobial drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Jun;53(6):2522–31. doi:10.1128/AAC.00035-09 PubMed PMID: 19332674.
223. Alvarez-Ortega C, Wiegand I, Olivares J, Hancock REW, Martínez JL. Genetic determinants involved in the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Oct;54(10):4159–67. doi:10.1128/AAC.00257-10 PubMed PMID: 20679510.

224. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*. 2003 Dec 6;362(9399):1888–93. doi:10.1016/S0140-6736(03)14959-8 PubMed PMID: 14667745.
225. Choi YJ, Kim YA, Junglim K, Jeong SH, Shin JH, Shin KS, et al. Emergence of NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* Sequence Type 773 Clone: Shift of Carbapenemase Molecular Epidemiology and Spread of 16S rRNA Methylase Genes in Korea. *Ann Lab Med*. 2023 Mar 1;43(2):196–9. doi:10.3343/alm.2023.43.2.196 PubMed PMID: 36281514.
226. Prickett MH, Hauser AR, McColley SA, Cullina J, Potter E, Powers C, et al. Aminoglycoside resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis results from convergent evolution in the *mexZ* gene. *Thorax*. 2017 Jan 1;72(1):40–7. doi:10.1136/thoraxjnl-2015-208027 PubMed PMID: 27325751.
227. Bruchmann S, Dötsch A, Nouri B, Chaberny IF, Häussler S. Quantitative contributions of target alteration and decreased drug accumulation to *pseudomonas aeruginosa* fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Mar;57(3):1361–8. doi:10.1128/AAC.01581-12 PubMed PMID: 23274661.
228. 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 Apr 1;60(4):2302–10. doi:10.1128/AAC.02622-15 PubMed PMID: 26833155.
229. Shortridge D, Pfaller MA, Arends SJR, Raddatz J, Depestel DD, Flamm RK. Comparison of the in Vitro Susceptibility of Ceftolozane-Tazobactam with the Cumulative Susceptibility Rates of Standard Antibiotic Combinations When Tested against *Pseudomonas aeruginosa* from ICU Patients with Bloodstream Infections or Pneumonia. *Open Forum Infect Dis*. 2019 Jun 1;6(6). doi:10.1093/ofid/ofz240
230. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2014. doi:10.3389/fmicb.2014.00643

231. Jeannot K, Bolard A, Plésiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents*. 2017 May 1;49(5):526–35. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.11.029 PubMed PMID: 28163137.
232. Barrow K, Kwon DH. Alterations in two-component regulatory systems of *phoPQ* and *pmrAB* are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Dec;53(12):5150–4. doi:10.1128/AAC.00893-09 PubMed PMID: 19752280.
233. Gutu AD, Sgambati N, Strasbourger P, Brannon MK, Jacobs MA, Haugen E, et al. Polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* *phoQ* mutants is dependent on additional two-component regulatory systems. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 May;57(5):2204–15. doi:10.1128/AAC.02353-12 PubMed PMID: 23459479.
234. Michalopoulos AS, Livaditis IG, Gougoutas V. The revival of fosfomycin. *International Journal of Infectious Diseases*. 2011. doi:10.1016/j.ijid.2011.07.007 PubMed PMID: 21945848.
235. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. Academic Press Inc.; 2016. p. 1–8. doi:10.1016/j.ygeno.2015.11.003 PubMed PMID: 26554401.
236. Mustafa AS. Whole Genome Sequencing: Applications in Clinical Bacteriology. *Medical Principles and Practice*. S. Karger AG; 2024. p. 185–97. doi:10.1159/000538002 PubMed PMID: 38402870.
237. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group; 2016. p. 333–51. doi:10.1038/nrg.2016.49 PubMed PMID: 27184599.
238. Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, Couto N, Ferdous M, García-Cobos S, et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J Biotechnol*. 2017 Feb 10;243:16–24. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.12.022 PubMed PMID: 28042011.

239. Dorado G, Gálvez S, Budak H, Unver T, Hernández P. Nucleic-acid sequencing. In: Encyclopedia of Biomedical Engineering. Elsevier; 2019. p. 443–60. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.08998-4
240. Vilne B, Meistere I, Grantiņa-Ieviņa L, Ķibilds J. Machine learning approaches for epidemiological investigations of food-borne disease outbreaks. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2019. doi:10.3389/fmicb.2019.01722
241. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resistance Updates*. Churchill Livingstone; 2015. p. 41–59. doi:10.1016/j.drug.2015.08.002 PubMed PMID: 26304792.
242. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 2011. p. 736–55. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x PubMed PMID: 21303394.
243. Oliver A, Rojo-Molinero E, Arca-Suarez J, Bešli Y, Bogaerts P, Cantón R, et al. *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial susceptibility profiles, resistance mechanisms and international clonal lineages: update from ESGARS-ESCMID/ISARPAE Group. *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V.; 2024. p. 469–80. doi:10.1016/j.cmi.2023.12.026 PubMed PMID: 38160753.
244. Jung H, Pitout JDD, Matsumura Y, Strydom KA, Kingsburgh C, Ehlers MM, et al. Genomic epidemiology and molecular characteristics of bla NDM-1-positive carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* belonging to international high-risk clone ST773 in the Gauteng region, South Africa. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2024 Apr 1;43(4):627–40. doi:10.1007/s10096-024-04763-5 PubMed PMID: 38265603.
245. Treepong P, Kos VN, Guyeux C, Blanc DS, Bertrand X, Valot B, et al. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. *Clinical Microbiology and Infection*. 2018 Mar 1;24(3):258–66. doi:10.1016/j.cmi.2017.06.018 PubMed PMID: 28648860.

