



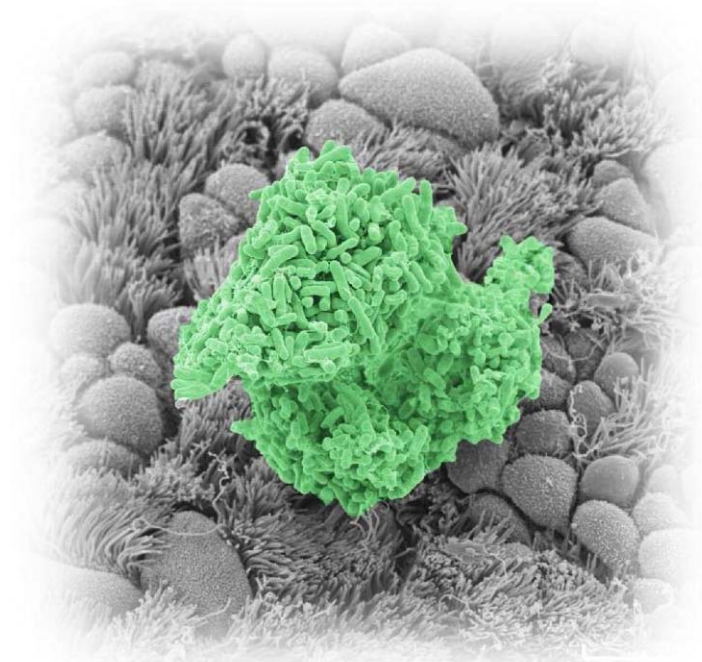
**Universitat de les
Illes Balears**



Son Espases
hospital universitari

TESIS DOCTORAL 2014

Caracterización del mutante *nfxB* de *Pseudomonas aeruginosa*: papel en la resistencia antibiótica de los biofilms e interacción con los mecanismos de resistencia intrínsecos.



Xavier Mulet Aguiló



**Universitat de les
Illes Balears**



TESIS DOCTORAL 2014

**Programa de Doctorado en Microbiología Ambiental y
Biotecnología**

**Caracterización del mutante *nfxB* de
Pseudomonas aeruginosa: papel en la
resistencia antibiótica de los biofilms e
interacción con los mecanismos de resistencia
intrínsecos.**

Tesis Doctoral presentada por

Xavier Mulet Aguiló

para la obtención del grado de Doctor en Biología

El Director del trabajo:

El doctorando:

Dr. Antonio Oliver Palomo

Xavier Mulet Aguiló

*A mis padres,
a Esther*

Agradecimientos

Soy una persona olvidadiza, la gente que me conoce lo sabe bien. A menudo, en el transcurso de una jornada de trabajo y a golpe de reloj, uno se olvida de agradecer los pequeños gestos que contribuyen a una gran empresa. Por este motivo aprovecharé esta pequeña sección que se me brinda para dar las gracias a todas las personas que de alguna forma han contribuido, ayudado o favorecido la realización de este trabajo.

A mis padres, por otorgarme la educación que desde pequeño aprendí a priorizar y por darme la oportunidad de tener una formación. Por haber sabido transmitir los valores que hoy día rigen mi vida y por vuestro apoyo en momentos buenos, y en momentos duros.

A Esperanza Barceló, por su constante apoyo, por su buen humor y su saber hacer. Por ayudarme siempre que ha tenido la oportunidad y por haber participado en prácticamente todas las decisiones importantes que he ido tomando a lo largo de mi vida.

A Esther Muntaner, por su apoyo. Por estar siempre a mi lado en los momentos duros. Por haber tenido que sufrir directamente mis preocupaciones y mis estados de ánimo. Por su infinita comprensión ante mi pésima gestión del tiempo y su contagiante optimismo.

Al Dr. Antonio Oliver, por todo lo que con él he aprendido, no sólo en el ámbito profesional sino también en el personal. Por dirigir este trabajo y por confiar en mí. Por ser un gran referente y un buen espejo en el que mirarse. Por darnos a los residentes del Servicio de Microbiología de Son Espases la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación.

Al Dr. José Luis Pérez por animarme a realizar este trabajo y por hacerme ver desde un principio que la práctica clínica necesariamente debe ir ligada a la investigación. Por apoyar, contribuir y promover en los trabajos de investigación en el Servicio de Microbiología.

Al Dr. Sebastián Albertí, por brindarme la oportunidad de haber trabajado en su laboratorio y llevar a cabo una parte del presente trabajo.

A todos los compañeros de la Unidad de Investigación, con quienes he tenido el placer de trabajar varios años:

Al Dr. Carlos Juan, gran científico y mejor persona. Por todo lo que he aprendido trabajando con él y los grandes momentos que justos hemos vivido, tanto en el laboratorio como fuera de él. Por haber formado parte, junto al Dr. Moyà, de mi "Comité de Primera Consulta" ante las dudas que han ido asaltándome durante la realización de este trabajo.

Agradecimientos

Al Dr. Tomeu Moyà, por la infinidad de veces que me ha echado un cable en el laboratorio. Por todo lo que he aprendido de él y por hacer posible que reírse y pasarlo bien no sea incompatible con la realización de un buen trabajo. Por todas las juergas y grandes momentos juntos, y sobre todo por los que nos quedan.

A la Dra. Laura Zamorano, quien tantas veces me ha echado una mano en el laboratorio. Por su buen humor y por los buenos momentos que hemos pasado en la UNI.

A Gabriel Cabot, por ayudarme tantísimas veces en el día a día del laboratorio y por su inestimable ayuda frente al infernal mundo de la informática. Por ser una persona que disfruta de reír, y por los buenos momentos que siempre recordaré, como por ejemplo el día que se nos pasó por la cabeza juntar 20 kg de hielo seco con 10 L de agua caliente.

A la Dra. Aina Mena, por ayudarme siempre que ha tenido oportunidad y por los buenos momentos y las risas que uno recuerda al mirar atrás.

A todos los residentes del Servicio de Microbiología empezando por mi corresidente Candi Déniz, por ser una persona siempre dispuesta a ayudar en lo que sea. A Carla López y Estrella Rojo, por ser tan risueñas y por todas las veces que me habéis echado una mano. A los demás residentes: Rosa Rubio, a Tony Verd, Cristina Taboada y las dos nuevas incorporaciones Cristina y Rubén. A todos gracias!

I.	Resumen.....	1
II.	Listado de publicaciones derivadas de este trabajo:.....	7
III.	Listado de acrónimos y/o abreviaturas	9
1.	INTRODUCCIÓN.....	11
<hr/>		
1.1.	Características generales de <i>P. aeruginosa</i>	13
1.2.	Importancia clínica.....	16
1.3.	Infección respiratoria crónica	18
1.3.1.	Desarrollo de mecanismos adaptativos.....	19
1.3.2.	Formación de biofilms	21
1.4.	Mecanismos de resistencia antibiótica en <i>P. aeruginosa</i>	25
1.4.1.	Resistencia intrínseca	25
1.4.1.1.	Resistencia mediada por AmpC	25
1.4.1.2.	Bombas de expulsión activa.....	27
A.	MexAB-OprM.....	30
B.	MexXY-OprM.....	32
C.	MexCD-OprJ.....	32
D.	MexEF-OprN	34
E.	Otras bombas.....	35
1.4.2.	Resistencia adquirida	36
1.4.2.1.	Mutaciones en genes cromosómicos.....	36
1.4.2.2.	Adquisición de determinantes de resistencia por transferencia horizontal.....	38
1.5.	Bombas de expulsión y <i>fitness</i> /virulencia.....	41

Índice

1.6. Bombas de expulsión y tasa de mutación	44
1.7. Hipersensibilidad antibiótica en el mutante <i>nfxB</i>	45
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
<hr/>	
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
<hr/>	
3.1. Cepas, plásmidos y cebadores.....	53
3.2. Construcción de mutantes nulos.....	58
3.3. Actividad, mecanismos y dinámica de desarrollo de resistencia a azitromicina en biofilms de <i>P. aeruginosa</i> ; efecto de la hipermutación y la hiperproducción de alginato	62
3.3.1. Actividad de la azitromicina y estudio de la dinámica de desarrollo de resistencias.....	62
3.3.1.1. En cultivo planctónico	62
3.3.1.2. En cultivo en forma de biofilm	62
3.3.2. Caracterización de los mutantes resistentes a azitromicina	63
3.3.2.1. Caracterización fenotípica	63
3.3.2.2. Caracterización genotípica	63
A. Determinación de la expresión de <i>mexD</i>	63
B. Secuenciación del gen regulador <i>nfxB</i>	64
3.4. Caracterización fenotípica y genotípica del mutante nulo <i>nfxB</i>	65
3.4.1. Patrón de sensibilidad	65
3.4.2. Clonación de <i>nfxB</i> y estudios de complementación	65
3.4.3. Competitividad biológica	65
3.4.3.1. Tiempo de generación.....	65
3.4.3.2. Índice de competición	66

3.4.4. Virulencia del mutante <i>nfxB</i>	66
3.4.4.1. Cuantificación de la resistencia a la acción bactericida del complemento del suero humano	66
3.4.4.2. Efecto de la hiperexpresión de MexCD-OprJ en un modelo murino de infección pulmonar	67
3.4.5. Estabilidad: tasa de reversión del fenotipo y estudio de los mecanismos implicados.....	68
3.4.6. Determinación de la tasa de mutación espontánea.....	68
3.4.7. Contribución de MexCD-OprJ a la resistencia antibiótica en crecimiento en forma de biofilm	69
3.4.8. Inducibilidad del sistema MexCD-OprJ	69
3.4.9. Análisis del transcriptoma del mutante <i>nfxB</i>	69
3.5. Interacción de MexCD-OprJ con otros mecanismos de resistencia en <i>P. aeruginosa</i> , en crecimiento planctónico y en forma de biofilm	71
3.5.1. Patrón de sensibilidad y estudios de complementación del mutante doble <i>nfxB-dacB</i> (PAONBDB).....	71
3.5.2. Determinación de los niveles de expresión de genes de resistencia en el mutante doble <i>nfxB-dacB</i> (PAONBDB)	71
3.5.2.1. Expresión de bombas de expulsión activa	71
3.5.2.2. Expresión de <i>ampC</i> y <i>creD</i>	71
3.5.3. Estatus de las bombas de expulsión intrínsecas en el mutante nulo <i>nfxB</i> : MexAB-OprM y MexXY-OprM. Análisis de proteínas de membrana externa	72
3.5.4. Determinación de los perfiles de expresión de las Proteínas Fijadoras de Penicilinas (PBP) en el mutante <i>nfxB</i>	73
3.5.5. Determinación de la actividad betalactamasa específica en los mutantes nulos <i>nfxB</i> en diferentes compartimentos celulares	73
3.5.5.1. Actividad betalactamasa total (extracto crudo)	74
3.5.5.2. Actividad betalactamasa periplasmática	74
3.5.5.3. Actividad betalactamasa en sobrenadante.....	74
3.5.6. Estudio de la supervivencia del mutante <i>nfxB</i> en biofilms tratados con antibióticos betalactámicos.....	74
3.5.7. Inactivación de <i>nfxB</i> en cepas clínicas.....	75

3.5.8. Estudio preliminar del efecto de la inactivación <i>nfxB</i> en la resistencia mediada por betalactamasas transferibles	75
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
4.1. Efecto de la inactivación de <i>mutS</i> y <i>mucaA</i> sobre la actividad de la azitromicina en crecimiento en forma de biofilm.....	79
4.1.1. Desarrollo de resistencias en biofilms tratados con azitromicina.....	81
4.1.1.1. Mecanismos de resistencia a azitromicina mutacionales o adaptativos	81
4.1.1.2. Desarrollo de resistencia mutacional a azitromicina. Caracterización e impacto en el perfil global de sensibilidad antibiótica....	82
A. Perfil de sensibilidad antibiótica de los mutantes resistentes a azitromicina.....	82
B. Niveles de expresión génica de bombas de expulsión activa de los mutantes resistentes a azitromicina	84
C. Secuenciación del gen <i>nfxB</i> . Alteraciones genéticas del regulador negativo del sistema MexCD-OprJ.....	85
D. Papel de MexCD-OprJ en el desarrollo de resistencia cruzada a ciprofloxacino en los biofilms tratados con azitromicina.....	86
4.1.2. Desarrollo de resistencia a azitromicina en crecimiento planctónico.....	87
4.2. Caracterización del mutante <i>nfxB</i>.....	88
4.2.1. Patrón de sensibilidad antibiótica y estudios de complementación.....	88
4.2.2. Competitividad biológica del mutante <i>nfxB</i>	89
4.2.2.1. Tiempo de generación.....	89
4.2.2.2. Índice de competición	89
4.2.3. Virulencia del mutante <i>nfxB</i>	91
4.2.3.1. Cuantificación de la resistencia al complemento del suero humano del mutante <i>nfxB</i>	91

4.2.3.2. Efecto de la hiperexpresión de MexCD-OprJ en el modelo murino de infección pulmonar	93
4.2.4. Tasa de reversión del fenotipo NfxB.....	94
4.2.5. Papel de <i>nfxB</i> y MexCD-OprJ en la tasa de mutación espontánea	95
4.2.6. Contribución de MexCD-OprJ en la resistencia antibiótica en crecimiento en forma de biofilm	97
4.2.7. Inducibilidad del sistema MexCD-OprJ	98
4.2.8. Análisis del transcriptoma del mutante <i>nfxB</i>	98
4.2.9. Efecto de la inactivación del gen <i>nfxB</i> en las cepas clínicas GPP y JW	101
4.3. Interacción entre el sistema MexCD-OprJ y otros mecanismos de resistencia de <i>P. aeruginosa</i>.....	102
4.3.1. Reversión de la resistencia de alto nivel a betalactámicos mediada por la mutación en <i>dacB</i> (PBP4).....	102
4.3.2. Efecto de la inactivación de <i>nfxB</i> sobre la expresión constitutiva de AmpC y su inducibilidad	102
4.3.3. Alteración de la expulsión intrínseca mediada por bombas de expulsión activa en los fenotipos NfxB	103
4.3.3.1. Cuantificación de la expresión génica de los principales sistemas de expulsión activa en <i>P. aeruginosa</i>	103
4.3.3.2. Perfil de proteínas de membrana externa.....	104
4.3.4. Expresión de Proteínas Fijadoras de Penicilina (PBP) en el mutante <i>nfxB</i>	105
4.3.5. Alteración de la fisiología de la betalactamasa de AmpC en los mutantes <i>nfxB</i>	106
4.3.6. Actividad de los antibióticos betalactámicos sobre los biofilms formados por el mutante <i>nfxB</i>	110
4.3.7. Efecto de la inactivación de <i>nfxB</i> en cepas clínicas sobre la actividad betalactamasa	111
4.3.8. Consecuencias de la inactivación de <i>nfxB</i> sobre la resistencia mediada por betalactamasas transferibles	112

Índice

5. CONCLUSIONES.....	115
-----------------------------	------------

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
---	------------

7. ANEXO 1: medios de cultivo y reactivos de laboratorio.....	143
--	------------

7.1. Medios de cultivo.....	145
-----------------------------	-----

7.2. Reactivos de laboratorio.....	145
------------------------------------	-----

7.3. Mezclas para PCR.....	146
----------------------------	-----

8. ANEXO 2: Artículos publicados.....	147
--	------------

I. Resumen

En los últimos años la azitromicina ha mostrado resultados prometedores en el tratamiento de la infección respiratoria crónica por *Pseudomonas aeruginosa*. A pesar de no presentar actividad bactericida frente a este microorganismo en cultivo planctónico, se sabe que este macrólido inhibe el crecimiento en forma de biofilm gracias a su capacidad para bloquear o interferir en el sistema quorum sensing bacteriano. En el transcurso de las infecciones crónicas frecuentemente se seleccionan mutantes que presentan un alto grado de adaptación al nicho ecológico y a los antimicrobianos, como ocurre con el mutante en *nfxB*, gen regulador negativo de la bomba de expulsión activa MexCD-OprJ. Este fenotipo es frecuentemente aislado en muestras respiratorias de pacientes con fibrosis quística, EPOC y bronquiectasias, y se caracteriza por presentar resistencia a los antimicrobianos que puedan actuar como sustrato (ciprofloxacino, cefepima o azitromicina) y por presentar una marcada hipersensibilidad a antibióticos betalactámicos no sustratos de la bomba y aminoglucósidos.

Por tanto uno de los objetivos del presente trabajo fue averiguar si durante la exposición prolongada a azitromicina se seleccionan mutantes *nfxB* tanto en crecimiento planctónico como en forma de biofilm. Además se evaluó el impacto de la hiperproducción de alginato y el efecto de la hipermutación sobre el efecto bactericida, sobre la dinámica de desarrollo de resistencias a azitromicina y sobre la posible aparición de resistencias cruzadas. También fue objeto de estudio la caracterización del mutante *nfxB*, así como la relación entre la hiperexpresión de MexCD-OprJ (vía mutación en su gen regulador *nfxB*), la actividad de la cefalosporinasa cromosómica AmpC, y las bombas de expulsión intrínsecas MexAB-OprM y MexXY-OprM.

Para llevar a cabo tales objetivos se construyeron mutantes deficientes en el gen *mucA* (la variante mucoide PAOMA), *mutS* (cepa hipermutadora PAOMS) y la combinación de ambos (PAOMSA) mediante el sistema cre-lox. Seguidamente se procedió a evaluar el comportamiento de dichos mutantes en crecimiento en forma de biofilm al ser tratados con diversas concentraciones de azitromicina, así como la dinámica de desarrollo de resistencias a dicho antibiótico durante varios días. Se caracterizaron los mutantes resistentes a azitromicina, se determinó su perfil de sensibilidad, se cuantificó la expresión relativa de *mexD* como representante de la bomba de expulsión activa MexCD-OprJ mediante PCR a tiempo real y finalmente se secuenció su gen regulador *nfxB* revelando diversas mutaciones inactivantes. En síntesis, los resultados obtenidos nos permitieron demostrar que durante el tratamiento de los biofilms con azitromicina existe una selección de mutantes *nfxB* en las cepas salvajes, hiperproductoras de alginato y particularmente en las cepas hipermutadoras.

Seguidamente se construyó el mutante nulo *nfxB* y se procedió a la evaluación de sus propiedades biológicas, su sensibilidad al complemento del suero humano, la tasa y frecuencia de mutación en rifampicina. Finalmente se analizó su transcriptoma, mostrando que aparentemente no se sobreexpresan genes implicados en la resistencia antimicrobiana, a excepción de los pertenecientes al sistema *mexCD-oprJ*. Aunque en el perfil de proteínas fijadoras de penicilina no se hallaron diferencias entre el mutante *nfxB*

Resumen

y la cepa de referencia, el análisis de proteínas de membrana externa reveló una disminución de la expresión de OprM, responsable de la hipersensibilidad a aminoglucósidos y betalactámicos con la excepción del imipenem. De igual forma, la disminución de la expresión de OprM no justificó la reversión del fenotipo de resistencia a betalactámicos en el mutante *nfxB-dacB*. Sin embargo, la determinación fraccionada (extracto crudo, periplasma y sobrenadante) de la actividad betalactamasa específica del mutante *nfxB* y del mutante doble *nfxB-dacB* reveló un drástico descenso de la actividad periplasmática como consecuencia de la inactivación de *nfxB*, a expensas de un aumento de la actividad determinada en el sobrenadante. A continuación se evaluó si este hallazgo suponía un beneficio en el seno de un biofilm tratado con antibióticos betalactámicos, demostrándose que efectivamente en este escenario el mutante *nfxB* muestra una supervivencia superior a la de sus cepas parentales tanto en condiciones de inducción como en condiciones de hiperproducción constitutiva por desrepresión de la expresión de *ampC*, vía mutación en *dacB*. Por tanto, nuestros datos revelan que la hipersensibilidad a betalactámicos es debida a la incapacidad para acumular AmpC en el espacio periplásmico, produciéndose una permeabilización al medio extracelular. No obstante un análisis más profundo de este fenómeno nos ha permitido describir cómo dicha permeabilización resulta beneficiosa para la comunidad formadora de biofilms, ya que AmpC quedaría recluido en su matriz. La posterior inactivación de *nfxB* en cepas clínicas demostró que este hallazgo no es específico de la PAO1. Finalmente, los datos preliminares sugieren que la permeabilización que experimenta AmpC en el mutante *nfxB* ocurre también para otras betalactamasas, particularmente de las clases B y D.