246. Kocsis B, Gulyás D, Szabó D. Diversity and distribution of resistance markers in pseudomonas aeruginosa international high-risk clones. *Microorganisms*. MDPI AG; 2021. p. 1–14. doi:10.3390/microorganisms9020359
247. Vatcheva-Dobrevska R, Mulet X, Ivanov I, Zamorano L, Dobрева E, Velinov T, et al. Molecular epidemiology and multidrug resistance mechanisms of pseudomonas aeruginosa isolates from bulgarian hospitals. *Microbial Drug Resistance*. 2013 Oct 1;19(5):355–61. doi:10.1089/mdr.2013.0004 PubMed PMID: 23600605.
248. Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa – Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resistance Updates*. 2019 May 1;44. doi:10.1016/j.drug.2019.07.002 PubMed PMID: 31492517.
249. Bush K, Bradford PA. β -lactams and β -lactamase inhibitors: An overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 Aug 1;6(8). doi:10.1101/cshperspect.a025247 PubMed PMID: 27329032.
250. Bush K. Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clin Microbiol Rev*. 1988 Jan;1(1):109–23. doi:10.1128/CMR.1.1.109 PubMed PMID: 3060240.
251. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010. p. 160–201. doi:10.1128/CMR.00037-09 PubMed PMID: 20065329.
252. Ehmann DE, Jahić H, Ross PL, Gu RF, Hu J, Kern G, et al. Avibactam is a covalent, reversible, non- β -lactam β -lactamase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jul 17;109(29):11663–8. doi:10.1073/pnas.1205073109 PubMed PMID: 22753474.
253. Zhanel GG, Chung P, Adam H, Zelenitsky S, Denisuk A, Schweizer F, et al. Ceftolozane/tazobactam: A novel cephalosporin/ β -lactamase inhibitor combination with activity against multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Drugs*. Springer International Publishing; 2014. p. 31–51. doi:10.1007/s40265-013-0168-2 PubMed PMID: 24352909.

254. Papp-Wallace KM, Bonomo RA. New β -Lactamase Inhibitors in the Clinic. *Infectious Disease Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2016. p. 441–64. doi:10.1016/j.idc.2016.02.007 PubMed PMID: 27208767.
255. Sorbera M, Chung E, Ho CW, Marzella N. Ceftolozane/Tazobactam: a new option in the treatment of complicated gram-negative infections. *P & T*. 2014 Dec;39(12):825–32. PubMed PMID: 25516692.
256. Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, et al. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(4). doi:10.1128/CMR.00031-19 PubMed PMID: 31462403.
257. Abboud MI, Damblon C, Brem J, Smargiasso N, Mercuri P, Gilbert B, et al. Interaction of avibactam with class B metallo- β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Oct 1;60(10):5655–62. doi:10.1128/AAC.00897-16 PubMed PMID: 27401561.
258. Yahav D, Giske CG, Gramatniece A, Abodakpi H, Tam VH, Leibovici L. New β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations. *Clin Microbiol Rev*. 2021 Jan 1;34(1):1–61. doi:10.1128/CMR.00115-20 PubMed PMID: 33177185.
259. Papp-Wallace KM. The latest advances in β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations for the treatment of Gram-negative bacterial infections. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. Taylor and Francis Ltd; 2019. p. 2169–84. doi:10.1080/14656566.2019.1660772 PubMed PMID: 31500471.
260. Palacios-Baena ZR, Oteo J, Conejo C, Larrosa MN, Bou G, Fernández-Martínez M, et al. Comprehensive clinical and epidemiological assessment of colonisation and infection due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Spain. *Journal of Infection*. 2016 Feb 1;72(2):152–60. doi:10.1016/j.jinf.2015.10.008 PubMed PMID: 26546855.
261. O'Donnell JN, Lodise TP. New Perspectives on Antimicrobial Agents: Imipenem-Relebactam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology; 2022. doi:10.1128/aac.00256-22 PubMed PMID: 35727059.

262. Fraile-Ribot PA, Zamorano L, Orellana R, Del Barrio-Tofiño E, Sánchez-Diener I, Cortes-Lara S, et al. Activity of Imipenem-Relebactam against a Large Collection of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates and Isogenic β -Lactam-Resistant Mutants. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020 Jan 27;64(2). doi:10.1128/AAC.02165-19 PubMed PMID: 31740559.
263. Bassetti M, Echols R, Matsunaga Y, Ariyasu M, Doi Y, Ferrer R, et al. Efficacy and safety of cefiderocol or best available therapy for the treatment of serious infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria (CREDIBLE-CR): a randomised, open-label, multicentre, pathogen-focused, descriptive, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis.* 2021 Feb 1;21(2):226–40. doi:10.1016/S1473-3099(20)30796-9 PubMed PMID: 33058795.
264. Sato T, Yamawaki K. Cefiderocol: Discovery, Chemistry, and in Vivo Profiles of a Novel Siderophore Cephalosporin. *Clinical Infectious Diseases.* 2019 Nov 13;69:S538–43. doi:10.1093/cid/ciz826 PubMed PMID: 31724047.
265. Aslan AT, Ezure Y, Horcajada JP, Harris PNA, Paterson DL. In vitro, in vivo and clinical studies comparing the efficacy of ceftazidime-avibactam monotherapy with ceftazidime-avibactam-containing combination regimens against carbapenem-resistant Enterobacterales and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates or infections: a scoping review. *Frontiers in Medicine.* Frontiers Media SA; 2023. doi:10.3389/fmed.2023.1249030
266. Barbosa C, Beardmore R, Schulenburg H, Jansen G. Antibiotic combination efficacy (ACE) networks for a *Pseudomonas aeruginosa* model. *PLoS Biol.* 2018 Apr 30;16(4). doi:10.1371/journal.pbio.2004356 PubMed PMID: 29708964.
267. Scudeller L, Righi E, Chiamenti M, Bragantini D, Menchinelli G, Cattaneo P, et al. Systematic review and meta-analysis of in vitro efficacy of antibiotic combination therapy against carbapenem-resistant Gram-negative bacilli. *International Journal of Antimicrobial Agents.* Elsevier B.V.; 2021. doi:10.1016/j.ijantimicag.2021.106344 PubMed PMID: 33857539.