Azithromycin has shown promising results in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* chronic respiratory infections during the last years. Although it does not show bactericidal activity against planktonic cells, this macrolide is known to inhibit biofilm formation due to its ability to block or interfere with the bacterial quorum sensing. During chronic infections, mutants showing high level of adaptation to the lung environment and antibiotics are often selected, such as mutants in the gene *nfxB*, which encodes the negative regulator of the efflux pump MexCD-OprJ. This phenotype is frequently isolated in the respiratory tract of Cystic Fibrosis patients, but also in COPD and bronchiectasis, and it is characterized by showing antimicrobial resistance to those antimicrobials that can act as a substrate (such as ciprofloxacin, cefepime, and azithromycin), and for presenting a marked hypersusceptibility to nonsubstrate beta-lactams and aminoglycosides.

Therefore, one of the aims of this work was to assess if these *nfxB* mutants are selected during prolonged exposure to azithromycin in both planktonic and biofilm growth. Furthermore, we evaluated the effect of alginate overproduction and hypermutation on the bactericidal activity and the dynamics of development of resistance to azithromycin and the possible emergence of cross-resistance. In this work we have also characterized the *nfxB* mutant as well as the relationship between MexCD-OprJ overexpression (driven by *nfxB* inactivation), the activity of the chromosomal beta-lactamase AmpC and the major efflux pumps MexAB-OprM and MexXY-OprM.

To carry out these objectives, strains PAO1, its *muca* mutant (PAOMA), and their respective *mutS*-deficient hypermutable derivatives (PAOMS and PAOMSA) were constructed using the cre-lox system. The biofilms formed by these strains were treated with different azithromycin concentrations for several days and the dynamics of antibiotic resistance development was evaluated. Azithromycin resistant mutants were characterized, their susceptibility profiles were determined, their relative *mexD* expression was quantified by real-time PCR and finally its regulatory gene *nfxB* was sequenced, revealing several inactivating mutations. In summary, our results demonstrate that *nfxB* mutants are readily selected during azithromycin treatment of biofilms in wild-type strains, alginate hyperproducers and particularly in hypermutable strains.

Then, the knockout *nfxB* mutant was constructed and its biological features characterized, the susceptibility to the complement of human serum, its rifampicin resistance mutation rate and finally its whole genome gene expression was analyzed, showing that apparently there are no other overexpressed genes involved in antimicrobial resistance except for those belonging to MexCD-OprJ operon. Although no differences in the penicillin binding protein (PBP) profile between the *nfxB* mutant and the reference strain were found, analysis of the outer membrane protein profile revealed a reduced expression of OprM, which is responsible for the hypersensitivity to aminoglycosides and beta-lactams, except imipenem. Likewise, a decrease in the OprM expression did not explain the reversion of the high beta-lactam resistance phenotype in the *nfxB-dacB* double mutant. However, beta-lactamase activity determination in different cell fractions (crude extract, periplasm, and supernatant) of *nfxB* and *nfxB-dacB* mutants revealed a dramatically decreased periplasmic beta-lactamase activity in contrast with an increased

Summary

activity in supernatant. Then we assessed whether this difference was beneficial in a beta-lactam treated biofilm, showing that in this scenario the *nfxB* mutant yield higher survival rates than their respective parent strains in both induced and constitutively overexpressed AmpC conditions driven by inactivation of *dacB*. Therefore, our data show that hypersusceptibility to beta-lactams is due to a deficient AmpC accumulation in the periplasmic space, resulting in a leakage out of the cell. However a deeper analysis has allowed us to demonstrate how that leakage was protective in biofilm growth, where AmpC could be confined in the extracellular matrix. Subsequent *nfxB* inactivation in clinical isolates showed that this finding is not specific to PAO1. Finally, preliminary data suggest that the AmpC leakage observed in the *nfxB* mutant also occurs with other beta-lactamases, particularly in B and D classes.

En els darrers anys, l'azitromicina ha mostrat resultats prometedors en el tractament de la infecció respiratòria crònica per *Pseudomonas aeruginosa*. Tot i que no presenta activitat bactericida davant aquest microorganisme en cultiu planctònic, es sap que aquest macròlid inhibeix el creixement en forma de biofilm gràcies a la seva capacitat per bloquejar o interferir en el sistema quòrum sensing bacterià. En el transcurs de les infeccions cròniques sovint es seleccionen mutants que presenten un grau d'adaptació al nínxol ecològic i als antibiòtics, tal com escau amb el mutant *nfxB*, gen regulador negatiu de la bomba d'expulsió activa MexCD-OprJ. Aquest fenotip freqüentment és aïllat en mostres respiratòries de pacients amb fibrosi quística, MPOC i bronquièctasis, i es caracteritza per presentar resistència als antibiòtics que poden actuar com a substrat (com ciprofloxacina, cefepima, o azitromicina) i per presentar una marcada hipersensibilitat als antibiòtics betalactàmics no substrats de la bomba i aminoglucòsids.

Per tant, un dels principals objectius d'aquest treball va ésser esbrinar si durant l'exposició perllongada a azitromicina es seleccionen mutants *nfxB* tant en cultiu planctònic com en forma de biofilm. A més, es va avaluar l'impacte de la hiperproducció d'alginat i l'efecte de la hipermutació sobre l'efecte bactericida, sobre la dinàmica de desenvolupament de resistències a azitromicina i sobre la possible aparició de resistències creuades. També va ésser objecte d'estudi la caracterització del mutant *nfxB*, així com la relació entre la hiperexpressió de MexCD-OprJ (a través de la mutació al seu gen regulador *nfxB*), la activitat de la cefalosporinasa cromosòmica AmpC, i les bombes d'expulsió intrínseques MexAB-OprM i MexXY-OprM.

Per a dur a terme aquests objectius es van construir mutants deficientes en el gen *mucA* (la variant mucoide PAOMA), *mutS* (soca hipermutadora PAOMS) i la combinació de ambdós (PAOMSA) mitjançant el sistema cre-lox. Seguidament es procedí a avaluar el comportament dels mutants en creixement en forma de biofilm quan són tractats amb diferents concentracions de azitromicina, així com la dinàmica de desenvolupament de resistències durant varis dies. Es caracteritzaren els mutants resistents a azitromicina, es va determinar el seu perfil de sensibilitat, es quantificà l'expressió relativa de *mexD* com a representant de la bomba d'expulsió activa MexCD-OprJ mitjançant PCR a temps real i finalment es va seqüenciar el seu gen regulador *nfxB* revelant diverses mutacions inactivants. En resum, els resultats obtinguts ens han permès demostrar que durant el tractament de biofilms amb azitromicina existeix una selecció de mutants *nfxB* a les soques salvatges, les hiperproductores d'alginat i particularment a les soques hipermutadores.

Seguidament es va construir el mutant nul *nfxB* i es va procedir a l'avaluació de les seves propietats biològiques, la seva sensibilitat al complement del sèrum humà i la taxa i freqüència de mutació en rifampicina. Finalment es va analitzar el seu transcriptoma, mostrant que aparentment no es sobreexpressen gens implicats en la residència antibiòtica, exceptuant aquells que pertanyen a l'operó *mexCD-oprJ*. Encara que al perfil de proteïnes fixadores de penicil·lina no es trobaren diferències entre el mutant *nfxB* i la soca de referència, l'anàlisi de proteïnes de membrana externa va revelar una disminució de la expressió de OprM, responsable de la hipersensibilitat a aminoglucòsids i betalactàmics amb l'excepció de l'imipenem. De forma anàloga, la disminució de

Resum

L'expressió de OprM no justificà la reversió del fenotip de resistència a betalactàmics en el mutant *nfxB-dacB*. No obstant, la determinació fraccionada (extracte cru, periplasma i sobrenedant) de l'activitat betalactamasa específica del mutant *nfxB* i del mutant doble *nfxB-dacB* mostrà un dràstic descens de l'activitat periplasmàtica com a conseqüència de la inactivació de *nfxB*, a costa d'un augment de l'activitat mesurada al sobrenedant. A continuació es va avaluar si aquesta diferència resultava beneficiosa en el si d'un biofilm tractat amb antibiòtics betalactàmics, demostrant-se que efectivament en aquest escenari el mutant *nfxB* té una supervivència superior a la de les seves soques parentals tant en condicions d'inducció com en condicions de hiperproducció constitutiva per desrepressió de l'expressió de *ampC*, a través de la mutació a *dacB*. Així, les nostres dades revelen que la hipersensibilitat a betalactàmics és deguda a la incapacitat per acumular AmpC a l'espai periplàsmic, produint-se una permeabilització cap al medi extracel·lular. No obstant una anàlisi d'aquest fenomen ens ha permès descriure com aquesta permeabilització resulta beneficiosa per a la comunitat formadora del biofilm, degut a que AmpC quedaria reclòs dins la seva matriu. La posterior inactivació de *nfxB* en soques clíniques demostrà que aquesta troballa no és específica de la PAO1.

Finalment, les dades preliminars suggereixen que la permeabilització que experimenta AmpC al mutant *nfxB* ocorre també amb altres betalactamases, particularment de les classes B i D.

II. Listado de publicaciones derivadas de este trabajo:

Mulet X, Maciá MD, Mena A, Juan C, Pérez JL, Oliver A. Azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: bactericidal activity and selection of *nfxB* mutants. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(4):1552-60.

Mulet X, Moyá B, Juan C, Macià MD, Pérez JL, Blázquez J, Oliver A. Antagonistic interactions of *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance mechanisms in planktonic but not biofilm growth. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(10):4560-8.

Martínez-Ramos I, Mulet X, Moyá B, Barbier M, Oliver A, Albertí S. Overexpression of MexCD-OprJ reduces *Pseudomonas aeruginosa* virulence by increasing its susceptibility to complement-mediated killing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(4):2426-9.

Véanse los artículos completos en ANEXO 2.

III. Listado de acrónimos y/o abreviaturas

ARNm: ARN mensajero
ARNr: ARN ribosómico
AT: aztreonam
ATP: adenosín trifosfato
AZM: azitromicina
BLEE: betalactamasa de espectro extendido
CAZ: ceftazidima
CFTR: Regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)
CIP: ciprofloxacino
CLR: cloranfenicol
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI: concentración mínima inhibitoria
COL: colistina
CTX: cefotaxima
EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERI: eritromicina
FEP: cefepima
FQ: fibrosis quística
GEN: gentamicina
IP: imipenem
LB: caldo Luria Bertani
LBA: agar Luria Bertani
MBL: metalobetalactamasa
MER: meropenem
MH: caldo Mueller Hinton
MHA: agar Mueller Hinton
PBS: tampón fosfato salino
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PP/TZ: piperacilina tazobactam
RIF: rifampicina
rpm: Revoluciones por minuto
SCV: Colonias enanas o puntiformes (small colony variants)
SDS-PAGE: gel de electroforesis de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
TET: tetraciclina
TOB: tobramicina
TRI: trimetoprim
UCI: Unidad de cuidados intensivos
UFC: unidades formadoras de colonias

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características generales de *P. aeruginosa*

En 1850 Sédillot fue el primero en sospechar que la coloración azul-verdosa de las vendas y gasas sobre las heridas quirúrgicas debía ser atribuida a un agente transferible. Fue diez años más tarde cuando Fordos conseguía extraer el pigmento. En 1862 Lucke asoció este pigmento con un microorganismo de forma bacilar. *Pseudomonas aeruginosa* no se consiguió aislar en cultivo puro hasta 1882, en Francia, cuando Carle Gessard (químico y bacteriólogo de París) publicó un artículo titulado “*On the Blue and Green Coloration of Bandages*” refiriéndose al crecimiento de este microorganismo en heridas cutáneas de dos pacientes que presentaban una secreción purulenta verde-azulada. Gessard diseñó un experimento que identificaba este microorganismo en función de la hidrosolubilidad de sus pigmentos y a su coloración verde-azulada cuando esta solución era iluminada con luz UV. Ya en 1916 cuando Freeman publicó de forma detallada las rutas mediante las cuales *P. aeruginosa* era capaz de invadir el cuerpo humano, ocasionando una infección aguda o bien crónica.

La capacidad de amplificar y secuenciar el 16S del ARNr ha permitido incluir en el género *Pseudomonas* a otras cepas anteriormente clasificadas en los géneros *Flavimonas* y *Chryseomonas*. Y por otra parte, ha permitido separar del género *Pseudomonas* a especies ahora pertenecientes al género *Burkholderia*, *Brevundimonas*, *Comamonas* y *Ralstonia*. Posteriormente, en el año 2000 se secuenció su genoma completo.

P. aeruginosa es un bacilo Gram-negativo incluido en la clase Gamma Proteobacteria, orden Pseudomonadales y familia Pseudomonadaceae, es no fermentador y no formador de esporas. Mide entre 1,5 y 5 μm de longitud y 0,5-1 μm de ancho, es recto o ligeramente curvado. Es móvil debido a que está dotado de un flagelo polar. A pesar de poseer un metabolismo aerobio estricto, es capaz de utilizar nitratos como aceptor final de electrones en condiciones de anaerobiosis. Es oxidasa y catalasa positivo y no fermentador de glucosa. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, aunque a diferencia de otras especies del mismo género ésta es capaz de crecer hasta 42°C.

Gracias a su gran genoma (6,3 Mpb), *P. aeruginosa* dispone de una gran proporción de genes implicados en la regulación metabólica (más del 9,4%), lo cual caracteriza a microorganismos capaces de sobrevivir en ambientes muy diversos. (Stover CK *et al*, 2000).

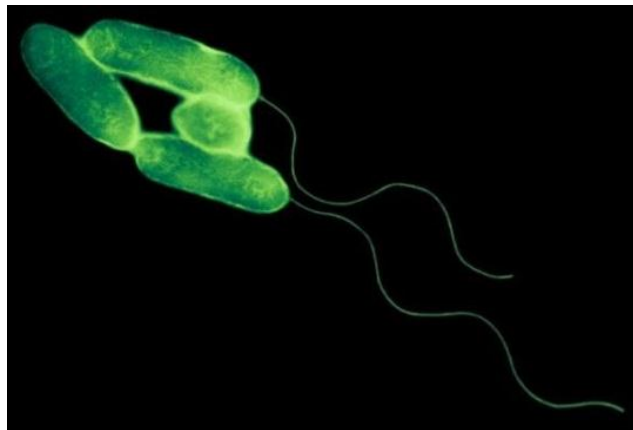


FIGURA 1. Microfotografía electrónica de transmisión (TEM) a color de *P. aeruginosa*

Introducción

P. aeruginosa es capaz de producir diversos pigmentos hidrosolubles como la pioverdina, de color verde-amarillento característico, cuya función biológica es actuar como sideróforo captando hierro. Este pigmento emite fluorescencia al iluminarlo con luz UV.

Otro pigmento sintetizado por este microorganismo es la piocianina, metabolito secundario de color verde azulado, considerado una toxina de *P. aeruginosa*, cuyo mecanismo de acción radica en la capacidad de reducir u oxidar otros compuestos y generar especies reactivas del oxígeno. Otros pigmentos menos frecuentes son la piomelanina (marrón), sintetizada como protector ante un estrés oxidativo o lumínico (UV) y la piorrubina (rojo).

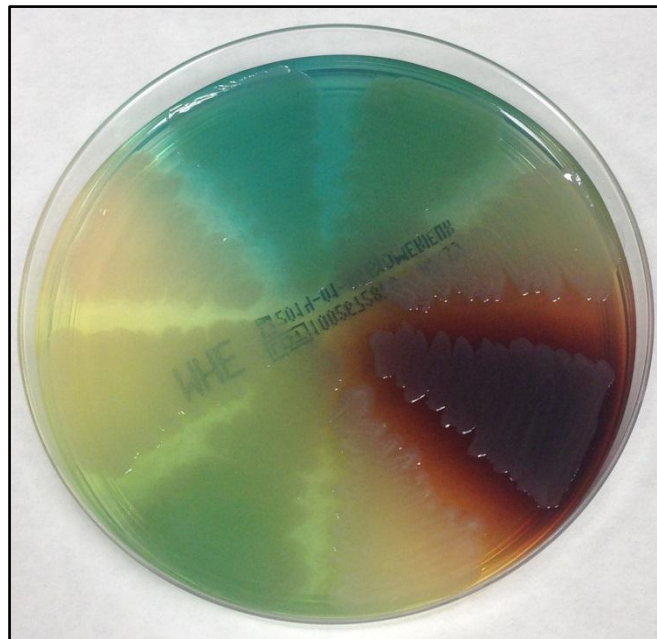


FIGURA 2. Producción de diferentes pigmentos de *P. aeruginosa* en MHA.

Hoy en día es considerado un patógeno oportunista. Es un microorganismo ubicuo, capaz de persistir o incluso colonizar multitud de nichos ecológicos ambientales, así como también seres vivos, incluyendo plantas, animales y al hombre. Es precisamente esa capacidad de sobrevivir en medios mínimos y la habilidad de tolerar gran variedad de condiciones físicas y químicas, lo que permite a *P. aeruginosa* persistir exitosamente tanto en la comunidad como en el ambiente hospitalario. En el hospital es frecuente aislar dicho microorganismo en antisépticos, jabones, equipos de respiración asistida, conductos de aire, colirios, etc... (Pollack M, 1995). Fuera de él, lo podemos encontrar en reservorios comunitarios como piscinas e hidromasajes, humidificadores, soluciones para lentes de contacto, en plantas, rizosfera y suelo (Harris AA *et al*, 1984; Pitt TL, 1996; Pollack M, 1995).

P. aeruginosa puede ser considerada por sí misma un miembro de la flora habitual en el humano, así que son los pacientes inmunocomprometidos los que presentan un mayor riesgo de colonización por este organismo (Morrison AJ Jr & Wenzel RP, 1984;

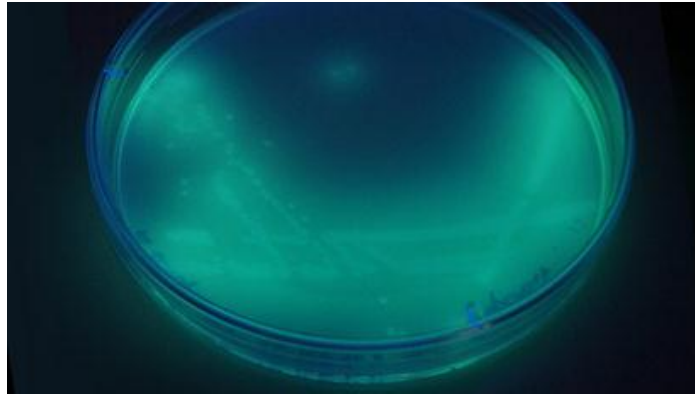


FIGURA 3. Fluorescencia emitida al iluminar un cultivo de *P. aeruginosa* con luz ultravioleta.

Pollack M, 1995). También implica un mayor riesgo de colonización por *P. aeruginosa*, la eliminación de la flora bacteriana normal ocasionada por tratamientos antibióticos (Blanc D *et al*, 1998; Bonten MJ *et al*, 1999; Takesue Y *et al*, 2002).

1.2. Importancia clínica

P. aeruginosa es sin duda el patógeno más relevante dentro de su género, bien atendiendo a la cuantía y tipo de infecciones que ocasiona, como a la facilidad para adquirir elementos genéticos que confieren resistencia a prácticamente todos los antimicrobianos descritos. Todo ello hace que la morbilidad y mortalidad asociada a las mismas sea elevada (Pollack M, 1995).

A pesar de que generalmente no infecta a individuos sanos, es capaz de colonizar numerosos ambientes, creándose así infinidad de nichos ecológicos. En adultos sanos, se ha aislado en garganta, piel, mucosa nasal y mucosa intestinal, dónde se ha aislado hasta en uno de cada cuatro individuos sanos (Morrison AJ Jr & Wenzel RP 1984). No obstante, a medida que aumenta la estancia hospitalaria la colonización por este microorganismo también aumenta (Pollack M, 1995), especialmente en pacientes que presentan traumas, solución de la continuidad de piel y mucosas, grandes quemados, y pacientes sometidos a cirugía, traqueostomías, cateterismos, o han requerido ventilación mecánica (Blanc DS *et al*, 1998; Erol S *et al*, 2004; Ohara T & Itoh K, 2003; Thuong M *et al*, 2003; Valles J *et al*, 2004). Es precisamente esta ubicuidad la que le proporciona una posición ventajosa ante cualquier fisura en el sistema inmune.