268. Usman M, Markus A, Fatima A, Aslam B, Zaid M, Khattak M, et al. Synergistic Effects of Gentamicin, Cefepime, and Ciprofloxacin on Biofilm of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Drug Resist.* 2023;16:5887–98. doi:10.2147/IDR.S426111
269. Khan A, Erickson SG, Pettaway C, Arias CA, Miller WR, Bhatti MM. Evaluation of Susceptibility Testing Methods for Aztreonam and Ceftazidime-Avibactam Combination Therapy on Extensively Drug-Resistant Gram-Negative Organisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021 Oct 18;65(11):e0084621. doi:10.1128/AAC.00846-21 PubMed PMID: 34424044.
270. Zhang Y, Zhao J, Han J, Fan Y, Xiong Z, Zou X, et al. Synergistic Activity of Imipenem in Combination with Ceftazidime/Avibactam or Avibactam against Non-MBL-Producing Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Spectr.* 2022 Apr 27;10(2). doi:10.1128/spectrum.02740-21 PubMed PMID: 35315696.
271. Mikhail S, Singh NB, Kebriaei R, Rice SA, Stamper KC, Castanheira M, et al. Evaluation of the Synergy of Ceftazidime-Avibactam in Combination with Meropenem, Amikacin, Aztreonam, Colistin, or Fosfomycin against Well-Characterized Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019 Aug;63(8). doi:10.1128/AAC.00779-19 PubMed PMID: 31182535.
272. Fouad A, Nicolau DP, Gill CM. In vitro synergy of the combination of sulbactam-durllobactam and cefepime at clinically relevant concentrations against *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and Enterobacterales. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2023 Dec 1;78(12):2801–9. doi:10.1093/jac/dkad244 PubMed PMID: 37839896.
273. Zheng Z, Shao Z, Lu L, Tang S, Shi K, Gong F, et al. Ceftazidime/avibactam combined with colistin: a novel attempt to treat carbapenem-resistant Gram-negative bacilli infection. *BMC Infect Dis.* 2023 Dec 1;23(1). doi:10.1186/s12879-023-08715-w PubMed PMID: 37864200.

274. Kaye KS, Marchaim D, Thamlikitkul V, Carmeli Y, Chiu CH, Daikos G, et al. Colistin Monotherapy versus Combination Therapy for Carbapenem-Resistant Organisms. *NEJM Evidence*. 2023 Jan;2(1). doi:10.1056/evidoa2200131
275. Nazli E, Zer Y, Eksi F. In vitro efficacy of various antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Journal of International Medical Research*. 2015 Apr 19;43(2):217–25. doi:10.1177/0300060514553490 PubMed PMID: 25547417.
276. Ma W, Li J, Wang D, Yu C, Sun S. In vitro interaction of various antibiotic combinations recommended by Chinese consensus statement against carbapenems-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Lett Appl Microbiol*. 2019;69(3):198–203. doi:10.1111/lam.13193 PubMed PMID: 31236975.
277. Chen YH, Peng CF, Lu PL, Tsai JJ, Chen TP. In vitro activities of antibiotic combinations against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 2004;20(6):261–7. doi:10.1016/s1607-551x(09)70116-0 PubMed PMID: 15253466.
278. Dundar D, Otkun M. In-vitro efficacy of synergistic antibiotic combinations in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Yonsei Med J*. 2010 Jan;51(1):111–6. doi:10.3349/ymj.2010.51.1.111 PubMed PMID: 20046523.
279. Ghorbani H, Memar MY, Sefidan FY, Yekani M, Ghotaslou R. In vitro synergy of antibiotic combinations against planktonic and biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. *GMS Hyg Infect Control*. 2017;12:Doc17. doi:10.3205/dgkh000302 PubMed PMID: 29094001.
280. Garza-Ramos U, Silva-Sánchez J, López-Jácome LE, Hernández-Durán M, Colín-Castro CA, Sánchez-Pérez A, et al. Carbapenemase-Encoding Genes and Colistin Resistance in Gram-Negative Bacteria During the COVID-19 Pandemic in Mexico: Results from the Invifar Network. *Microb Drug Resist*. 2023 Jun;29(6):239–48. doi:10.1089/mdr.2022.0226 PubMed PMID: 36595348.
281. Qin X, Emerson J, Stapp J, Stapp L, Abe P, Burns JL. Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2003 Sep

- 1;41(9):4312–7. doi:10.1128/JCM.41.9.4312-4317.2003 PubMed PMID: 12958262.
282. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 12th ed. CLSI standard M07. Wayne, PA; 2022.
283. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 35th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA; 2025.
284. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007 Aug 10;115(8):891–9. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x PubMed PMID: 17696944.
285. Vuotto C, Longo F, Pascolini C, Donelli G, Balice MP, Libori MF, et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *J Appl Microbiol*. 2017 Oct 1;123(4):1003–18. doi:10.1111/jam.13533 PubMed PMID: 28731269.
286. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *Journal Of Clinical Microbiology*. 1999.
287. Bellio P, Fagnani L, Nazzicone L, Celenza G. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. *MethodsX*. 2021 Jan 1;8. doi:10.1016/j.mex.2021.101543 PubMed PMID: 34754811.
288. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug 1;30(15):2114–20. doi:10.1093/bioinformatics/btu170 PubMed PMID: 24695404.

289. Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Korobeynikov A. Using SPAdes De Novo Assembler. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2020 Jun 1;70(1). doi:10.1002/cpbi.102 PubMed PMID: 32559359.
290. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res*. 2018;3. doi:10.12688/wellcomeopenres.14826.1
291. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *J Clin Microbiol*. 2010 Apr 1;48(4):1169–75. doi:10.1128/JCM.01881-09 PubMed PMID: 20164271.
292. Anuj SN, Whiley DM, Kidd TJ, Bell SC, Wainwright CE, Nissen MD, et al. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by a duplex real-time polymerase chain reaction assay targeting the *ecfX* and the *gyrB* genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 Feb;63(2):127–31. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2008.09.018 PubMed PMID: 19026507.
293. Lee CS, Wetzel K, Buckley T, Wozniak D, Lee J. Rapid and sensitive detection of *Pseudomonas aeruginosa* in chlorinated water and aerosols targeting *gyrB* gene using real-time PCR. *J Appl Microbiol*. 2011;111(4):893–903. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05107.x PubMed PMID: 21794031.
294. Wang C, Ye Q, Jiang A, Zhang J, Shang Y, Li F, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Detection Using Conventional PCR and Quantitative Real-Time PCR Based on Species-Specific Novel Gene Targets Identified by Pangenome Analysis. *Front Microbiol*. 2022 May 4;13. doi:10.3389/fmicb.2022.820431
295. Sader HS, Farrell DJ, Castanheira M, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial activity of ceftolozane/tazobactam tested against *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriaceae with various resistance patterns isolated in European hospitals (2011-12). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014 Oct 1;69(10):2713–22. doi:10.1093/jac/dku184 PubMed PMID: 24917579.

296. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net). Annual Epidemiological Report 2023. [Internet]. Stockholm; 2024 Nov. Available from: <https://atlas.ecdc.europa.eu/>
297. Rojas-Larios F, Martínez-Guerra BA, López-Jácome LE, Bolado-Martínez E, Vázquez-Larios M del R, Velázquez-Acosta M del C, et al. Active Surveillance of Antimicrobial Resistance and Carbapenemase-Encoding Genes According to Sites of Care and Age Groups in Mexico: Results from the INVIFAR Network. *Pathogens*. 2023 Sep 1;12(9). doi:10.3390/pathogens12091144
298. Garza-Ramos U, Silva-Sánchez J, López-Jácome LE, Hernández-Durán M, Colín-Castro CA, Sánchez-Pérez A, et al. Carbapenemase-Encoding Genes and Colistin Resistance in Gram-Negative Bacteria During the COVID-19 Pandemic in Mexico: Results from the Invifar Network. *Microbial Drug Resistance*. 2023 Jun 1;29(6):239–48. doi:10.1089/mdr.2022.0226
299. Hilbert DW, DeRyke CA, Motyl M, Hackel M, Young K. Relebactam restores susceptibility of resistant *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacterales and enhances imipenem activity against chromosomal AmpC-producing species: analysis of global SMART 2018–2020. *BMC Microbiol*. 2023 Dec 1;23(1). doi:10.1186/s12866-023-02864-3 PubMed PMID: 37312049.
300. Freed, Jr S, Hanson ND. AmpC induction by imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* occurs in the absence of OprD and impacts imipenem/relebactam susceptibility . *Microbiol Spectr*. 2024 Nov 5;12(11). doi:10.1128/spectrum.00142-24 PubMed PMID: 39315808.
301. Mendes Pedro D, Paulo SE, Santos CM, Fonseca AB, Melo Cristino J, Pereira AA, et al. Extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical features and treatment with ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam in a tertiary care university hospital center in Portugal – A cross-sectional and retrospective observational study. *Front Microbiol*. 2024;15. doi:10.3389/fmicb.2024.1347521
302. Weber C, Schultze T, Göttig S, Kessel J, Schröder A, Tietgen M, et al. Antimicrobial Activity of Ceftolozane-Tazobactam, Ceftazidime-Avibactam, and Cefiderocol

- against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Recovered at a German University Hospital. *Microbiol Spectr.* 2022 Oct 26;10(5). doi:10.1128/spectrum.01697-22 PubMed PMID: 36190424.
303. Giovagnorio F, De Vito A, Madeddu G, Parisi SG, Geremia N. Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: A Narrative Review of AntibioGram Interpretation and Emerging Treatments. *Antibiotics*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023. doi:10.3390/antibiotics12111621
304. Long WM, Xu WX, Hu Q, Qu Q, Wu XL, Chen Y, et al. The efficacy and safety of ceftazidime/avibactam or polymyxin B based regimens for carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection: a multicenter real-world and propensity score-matched study. *Front Pharmacol.* 2025;16. doi:10.3389/fphar.2025.1533952
305. Xie X, Liu Z, Huang J, Wang X, Tian Y, Xu P, et al. Molecular epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a hospital in Fujian, China. *Front Microbiol.* 2024;15. doi:10.3389/fmicb.2024.1431154
306. Tian M, Yan B, Jiang R, Liu C, Li Y, Xu B, et al. Activity of polymyxin B combined with cefepime-avibactam against the biofilms of polymyxin B-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in in vitro and in vivo models. *BMC Microbiol.* 2024 Dec 1;24(1). doi:10.1186/s12866-024-03571-3 PubMed PMID: 39407114.
307. Kostoulias X, Fu Y, Morris FC, Yu C, Qu Y, Chang CC, et al. Ceftolozane/tazobactam disrupts *Pseudomonas aeruginosa* biofilms under static and dynamic conditions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2025 Feb 1;80(2):372–80. doi:10.1093/jac/dkae413 PubMed PMID: 39657684.
308. Valero A, Rodríguez-Gascón A, Isla A, Barrasa H, Del Barrio-Tofiño E, Oliver A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility in Spain: Antimicrobial activity and resistance suppression evaluation by pk/pd analysis. *Pharmaceutics.* 2021 Nov 1;13(11). doi:10.3390/pharmaceutics13111899