Las infecciones producidas por *P. aeruginosa* son muy diversas, y van desde infecciones cutáneas leves, hasta sepsis fulminantes. La mayoría de infecciones adquiridas en la comunidad suelen ser leves y siempre condicionadas por el estado inmunológico del paciente, como otitis externa frecuentemente relacionada con el agua de las piscinas, foliculitis, conjuntivitis frecuentemente asociada al uso de lentes de contacto, queratitis, la cual es la infección ocular más frecuente (Baum J *et al*, 1990,) y algunas otras formas de infección ocular que pueden evolucionar desfavorablemente en muy poco tiempo y pueden conllevar la pérdida de visión, como en el caso de la endoftalmitis (Eifrig CW *et al*, 2003). También resultan de especial relevancia las bacteriemias en individuos adictos a drogas por vía parenteral, que frecuentemente se asocian a endocarditis (Komshian SV *et al*, 1990)

En cambio, las infecciones graves y con peor curso, acontecen en el ambiente hospitalario con una elevada mortalidad. Un estudio de prevalencia de datos recogidos por el CDC (Center of Disease Control) reveló que *P. aeruginosa* representa uno de los cinco patógenos nosocomiales más aislados, la segunda causa de neumonía nosocomial, la tercera causa más frecuente de infecciones del tracto urinario, el cuarto patógeno más aislado en infecciones quirúrgicas y la séptima causa de infecciones generalizadas del torrente sanguíneo (National Nosocomial Infections Sureveillance System, 1998). Otros estudios sitúan a *P. aeruginosa* como la segunda causa principal de neumonía nosocomial y neumonía asociada a ventilación mecánica, y cuando ésta tiene lugar en las unidades de cuidados intensivos (UCI), se alcanza una mortalidad del 40-50% (Kolleff MH *et al*, 2005; Lynch JP, 2001; Vincent JL, 2003). De forma análoga, es considerada la principal causa de neumonía en pacientes pediátricos en UCI (Richards MJ *et al*, 1999).

Resulta imprescindible mencionar que *P. aeruginosa* es también la principal causa de infecciones en pacientes con fibrosis quística (FQ), o que presentan enfermedades

pulmonares obstructivas crónicas (EPOC). En las bronquiectasias la infección crónica por este microorganismo se asocia a un deterioro de la función pulmonar, y por tanto a un peor pronóstico. En la actualidad se está usando esta infección como marcador de inflamación severa de las vía aéreas en pacientes con EPOC (Hill AT *et al*, 2000).

1.3. Infección respiratoria crónica

Es especialmente sorprendente la capacidad de adaptación que *P. aeruginosa* presenta en pacientes que sufren enfermedades respiratorias crónicas como FQ, bronquiectasias o EPOC.

La FQ es una enfermedad genética recesiva causada por la presencia de más de 1500 mutaciones posibles en el regulador transmembrana CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator), con una incidencia de 1 cada 2500 nacimientos. El mal funcionamiento o la pérdida total de la funcionalidad del CFTR se traduce en un transporte defectivo de cloro a través de superficies epiteliales. En el sistema respiratorio disminuye el volumen de fluido periciliar y hace aumentar la viscosidad de las secreciones en las vías respiratorias inferiores. En esta situación el aclaramiento mucociliar se ve seriamente comprometido lo cual desencadena una respuesta inflamatoria del parénquima pulmonar con la consiguiente acumulación de anticuerpos y células inflamatorias, principalmente linfocitos polimorfonucleares (Armstrong DS *et al*, 1995; Armstrong DS *et al*, 2005; Hoiby N *et al*, 2005)

En la EPOC se produce una situación análoga donde la inflamación de las vías aéreas es de nuevo el signo característico. En este caso se produce un daño tisular crónico y generalmente irreversible, causado por la inhalación de partículas, principalmente el humo del tabaco. En estas circunstancias, y al igual que en la FQ, se liberan multitud de mediadores de la inflamación con la posterior acumulación de células inflamatorias.

La bronquiectasia es una dilatación anormal e irreversible del árbol bronquial, encargado de conducir el aire desde la tráquea hasta la unidad funcional respiratoria (alvéolo pulmonar), que puede ser localizada o generalizada. Es un hallazgo común en las manifestaciones clínicas de la FQ.

La flora microbiota del tracto respiratorio de este tipo de pacientes representa un complejo ecosistema donde coexisten varias especies, siendo *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y las especies pertenecientes al complejo *Burkholderia cepacia*, las más relevantes. De los pacientes con FQ un 80% de ellos en la pubertad ya resultan infectados de forma crónica por *P. aeruginosa* (Moreau-Marquis S *et al*, 2008).

No es por tanto de extrañar que en hábitats tan peculiares, la facilidad de adaptación de *P. aeruginosa* haya resultado un éxito evolutivo. En este entorno, el sistema inmune del hospedador, y la acción de los antibióticos representarán los mayores retos que estos microorganismos deberán afrontar para poder persistir.

Así, es frecuente que *P. aeruginosa* desarrolle ciertos mecanismos adaptativos que darán lugar a la diversificación de la especie en diferentes variantes con propiedades fenotípicas bien diferenciadas.

1.3.1. Desarrollo de mecanismos adaptativos

- **Fenotipo mucóide:** es debido a la hiperproducción del exopolisacárido alginato. El cambio hacia dicho fenotipo es bien conocido, y principalmente se debe a una inactivación del gen *mucA* (Govan JR & Deretic V, 1996). Teniendo en cuenta que no es en absoluto frecuente el aislamiento de una cepa mucóide en otro tipo de infecciones, se ha establecido una clara asociación entre este fenotipo y las enfermedades respiratorias obstructivas, como FQ, bronquiectasias, y la EPOC, las cuales parecen reunir las características necesarias para la hiperproducción de alginato (Valderrey AD *et al*, 2010). A pesar de la excelente adaptación que presentan estas variantes, donde la difusión del antibiótico hasta su lugar de acción, así como la acción del sistema inmune, se ven claramente mermadas por la barrera física impuesta por el propio alginato, la situación más frecuente es la coexistencia de fenotipos mucoides y no mucoides, las cuales son capaces de cubrir los diferentes microhábitats presentes en el sistema respiratorio del paciente (Bjarnsholt T *et al*, 2009). Ya desde la década de los 60 se sabía que el fenotipo mucoso estaba íntimamente relacionado con la cronicidad de la infección (Dogget RG *et al*, 1971) y por tanto el cambio de un fenotipo no mucoso hacia un fenotipo mucoso debe relacionarse con un empeoramiento de la función pulmonar, y consecuentemente la producción de alginato debe ser considerada un factor de virulencia (Pedersen SS *et al*, 1992).

No obstante, la capacidad antigénica del alginato tiene un impacto todavía mayor sobre el transcurso de la enfermedad pulmonar crónica, ya que en su presencia el sistema inmune del hospedador producirá de forma masiva anticuerpos anti-alginato incluyendo IgG e IgA (Pedersen SS *et al*, 1990). En los últimos 30 años se ha propuesto que las toxinas bacterianas per sé no son las responsables del daño tisular pulmonar del paciente con FQ, sino más bien la inflamación acelerada por los inmunocomplejos formados por los antígenos de *P. aeruginosa* y los correspondientes anticuerpos, principalmente IgG (Kronborg G *et al*, 1992; Schiøtz PO *et al*, 1972).



FIGURA 4. Producción de alginato en una cepa de *P. aeruginosa* en MHA

- **Fenotipo hipermutador:** este tipo de variante se caracteriza por sufrir un aumento de la tasa de mutación espontánea, característica frecuentemente presente en aislados de provenientes de pacientes con FQ (Oliver A *et al*, 2000). Ello se debe principalmente a un defecto, debido a mutaciones en los genes que codifican para en el sistema de reparación de emparejamientos erróneos (mismatch repair system) del ADN durante la replicación celular. Los principales genes afectados, responsables del correcto funcionamiento de este sistema son *mutS*, *mutL* y *uvrD* (Maciá MD *et al*, 2005; Oliver A *et al*

Introducción

al, 2000), aunque se sabe que defectos en otros genes como *mutY*, *mutM* y *mutT* se relacionan con la aparición de cepas hipermutadoras (Ciofu O *et al*, 2009).

El fenotipo hipermutador presenta ventajas evolutivas en nichos ecológicos cambiantes (Denamur E & Matic I, 2006), y por tanto una población estable de bacterias hipermutadoras parece ser el elemento catalítico para la diversificación fenotípica de la especie.

Dicho fenotipo está íntimamente relacionado con las infecciones crónicas, y podría estar favorecido por la actividad de los leucocitos polimorfonucleares en este tipo de infecciones, en particular con la producción de radicales libres del oxígeno (Ciofu O *et al*, 2005). Este fenotipo es significativamente más prevalente que en infecciones agudas (Gutiérrez O *et al*, 2004), lo cual sugiere que la hipermutación es la clave para la adaptación y la persistencia a largo plazo (Mena A *et al*, 2008), así como para el desarrollo de resistencias a prácticamente todos los antimicrobianos conocidos (Blazquez J *et al*, 2003; Maciá MD *et al*, 2005).

- **Variantes de colonia pequeña o “Small Colony Variants” (SCV):** este fenotipo también aislado con frecuencia en muestras clínicas de pacientes con patología respiratoria obstructiva, (especialmente en FQ) se caracteriza por presentar una forma puntiforme y un tamaño de colonia significativamente más pequeño en medios de cultivos con agar, comparado con una cepa con un crecimiento normal. Así, es frecuente que hasta las 48h de incubación no sean observables. Su reducida tasa de crecimiento junto con la capacidad de revertir hacia el morfotipo de la cepa salvaje, y el crecimiento autoagregativo que presentan, parecen jugar un papel esencial en el fenómeno de persistencia ante un tratamiento antibiótico (Mulcahy LR *et al*, 2010). Esta variante fenotípica se caracteriza además por presentar una capacidad de formación de biofilms aumentada, un aumento en la resistencia antibiótica (especialmente a aminoglucósidos) y una reducción en la motilidad celular (Proctor RA *et al*, 2006; Deziel E, 2001). La presencia de SCV en cultivos de muestras respiratorias se asocia también a un empeoramiento de la función pulmonar (Häussler S *et al*, 2003) y contribuye junto con las variantes mucoides a la persistencia de la infección crónica.

- **Variantes defectivas en el sistema *quorum sensing*:** el *quorum sensing* es un sistema de estímulo-respuesta relacionado con la densidad poblacional. En bacterias tiene funciones como la de coordinar la expresión de ciertos genes en consonancia con la densidad poblacional local. La variante defectiva en este sistema de comunicación es un fenotipo frecuente en aislados de FQ (Smith EE, 2006), generalmente debido a mutaciones en el gen *lasR* y que se cree que forma parte del proceso adaptativo de *P. aeruginosa* en las infecciones crónicas. La presencia de estos mutantes indica que el *quorum sensing* deja de ser un elemento indispensable para el mantenimiento de la infección crónica, especialmente en las fases más avanzadas de la enfermedad (Schaber JA *et al*, 2004).

- **Variantes auxótrofas:** estas variantes características de la infección crónica, dependen de algún compuesto (vitamina, o aminoácido) para su crecimiento. La exacerbación de los síntomas de la FQ se relaciona con un aumento en la población de variantes auxótrofas (Thomas SR *et al*, 2000).

- **Variantes no flageladas:** estos fenotipos se observan especialmente en pacientes que sufren empeoramiento clínico de la enfermedad. Frecuentemente se han aislado cepas que no expresan ni falgelina ni pilina en muestras de pacientes con FQ colonizados crónicamente. Estas cepas, que probablemente se generan a través de la mutación en el gen *rpoN* u otros genes implicados en síntesis del flagelo, presentan una resistencia a la acción fagocítica de los macrófagos (Mahenthalingam E, 1994).

- **Variantes productoras de piomelanina:** se cree que el principal factor responsable de este fenotipo es la mutación en el gen *hmgA* (Rodríguez-Rojas A *et al*, 2009). Las cepas productoras de este pigmento han demostrado estar mejor adaptadas a la infección crónica en un modelo murino de infección pulmonar crónica (Rodríguez-Rojas A *et al*, 2009)

- **Variantes con cambios en el Sistema de Secreción tipo III:** a pesar de ser un factor de virulencia, se ha demostrado que el curso de la infección crónica frecuentemente se asocia a pérdida de uno o varios componentes de dicho sistema de secreción (Dacheux D *et al*, 2000).

- **Fenotipos resistentes a múltiples antibióticos:** durante el curso de la enfermedad respiratoria crónica y sus exacerbaciones se administran múltiples antibióticos en combinación con el fin de erradicar o disminuir la población bacteriana que coloniza las vías respiratorias del paciente. Así es muy frecuente que los aislados provenientes de estos individuos presenten multirresistencia a los antimicrobianos utilizados en esta patología. Los mecanismos de resistencia se explican en el siguiente apartado de la introducción.

1.3.2. Formación de biofilms

Un biofilm o biopelícula es el resultado de una compleja organización formada por una comunidad de bacterias, adherida a superficies vivas o inertes. Dicha población está embebida en una matriz extracelular constituida por exopolisacáridos producidos por las

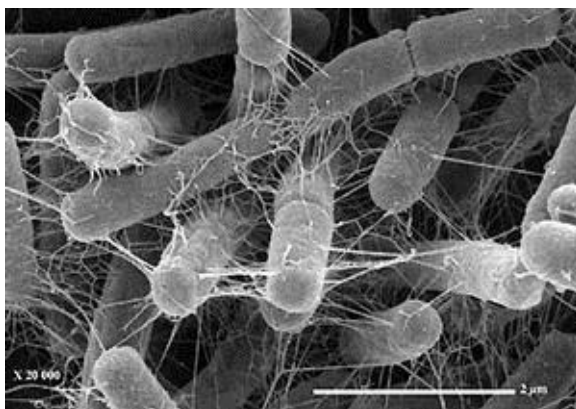


FIGURA 5. Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de un biofilm de *P. aeruginosa*

mismas bacterias, ADN y proteínas (estos últimos también provenientes del hospedador) (Costerton JW *et al*, 1995; Matsukawa M *et al*, 2004; Whitchurch CB, 2002). La construcción del biofilm bacteriano es una empresa bien coordinada, donde la capacidad de emitir y recibir señales referentes a la densidad poblacional, disponibilidad de nutrientes, etc (*quorum sensing*) juega un papel esencial. Se cree que el cambio de modo de crecimiento de planctónico a biofilm representa una

estrategia de supervivencia frente a condiciones desfavorables (Høiby N *et al*, 2001).

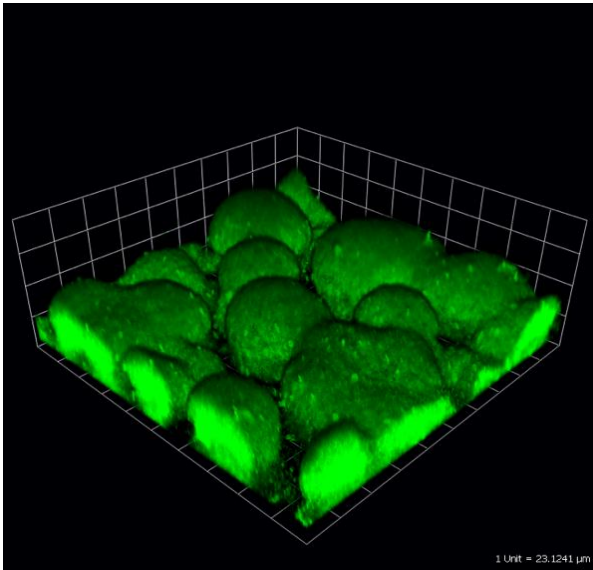


FIGURA 6. Imagen tridimensional de la estructura de un biofilm de *P. aeruginosa* formado in vitro obtenida mediante microscopía confocal

El crecimiento en forma de biofilm ocurre de forma normal en muchas superficies naturales como los dientes (Palmer RJ Jr, 2010), sobre válvulas cardíacas provocando endocarditis (Høiby N *et al*, 1986), en los pulmones de pacientes con FQ u otras enfermedades respiratorias obstructivas crónicas, causando bronconeumonía (Bjarnsholt T *et al*, 2009), en el oído medio en pacientes con otitis media crónica (Hall-Stoodley L *et al*, 2006; Homøe P *et al*, 2009), en rinosinusitis crónica (Sanderson AR *et al*, 2006), en pacientes con osteomielitis crónica e

infecciones de prótesis articulares (Gristina AG *et al*, 1985; Del Pozo JL & Patel R, 2009; Trampuz A & Zimmerli W, 2005), en catéteres intravenosos y stents (Tacconelli E *et al*, 2009) y en heridas crónicas (Bjarnsholt T *et al*, 2008; Kirketerp-Møller K *et al*, 2008).

El biofilm se inicia a partir de bacterias en crecimiento planctónico, y en esta fase todavía pueden ser erradicadas por la acción de antibióticos. El paso siguiente es la unión irreversible a la superficie biológica, seguida de la multiplicación bacteriana que conllevará la formación de microcolonias y la producción de matriz polimérica alrededor de ellas. En condiciones in vitro, el biofilm se vuelve cada vez más grueso y a menudo adopta una estructura tridimensional en forma de seta o de torre. En las fases siguientes el biofilm se irá disgregando parcialmente favoreciendo la liberación de bacterias hacia otros lugares donde se podrán formar más biofilms.

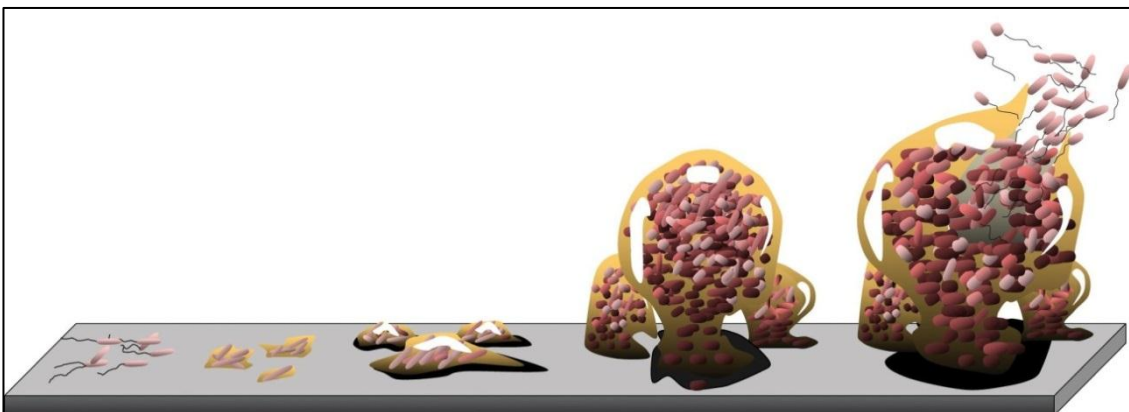


FIGURA 7. Representación gráfica de las diferentes fases del desarrollo de un biofilm de *P. aeruginosa*.

En los últimos años, gracias a la técnica de formación de biofilms *in vitro* en cámara fluyente (o *flow cell*) y a la tecnología de la microscopía confocal, se han podido observar y estudiar muchos parámetros de los biofilms hasta entonces inconmensurables, tales como la morfología, rugosidad, grosor, efecto de ciertos antibióticos, etc.

En la enfermedad respiratoria crónica, el modo de crecimiento de *P. aeruginosa* va a depender mucho de la zona del tracto respiratorio donde se formen. Así, resulta necesario distinguir dos zonas con propiedades bien diferenciadas:

- **Zona respiratoria:** dedicada al intercambio gaseoso. Constituida por los bronquiolos, conductos alveolares y alveolos.
- **Zona conductiva:** dedicada a conducir el aire para que alcance la zona respiratoria. Constituida por todas las otras estructuras respiratorias (cavidad nasal, senos nasales y paranasales, faringe y tráquea).

La infección pulmonar por *P. aeruginosa* es focal y por tanto es posible que pacientes con una actividad pulmonar normal posean porciones de la zona respiratoria seriamente dañadas y otras secciones intactas. En las zonas respiratorias funcionales, *P. aeruginosa* estará expuesta a un ambiente aeróbico o microaerófilico debido al oxígeno proporcionado por el aire inhalado y por la sangre de los capilares que rodean al alveolo pulmonar (Hogg JC, 2004).

El mucus, en cambio, es producido en la zona conductiva por las células caliciformes y las glándulas submucosas, y en esa zona *P. aeruginosa* no se localiza en la superficie del epitelio sino dentro del mucus, cuyo ambiente es anaerobio (Worlitzsch D *et al*, 2002).

Los largos tratamientos tanto inhalados como intravenosos parecen mantener la zona respiratoria protegida de la formación de biofilms por un tiempo prolongado, no obstante varios trabajos sugieren que la zona conductiva (principalmente bronquios y senos nasales y paranasales) actúan como un reservorio donde las *P. aeruginosa* se organiza en forma de biofilms embebidos en el mucus, protegiéndose así de los antibióticos y del sistema inmune del hospedador (Bjarnsholt T *et al*, 2009).