309. Teo JQ, Toh JH, Chang HY, Tan SH, Ho JJY, Ong ZW, et al. Personalised bactericidal combination regimens against carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Communications Medicine*. 2025 Dec 1;5(1). doi:10.1038/s43856-025-01022-2
310. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009. p. 582–610. doi:10.1128/CMR.00040-09 PubMed PMID: 19822890.
311. López-Causapé C, Cabot G, del Barrio-Tofiño E, Oliver A. The versatile mutational resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2018. doi:10.3389/fmicb.2018.00685
312. Kos VN, Déraspe M, McLaughlin RE, Whiteaker JD, Roy PH, Alm RA, et al. The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Jan 1;59(1):427–36. doi:10.1128/AAC.03954-14 PubMed PMID: 25367914.
313. Del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Cabot G, Rivera A, Benito N, Segura C, et al. Genomics and susceptibility profiles of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Nov 1;61(11). doi:10.1128/AAC.01589-17 PubMed PMID: 28874376.
314. Ito A, Nishikawa T, Matsumoto S, Yoshizawa H, Sato T, Nakamura R, et al. Siderophore cephalosporin cefiderocol utilizes ferric iron transporter systems for antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Dec 1;60(12):7396–401. doi:10.1128/AAC.01405-16 PubMed PMID: 27736756.
315. Gomis-Font MA, Clari MA, López-Causapé C, Navarro D, Oliver A. Emergence of cefiderocol resistance during ceftazidime/ avibactam treatment caused by a large genomic deletion, including *ampD* and *piuCD* genes, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2024 Jan 1;68(1). doi:10.1128/aac.01192-23 PubMed PMID: 38063398.

316. López-Causapé C, Sommer LM, Cabot G, Rubio R, Ocampo-Sosa AA, Johansen HK, et al. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* mutational resistome in an international Cystic Fibrosis clone. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1). doi:10.1038/s41598-017-05621-5 PubMed PMID: 28717172.
317. Mack AR, Hujer AM, Mojica MF, Taracila MA, Feldgarden M, Haft DH, et al. β -Lactamase diversity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2025 Mar 1;69(3). doi:10.1128/aac.00785-24 PubMed PMID: 39927781.
318. Cortes-Lara S, Barrio-Tofiño E del, López-Causapé C, Oliver A, Martínez-Martínez L, Bou G, et al. Predicting *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility phenotypes from whole genome sequence resistome analysis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2021 Nov 1;27(11):1631–7. doi:10.1016/j.cmi.2021.05.011 PubMed PMID: 34015532.
319. Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: Quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci*. 2015 Sep 1;1354(1):12–31. doi:10.1111/nyas.12830 PubMed PMID: 26190223.
320. Fernández RF, Carrasco AB, Porcuna NC, Cabezas AM, Ruiz MC. Cefiderocol Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* ST175: A Case Report with Genomic Analysis. *Antibiotics*. 2025 Nov 1;14(11). doi:10.3390/antibiotics14111162

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Q.F.B. Luis Jacob Romero Chávez

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Farmacia

Tesis: EVALUACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO DE ANTIMICROBIANOS EN LA BIOPELÍCULA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa*.

Campo de estudio: Estudio de compuestos con actividad farmacológica.

Datos personales: Nacido en Ciudad Victoria, Tamaulipas, el 24 de agosto del 2000, hijo de Moisés Romero Rodríguez y Alma Gregoria Chávez Perales.

Educación: Egresado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en el año 2023, con el grado de Químico Farmacéutico Biólogo.

ANEXOS

Anexo 1. Resultados de la combinación Imipenem/Relebactam— Polimixina B.

Aislamiento	MBIC µg/mL IMR—PB	FIC	% de crecimiento
21-105	16—0.03125	0.13	2.71
21-128	8—0.0625	0.13	18.47
21-259	2—0.03125	0.02	1.19
21-269	1—0.03125	0.0049	1.16
21-660	4—0.03125	0.04	3.51
21-661	4—0.03125	0.07	3.98
21-662	16—0.0625	0.06	12.62
21-663	4—0.03125	0.02	3.51
21-674	2—0.5	0.02	1.79
21-788	2—0.03125	0.02	3.05

Anexo 2. Resultados de la combinación Imipenem/Relebactam— Colistina.

Aislamiento	MBIC µg/mL IMR—CL	FIC	% de crecimiento
21-105	8—1	0.13	6.27
21-128	16—0.03125	0.25	4.00
21-259	2—0.03125	0.02	1.27
21-269	1—0.03125	0.0059	1.65
21-660	4—0.03125	0.04	13.3
21-661	2—0.25	0.06	3.71
21-662	1—1	0.02	8.37
21-663	2—0.25	0.02	2.34
21-674	2—0.125	0.01	5.84
21-788	2—0.015625	0.02	1.23

Anexo 3. Resultados de la combinación Imipenem/Relebactam— Cefepime.