La reacción inflamatoria ocasionada y el progreso en el daño tisular distinguen este tipo de infecciones de la colonización. Todo ello hace que la completa erradicación de la infección crónica resulte imposible, siendo la única meta de los tratamientos antimicrobianos la reducción de la población bacteriana durante exacerbaciones y la consiguiente mejora temporal de la sintomatología. *P. aeruginosa*, *B. cepacia complex*, *Achromobacter xylosoxidans* y *Stenotrophomonas maltophilia*, son los principales patógenos cuya capacidad de crecer en forma de biofilm asegura su persistencia ante largos tratamientos antibióticos (Pressler T *et al*, 2006; Hansen CR *et al*, 2010).

En la FQ los tratamientos suelen incluir un tratamiento antibiótico sistémico a menudo acompañado de un tratamiento antibiótico inhalado. Entre los sistémicos comúnmente utilizados destacan las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, las ureidopenicilinas, las quinolonas, las carbapenemas, los aminoglucósidos y las polimixinas. Dichos antibióticos alcanzan elevadas concentraciones en el tejido pulmonar, pero las concentraciones en esputo son mínimas. Por esa razón se suele combinar con

Introducción

antibióticos por vía inhalada, principalmente tobramicina, colistina y recientemente aztreonam.

Al margen de la terapia sistémica o inhalada, es frecuente la administración de azitromicina vía oral, a dosis bajas (250-500 mg) en esta patología. A pesar de que la azitromicina no posee actividad bactericida frente a *P. aeruginosa*, varios trabajos y muchos años de práctica clínica demuestran que los pacientes que la reciben experimentan una mejoría de los síntomas y una reducción de las exacerbaciones, tos, etc (Yousef AA & Jaffe A, 2010). Se cree que su actividad frente a los biofilms reside en una posible inhibición de la comunicación bacteriana o *quorum sensing*, implicado tanto en la expresión de factores de virulencia como en la propia formación de biofilms.

No obstante, la actividad de la azitromicina directamente sobre biofilms de *P. aeruginosa*, así como el desarrollo de resistencias, no han sido evaluados. Además, teniendo en cuenta la alta prevalencia de cepas hipermutadoras y/o productoras de alginato en este tipo de patologías, no se ha evaluado la influencia que estos fenotipos pueden tener sobre la actividad de la azitromicina en biofilms. Por tanto, uno de los objetivos del presente trabajo será evaluar la actividad de este antibiótico sobre el fenotipo hipermutador y/o mucoso de *P. aeruginosa*, no sólo en condiciones de crecimiento planctónico sino también en forma de biofilm.

1.4. Mecanismos de resistencia antibiótica en *P. aeruginosa*

Las infecciones por *P. aeruginosa* son en sí mismas complicadas, debido a la resistencia antibiótica tanto intrínseca como adquirida que presenta. Ello obliga a menudo a modificar los tratamientos instaurados en pacientes de forma empírica tras el cultivo positivo para este microorganismo. El 0,3% de sus genes codifican para proteínas implicadas en la resistencia antibiótica, y dada la gran plasticidad de su genoma, un 10% de los genes están organizados en islas de patogenicidad. Dichas organizaciones genéticas contienen información variable para la expresión de factores de virulencia, pero además cuentan con la habilidad de incorporar fácilmente nuevos elementos móviles de gran tamaño como integrones, cuya estructura agrupa genes de resistencia (Kipnis E *et al*, 2006; Normark BH & Normark S, 2002; Woods DE, 2004).

1.4.1. Resistencia intrínseca

1.4.1.1. Resistencia mediada por AmpC

Es el mecanismo de resistencia más relevante en *P. aeruginosa*. AmpC es una serin-betalactamasa perteneciente al grupo 1 según la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros, y clase C.

AmpC está presente en muchas enterobacterias como los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Morganella*, *Yersinia*, *Shigella*, en algunas especies del género *Citrobacter*, y en otros no fermentadores como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, etc. (Jacoby GA, 2009). No obstante la complejidad y la eficiencia de regulación del sistema AmpC no es el mismo en todas las especies.

En *P. aeruginosa* AmpC tiene actividad cefalosporinasa inducible no inhibible por ácido clavulánico, y confiere resistencia intrínseca a amoxicilina y a cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación a excepción de la ceftazidima.

La inducción de la expresión de AmpC se encuentra íntimamente ligada al reciclaje de la pared celular. En enterobacterias así como en *P. aeruginosa*, más del 50% de la pared celular es reciclada mediante una elaborada secuencia de eventos. No obstante ese reciclaje también tiene lugar cuando hay daño en la pared celular. Debido a que los antibióticos betalactámicos ejercen su actividad en la pared celular, no es de extrañar que estos organismos hayan establecido una relación bioquímica entre el reciclaje/reparación de la pared celular y el desencadenamiento de un mecanismo de resistencia a antibióticos inducible que implica a la betalactamasa AmpC.

El proceso de inducción es complejo, y constantemente surgen nuevos trabajos que aportan información al respecto. En condiciones basales, la expresión de *ampC* es baja, no obstante en presencia de un inductor dicha expresión se activará. AmpR es una proteína reguladora del sistema AmpC que adopta dos conformaciones que marcarán la actividad como represor de la expresión o como activador de la misma. En condiciones normales AmpR adopta la conformación de represor de la transcripción de *ampC*, pero al entrar en contacto con un producto de degradación o reciclaje del peptidoglicano (anhidro-acetil-

Introducción

murámico-L-lisina-D-glutámico-meso-diaminopimélico, NAMT) cambia su conformación a la de activador de la transcripción de *ampC*. Los niveles citoplasmáticos de NAMT aumentan como consecuencia de la inhibición de las proteínas fijadoras de penicilina por parte de los antibióticos betalactámicos con capacidad de inducir AmpC. Una vez activada la expresión de *ampC*, la síntesis ribosómica se iniciará y AmpC será exportada al espacio periplásmico, donde su concentración aumentará para degradar el betalactámico responsable de su inducción. El proceso de inducción es totalmente reversible, y la expresión de *ampC* se reduce a niveles basales cuando desaparece el agente inductor (Mark BL *et al*, 2012).

No obstante, existen más genes implicados en la regulación del sistema AmpC, de los cuales cabe destacar: *ampD*, *ampDh2*, *ampDh3*, *ampE*, *ampG*, *dacB* y *nagZ*.

El gen *ampD* codifica para una proteína con actividad amidasa citosólica que degrada el NAMT disminuyendo su concentración intracelular, evitando así la activación de AmpR y con ello la activación de AmpC. El gen *ampD* posee dos homólogos (*ampDh2* y *ampDh3*). Mientras que la localización de AmpD es citosólica, la de AmpDH2 es periplasmática y la localización de AmpDH3 es todavía desconocida (Zhang W *et al*, 2013). AmpE es el segundo componente del operón bicistrónico AmpDE y se localiza en la citoplasma, ligado a la membrana. El gen *ampE* codifica para un sensor y transductor capaz de modular la actividad amidasa de AmpD. La presencia de AmpE resulta crucial para la inducción de AmpC (Honoré N *et al*, 1989).

AmpG es una proteína de membrana que actúa como transportador del NAMT desde el espacio periplásmico hacia el citoplasma y por tanto contribuye a elevar los niveles de NAMT. Una vez los metabolitos procedentes del peptidoglicano entran en el citosol son procesados un enzima con actividad N-acetilglucosaminidasa denominada NagZ que los transformara en 1,6-anhidromuropeptidos, los cuales se cree que inducirán la producción de AmpC interactuando con el regulador transcripcional tipo Lys-R AmpR.

El gen *dacB* codifica para la proteína fijadora de penicilinas no esencial PBP4 con actividad carboxipeptidasa y endopeptidasa. Normalmente las PBP representan la diana de los antibióticos betalactámicos pero en este caso la PBP4 se comporta de una forma muy distinta a las demás PBP. Así, actúa como una falsa diana ejerciendo una función de sonda o sensor de betalactámicos, ya que al ser bloqueada por uno de estos antimicrobianos su conformación cambia y activa la transcripción de *ampC* (Moya B *et al*, 2009).

El comportamiento de AmpC frente a un antibiótico betalactámico estará condicionado por dos aspectos: la capacidad de inducción o inducibilidad del sistema AmpC por parte del antibiótico y la eficacia con la que dicha cefalosporinasa hidroliza el betalactámico en cuestión. Así, la cefoxitina o el imipenem son fuertes inductores de AmpC, pero solo la cefoxitina es completamente hidrolizable, con lo que *P. aeruginosa* será sensible a imipenem, siempre y cuando no subyazcan otros mecanismos de resistencia. Por contra, la ceftazidima es un débil inductor del sistema a pesar de ser eficientemente hidrolizado por AmpC y por ello, y en ausencia de otros mecanismos de resistencia adquiridos, *P. aeruginosa* será sensible a ceftazidima.

Varios autores han argumentado que el imipenem no es en absoluto hidrolizable por dicha betalactamasa, ya que se observa que las cepas que hiperproducen AmpC no ven incrementada necesariamente la resistencia a imipenem de forma significativa respecto a la cepa de referencia (Wolter DJ *et al*, 2005). No obstante, otros trabajos muestran como al inactivar *ampC* u otros genes necesarios para la activación de AmpC, como *ampG*, el nivel de resistencia a imipenem se sitúa por debajo de la cepa de referencia. Es más, la resistencia a imipenem debida a la pérdida de OprD se ve totalmente revertida si *ampC* deja de ser funcional, indicando claramente que AmpC tiene cierta actividad hidrolítica sobre el imipenem y efectivamente contribuye activamente en el nivel de resistencia basal al mismo (Zamorano L *et al*, 2011).

Ciertas mutaciones en los genes implicados en la regulación de la expresión de AmpC, como veremos en el apartado de resistencia adquirida, pueden dar lugar a un fenotipo donde dicha expresión resulta desreprimida de forma irreversible. En tal caso la capacidad hidrolítica de AmpC aumenta mucho en valores absolutos, pudiendo afectar a prácticamente la totalidad de los antibióticos betalactámicos, sean o no inductores del sistema.