Aislamiento	MBIC µg/mL IMR—FEP	FIC	% de crecimiento
21-105	8—8	0.07	3.20
21-128	4—8	0.07	19.56
21-259	2—8	0.03	7.43
21-269	1—0.125	0.004	9.77
21-660	0.5—8	0.02	2.99

21-661	0.25—8	0.01	6.78
21-662	0.25—64	0.02	4.99
21-663	0.5—0.125	0.0022	11.88
21-674	0.5—8	0.01	4.67
21-788	1—0.0625	0.01	8.91

Anexo 4. Resultados de la combinación Ceftazidima/Avibactam— Polimixina B.

Aislamiento	MBIC µg/mL CZA—PB	FIC	% de crecimiento
21-105	64—4	0.56	2.1
21-128	64—05	0.16	13.76
21-259	16—4	0.63	0.63
21-269	32—8	0.28	0.36
21-660	16—2	0.38	5.98
21-661	8—4	0.56	2.10
21-662	64—8	0.31	1.21
21-663	4—0.015625	0.03	16.52
21-674	4—8	0.26	2.07
21-788	64—8	1.06	7.01

Anexo 5. Resultados de la combinación Ceftazidima/Avibactam— Colistina.

Aislamiento	MBIC µg/mL CZA—CL	FIC	% de crecimiento
21-105	64—8	0.56	1.63
21-128	64—2	0.25	4.67
21-259	32—4	1.25	1.29
21-269	64—8	0.56	1.45
21-660	8—4	0.56	1.57
21-661	8—8	1.06	2.23
21-662	64—4	0.13	1.05
21-663	8—8	0.56	1.99
21-674	64—2	0.19	4.64
21-788	32—8	0.28	1.87

Anexo 6. Resultados de la combinación Ceftazidima/Avibactam— Cefepime.

Aislamiento	MBIC µg/mL CZA—FEP	FIC	% de crecimiento
-------------	-----------------------	-----	------------------

21-105	0.5—64	0.06	13.15
21-128	0.5—128	0.13	4.21
21-259	1—4	0.02	10.53
21-269	0.5—32	0.03	2.90
21-660	1—8	0.02	15.95
21-661	2—16	0.03	8.11
21-662	0.5—128	0.03	4.46
21-663	0.5—2	0.0078	7.72
21-674	4—16	0.02	8.87
21-788	0.5—32	0.03	6.39

Anexo 7. Resultados de la combinación Ceftolozano/Tazobactam— Polimixina B.

Aislamiento	MBIC µg/mL CT—PB	FIC	% de crecimiento
21-105	0.5—16	2	2.99
21-128	0.5—16	1	15.67
21-259	1—0.03125	0.16	12.18
21-269	32—1	0.19	4.83
21-660	32—4	0.66	14.72
21-661	32—4	0.66	2.66
21-662	32—8	0.41	11.76
21-663	2—0.03125	0.011	16.78
21-674	32—4	0.29	9.51
21-788	64—8	1.32	6.34

Anexo 8. Resultados de la combinación Ceftolozano/Tazobactam— Colistina.

Aislamiento	MBIC µg/mL CT—CL	FIC	% de crecimiento
21-105	0.5—16	1	1.21
21-128	0.5—16	1	1.63
21-259	1—0.015625	0.16	8.70
21-269	64—0.0078125	0.32	1.17
21-660	16—4	0.58	2.88
21-661	16—2	0.21	8.27
21-662	2—8	0.14	2.55
21-663	2—0.03125	0.012	9.44
21-674	16—8	0.33	2.97
21-788	64—8	0.57	10.99

Anexo 9. Resultados de la combinación Ceftolozano/Tazobactam— Cefepime.

Aislamiento	MBIC µg/mL CT—FEP	FIC	% de crecimiento
21-105	64—128	>.45	51.58
21-128	64—128	0.45	15.82
21-259	1—2	0.16	18.29
21-269	1—1	0.01	13.74
21-660	0.5—64	0.13	9.41
21-661	4—32	0.05	14.19
21-662	64—128	>.35	51.92
21-663	4—0.25	0.02	14.48
21-674	64—128	0.45	16.94
21-788	2—128	0.14	6.76

Anexo 10. Calidad del ADN extraído.

Aislamiento	Concentración ADN (ng/µL)	Relación A260/280	Relación A260/230	Concentración ADNbc (ng/µL)
681	141.584	1.952	2.093	4.42
684	430.121	2.024	2.238	5.58
694	816.558	1.933	2.214	11.4
936	1007.638	1.926	2.202	3.7
21-105	249.219	2.001	2.052	3.72
21-128	1282.933	1.964	2.223	7.68
21-220	452.399	2.077	2.334	4.88
21-221	490.658	2.028	2.221	6
21-249	410.225	1.943	2.121	10.2
21-255	628.656	1.957	2.246	4.48
21-259	720.102	1.957	2.215	5.18
21-269	1203.05	2.049	2.305	5.58
21-282	497.87	1.973	2.194	10.6
21-283	159.225	2.05	1.99	4.04
21-322	940.901	2.063	2.331	4.6
21-429	916.287	1.994	2.261	5.42
21-447	734.136	2.036	2.341	8.94
21-449	534.714	1.956	1.88	4.36
21-474	187.755	2.092	2.23	3.82
21-618	571.539	2.016	2.217	4.56
21-629	985.443	1.966	2.19	6.54
21-631	745.869	1.938	2.089	4.18
21-632	922.646	1.931	2.186	11.6

21-634	711.162	1.945	2.207	5.56
21-650	1013.667	1.95	2.193	3.66
21-659	757.8	1.956	2.188	9.52
21-660	997.501	1.942	2.174	11.2
21-661	563.921	1.941	2.149	9.88
21-662	682.629	1.944	2.219	8.3
21-663	500.676	1.945	2.155	6.66
21-667	1035.859	1.924	2.157	9.76
21-674	738.502	1.952	2.146	5.86
21-788	518.718	1.933	2.156	8.7
21-805	436.905	1.94	2.111	7.02
21-807	1164.516	1.939	2.162	11.4
21-808	654.089	1.974	2.248	8.16
21-811	79.004	1.939	2.056	11.6
21-817	94.243	1.934	2.019	11.8

Anexo 11. Resultados de tipificación de secuencias multilocus (MLST).

Aislamiento	Secuencia tipo
681	3428
684	360
694	4409
936	3426
21-105	235
21-128	235
21-220	3205
21-221	235
21-249	235
21-255	235
21-259	1930
21-269	Nueva
21-282	Nueva
21-283	308
21-322	293
21-429	275
21-447	3428
21-449	Nueva
21-474	244
21-618	253
21-629	253
21-631	235
21-632	260

21-634	2235
21-650	235
21-659	309
21-660	3045
21-661	3045
21-662	309
21-663	2281
21-667	2281
21-674	3045
21-788	1284
21-805	3579
21-807	3579
21-808	2130
21-811	2734
21-817	2281

Anexo 12. Genes de resistencia a betalactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas presentes en los aislamientos.

Aislamiento	Betalactamasas	EMA's	Fluoroquinolonas
21-105	blaGES-19 (2X), blaOXA-2	aac(6')-Ib9, aac(6')-I33-like	
21-128	blaGES-19, blaOXA-2	aac(6')-33, aac(6')-Ib4	
21-221	blaOXA-2	aac(6')-Ib4	
21-249	blaOXA-2	aac(6')-Ib4	
21-255	blaOXA-2	aac(6')-Ib4	
21-283	blaOXA-226, blaGES-59	aac(6')-Ib- Hangzhou-like	qnrVC1
21-629	blaOXA-2	aac(6')-Ib4	
21-634	blaOXA-2	aac(6')-Ib4	
21-659	blaGES-59	aac(6')-Ib4	
21-660	blaGES-59	aac(6')-Ib4	
21-661	blaGES-20(2X), blaOXA-2	aac(6')-33, aac(6')-Ib4	
21-667	blaGES-59	aac(6')-Ib-4	
21-674	blaOXA-2, blaGES-9	aph(3')-VIa, ant(2'')-Ia-like, aac(6')-29b-like	

EMA's (Enzimas modificadoras de aminoglucósidos)

Anexo 13. Genes de resistencia a otros antimicrobianos presentes en los aislamientos.

Aislamiento	Genes de resistencia a otros antimicrobianos
21-105	aadA1b , aph(6)-Ic , aph(3')-IIa , sul1
21-128	aph(6)-Ic , aph(3')-IIa , aadA1b , sul1
21-221	aadA6 , cmlA9-like, sul1 , tet(G)
21-249	aadA6 , cmlA9-like, sul1 , tet(G)
21-255	aadA6 , cmlA9-like, sul1 , tet(G)
21-283	aadA-like
21-629	aadA6 , cmlA9-like, sul1 , tet(G)
21-634	aadA6 , cmlA9-like, sul1 , tet(G)
21-659	sul1
21-660	sul1
21-661	aadA-like, sul1, tet(G)-like
21-667	sul1
21-674	aadA6 , aadA1b , catB2 , sul1

Anexo 14. Mutaciones en diferentes genes asociadas con resistencia antimicrobiana en los aislamientos.

Aislamiento	Mutaciones
681	oprD (nt472del13), mexY (D236E), ponA (H334Y), armZ (R320C)
684	oprD (nt627del2)
694	oprD (WT), parS (A345T,R383C), mexZ (D64E), gyrA (V671A)
936	oprD (Q158X), mexZ (G46S), mexS (A28_V31del), mexT (T92P), mexF (L425_K428del), mpl (nt111dupC), ampR (A194S)

21-105	oprD (W138X), gyrA (T83I), parC (S87L)
21-128	oprD (W138X), gyrA (T83I), parC (S87L)
21-220	oprD (D43N), mexY (L954M), mexX (S118G), dacB (K298R,V32L), nalD (nt31del), ampD (G46S), ponA (V369L), armZ (L174F)
21-221	oprD (T284Stop), gyrA (T83I), nalD (Ter213Tyrext*53), parC (E91K)
21-249	oprD (T284Stop), gyrA (T83I), nalD (Ter213Tyrext*53), parC (E91K)
21-255	oprD (T284Stop), gyrA (T83I), nalD (Ter213Tyrext*53), parC (E91K)
21-259	oprD (D43N), mexY (L954M), mexX (S118G), dacB (K298R,V32L), nalD (nt31del), ampD (G46S), ponA (V369L)
21-269	oprD (S325F), gyrA (D87N), ftsI (A139S),mexD (N775S,nt2560dupG,S915A), mexC (nt1020_1021del), nfxB (nt161_174del), pmrB (A4I), parC (T147A), parE (N5S)
21-282	oprD (W277X), gyrA (D87N), mpl (L64M), ftsI (A139S), mexD (nt2560dupG,S915A), mexC (nt1020_1021del), nfxB (nt161_174del), pmrB (A4I), parC (T147A)
21-283	oprD (Q301X), mexX (nt976dupG), mexZ (nt118_128del), gyrA (T83I), cpxS (H97insArgHisArg), parC (S87L), parE (D419A)
21-322	oprD (W277X), ftsI (V442A), mexC (A221V),pmrA (T31I)
21-429	oprD (nt906del1), gyrB (K371R), mexR (D89A), mexX (E254K), oprN (R80H), gyrA (T83I), ponA (R292S),
21-447	oprD (nt1037ins5), mexY (M574I), mexZ (E157Stop), oprN (V402I,P259S,V84E), nalD (nt321_327del), PBPB2 (M495I), pmrB (G131S), armZ (V368M)
21-449	oprD (WT)
21-474	oprD (nt575del2), mexD (S915A)
21-618	oprD (nt571del2), mexD (S915A)
21-629	oprD (T284Stop), gyrA (T83I), nalD (Ter213Tyrext*53), parC (E91K)
21-631	oprD (Q327X), parR(V55I,I80L), mexY (G1002A), mexS (E205V), nalD (L85R), ampD (G46S)

21-632	PBP7 (V61A), oprD (Q19X), oprN (D102N), nalC (G12D), armZ (V283L)
21-634	oprD (T284Stop), gyrA (T83I), nalD (Ter213Tyrext*53), parC (E91K)
21-650	oprD (nt135IS (4-like)), mexA (K76Q), ftsI (N117S)
21-659	oprD (nt406del41), parR (V55I,V221I), mexS (V308I), gyrA (T83I), nalD (W49C), mexD (T306I), parC (S87L)
21-660	oprD (nt406del41), parR (V55I,V221I), mexS (V308I), gyrA (T83I), nalD (W49C), mexD (T306I), parC (S87L)
21-661	oprD (nt123IS (256-like)), mexA (K76Q), mexX (S54G), mexZ (E189_A194del), gyrA (T83I), ftsI (N117S), parC (S87L)
21-662	oprD (WT), parS (Q237_V238insLeu), mexY (Q1039H), mexT (P28L), mexD (I970V), pmrB (K442E), parC (A283V)
21-663	oprD (WT), parS (Q237_V238insLeu), mexY (Q1039H), mexT (P28L), mexD (I970V), pmrB (K442E), parC (A283V)
21-667	oprD (nt406del41), parR (V55I,V221I), mexS (V308I), gyrA (T83I), nalD (W49C), mexD (T306I), pmrB (G123S), parC (S87L)
21-674	oprD (WT), mexR (N86T,A110T), parS (P320T), mexX (K354N), mexZ (nt531del), gyrA (T83I,D87H), mpl (T210A), ftsI (A244S), ampD (Q131Stop), mexD (S915A), mexC (A361P), pmrB (V427A), parC (S87W)
21-788	oprD (nt849del21), parS (A345T), parR (L90I), mexX (R231H), mexS (V149M)
21-805	oprD (nt462del13), parS (A345T), parR (L90I), mexX (R231H), mexS (V149M)
21-807	oprD (G317D), PBP7 (A29T,G30R,A73V), mexY (G652D,I1040T), mexX (V322L), mexS (V308I), mexE (E396D), oprN (K366N), cpxR (V142L), ampD (V10I), mexD (V687L,S915A,H953N), pmrB (S416C,E69A), ponA (V524A,V18L), armZ (A87V)
21-808	oprD (nt250del1), mexR (G58E), mexF (F512L), nalC (P81S,R17C), pmrB (A67T)
21-811	oprD (WT), parS (Q237_V238insLeu), mexY (Q1039H), mexT (P28L), mexD (I970V), pmrB (K442E), parC (A283V)

21-817	oprD (nt472del13), mexY (D236E), ponA (H334Y), armZ (R320C)
--------	---

Anexo 15. Variantes de PDC en los aislamientos.

Aislamiento	Variante de PDC (RefSeq protein ID)
681	PDC-23 (WP_034071670.1)
684	PDC-5 (WP_003119095.1)
694	PDC-5 (WP_003119095.1)
936	PDC-5 (WP_003119095.1)
21-105	PDC-35 (WP_003093423.1)
21-128	PDC-35 (WP_003093423.1)
21-220	PDC-3 (WP_003121934.1)
21-221	PDC-62 (WP_033998317.1)
21-249	PDC-35 (WP_003093423.1)
21-255	PDC-35 (WP_003093423.1)
21-259	PDC-35 (WP_003093423.1)
21-269	PDC-3 (WP_003121934.1)
21-282	Nueva
21-283	Nueva
21-322	Nueva
21-429	PDC-80 (WP_058169253.1)
21-447	PDC-5 (WP_003119095.1)
21-449	PDC-6 (WP_023130930.1)
21-474	PDC-1 (WP_003101289.1)
21-618	PDC-34 (WP_003137570.1)
21-629	PDC-34 (WP_003137570.1)
21-631	PDC-35 (WP_003093423.1)
21-632	PDC-3 (WP_003121934.1)
21-634	PDC-3 (WP_003121934.1)
21-650	PDC-35 (WP_003093423.1)
21-659	Nueva
21-660	PDC-5 (WP_003119095.1)
21-661	PDC-5 (WP_003119095.1)
21-662	Nueva
21-663	PDC-5 (WP_003119095.1)
21-667	PDC-5 (WP_003119095.1)
21-674	PDC-5 (WP_003119095.1)
21-788	PDC-39 (WP_023091031.1)
21-805	PDC-113 (WP_063864569.1)
21-807	PDC-113 (WP_063864569.1)

21-808	Nueva
21-811	PDC-8 (WP 003118203.1)
21-817	PDC-5 (WP 003119095.1)