1.4.1.2. Bombas de expulsión activa

Las bombas de expulsión constituyen un sistema de transporte activo de diversos compuestos desde el citoplasma hasta el medio extracelular. Son por tanto, transportadores involucrados en la captación de nutrientes esenciales e iones, excreción de productos del metabolismo bacteriano y de sustancias tóxicas, además de participar en procesos de comunicación entre células y el medio ambiente. Dichos sistemas de expulsión se han agrupado en 5 superfamilias, en base a la similitud en la secuencia de aminoácidos, al tipo de fuente energética requerida para su funcionamiento y a la especificidad que presentan por sus sustratos. Los transportadores de la superfamilia ABC son dependientes de la hidrólisis de ATP para expulsar los distintos compuestos, en cambio, los transportadores de la familia MATE utilizan el gradiente electroquímico otorgado por Na⁺ o H⁺, al igual que los transportadores pertenecientes a la superfamilia MFS. Las familias RND y SMR utilizan la fuerza protón-motriz para ejercer su función (ver TABLA 1).

A pesar de que la secuenciación del genoma de *P. aeruginosa* reveló la presencia de bombas de expulsión pertenecientes a las 5 superfamilias, el mayor número de ellas pertenecen a la superfamilia RND, con un total de 12 sistemas diferentes (Stover CK *et al*, 2000). Su función biológica se cree que reside en la excreción de determinados compuestos metabólicos y en la detoxificación celular, así como contribuir a la patogenicidad, (Piddock LJ, 2006). Están formadas por tres componentes: una proteína transportadora ubicada en la membrana interna, una proteína accesoria periplasmática o proteína de fusión de membrana y una proteína de membrana externa o porina. Los genes que codifican a los distintos componentes de estas bombas de expulsión se encuentran en el cromosoma bacteriano, en forma de operones. De los 12 operones (ver TABLA 2 y FIGURA 8), sólo 6 incluyen el gen que codifica para la porina, los sistemas restantes se ensamblaran con porinas procedentes de los operones que sí las codifican. Además 7 operones disponen de un gen regulador adyacente cuyo producto actuará como represor o activador de la expresión del mismo.

Introducción

La importancia de estas bombas de expulsión radica en la capacidad de expulsar gran diversidad de sustratos, por lo que son capaces de contribuir a la resistencia frente a una gran cantidad de antimicrobianos no relacionados estructuralmente, y por ello se clasifican como sistemas de expulsión relativamente inespecíficos.

TABLA 1. Descripción de las 5 superfamilias de bombas de expulsión activa

Superfamilia	Tipo transportador	Fuente Energía	Sustratos
MFS: Major Facilitator Superfamily	Secundario	H ⁺ /Na ⁺	Azúcares, polioles, metabolitos del ciclo de Krebs, aminoácidos, péptidos, sideróforos, nucleósidos, aniones inorgánicos, etc
ABC: ATP-binding cassette	Primario	ATP	Péptidos, sideróforos, lípidos, lipopolisacaridos, etc
RND: Resistance-Nodulation-cell Division	Secundario	H ⁺	Antibióticos, metales pesados, lipooligosacáridos, detergents, biocidas, pigmentos, etc
MATE: Multidrug And Toxic compound	Secundario	H ⁺ /Na ⁺	Cationes metabólicos, cationes orgánicos xenobióticos, toxinas, etc
SMR: Small Multidrug Resistance	Secundario	H ⁺	Derivados de amonio cuaternario, bromuro de etidio, acrifalvina, antibióticos

TABLA 2. Breve descripción de los sistemas de expulsión activa de *P. aeruginosa*

Operón	Componentes	Regulador primario	Regulador secundario	Sustratos
<i>mexAB-oprM</i>	MexA MexB OprM	MexR	NalC NalD	Betalactámicos (excepto IP), fluoroquinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, TRI, sulfamidas, triclosán y detergentes
<i>mexXY-oprM</i>	MexX MexY OprM/Opm-	MexZ		Penicilinas, cefalosporinas (excepto CAZ), MER, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, macrólidos y CLR
<i>mexEF-oprN</i>	MexE MexF OprN	MexT	MexS MvaT	Fluoroquinolonas, CLR, TRI y triclosán
<i>mexCD-oprJ</i>	MexC MexD OprJ	NfxB		Penicilinas, cefalosporinas (excepto CAZ), MER, fluoroquinolonas, TET, CLR, macrólidos, TRI, triclosán y detergentes
<i>mexJK</i>	MexJ MexK OprM/OprH	MexL		TET, ERI y triclosán
<i>mexGHI-opmD</i>	MexG MexH MexI OpmD	SoxR		Fluoroquinolonas y vanadio
<i>mexVW</i>	MexV MexW OprM	No descrito		Fluoroquinolonas, ERI, TET y CLR
<i>mexPQ-opmE</i>	MexP MexQ OpmE	No descrito		Fluoroquinolonas, macrólidos, TET y CLR
<i>mexMN</i>	MexM MexN OprM	No descrito		CLR
<i>triABC</i>	TriA TriB TriC OpmH	No descrito		Triclosán
<i>czcCBA</i>	CzcA, CzcB, CzcC, CzcR, CzcS	CzcRS		Zinc, Cadmio y Cobalto
<i>muxABC-opmB</i>	MuxA MuxB MuxC OpmB	No descrito		NOV, AT, macrólidos y TET

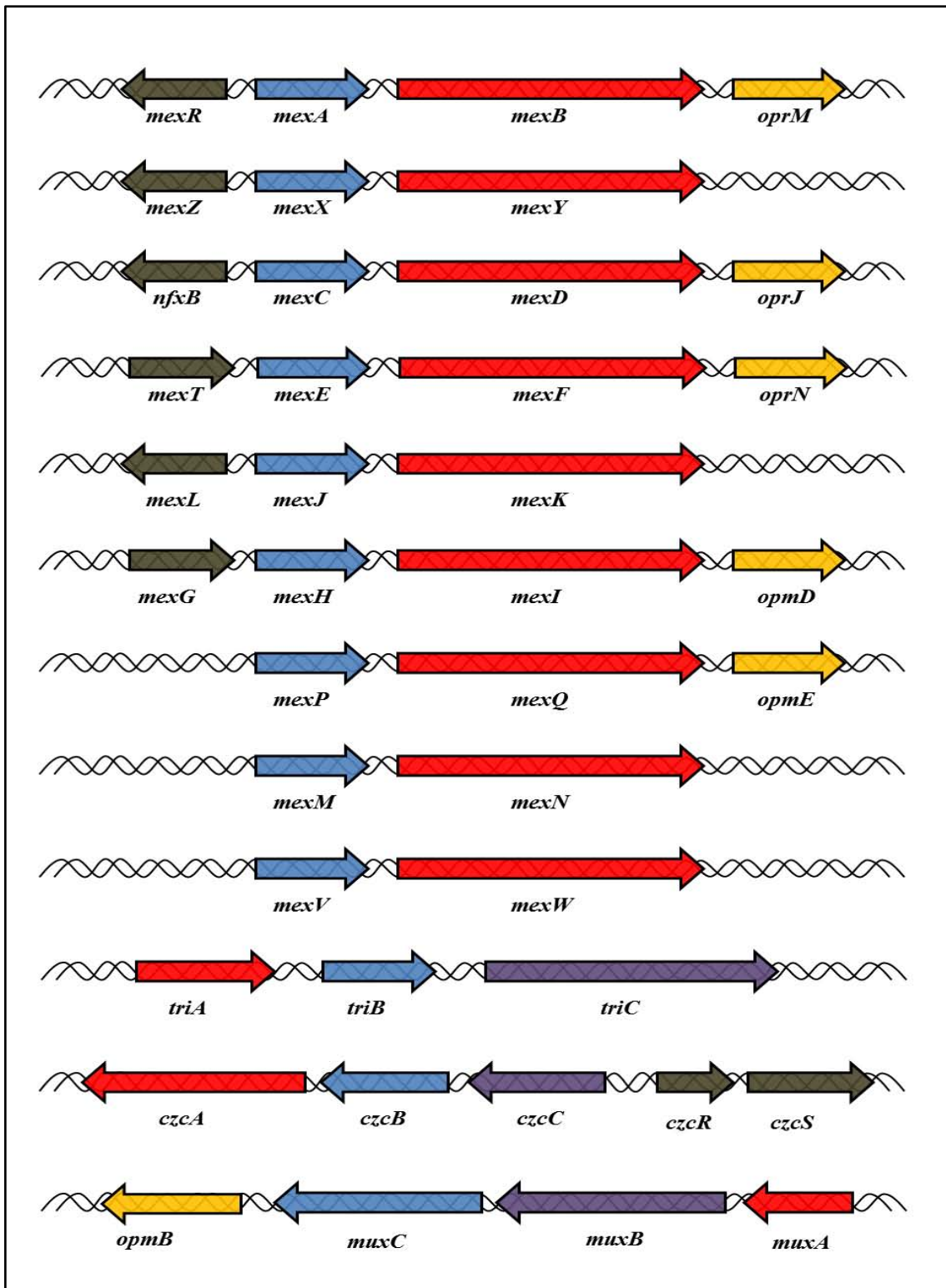


FIGURA 8. Representación esquemática de los operones de las bombas de expulsión activa de *P. aeruginosa*

A. MexAB-OprM

MexAB-OprM es capaz de expulsar antibióticos de diferentes grupos, incluyendo fluoroquinolonas, betalactámicos, inhibidores de betalactamasas, tetraciclinas, macrólidos, cloranfenicol, sulfonamidas, novobiocina y trimetoprim (Li XZ *et al*, 1995 y 1998; Kohler T

et al, 1996; Srikumar R *et al*, 1997 y 1998). De todas las bombas de la familia RND, ésta es la que más betalactámicos puede usar como sustrato. Así, es capaz de expulsar carboxipenicilinas, aztreonam, cefalosporinas de amplio espectro (ceftazidima y cefotaxima), y también carbapenems como meropenem y panipenem, aunque no imipenem. MexAB-OprM contribuye a la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa*, ya que se produce de forma constitutiva en condiciones normales (Poole K, 2001). Estudios previos muestran que el mutante nulo en esta bomba resulta hipersensible, confirmando su papel en la resistencia intrínseca (Masuda N *et al*, 1999).

Otra característica de este sistema de expulsión es que su expresión es dependiente de la fase de crecimiento (Evans K *et al*, 1999). Al ir aumentando la densidad poblacional, también lo hace la expresión de MexAB-OprM hasta alcanzar su máximo al final de la fase de crecimiento exponencial o logarítmico. Estudios previos sugieren que el *quorum sensing* es el responsable de esta regulación a través de señales químicas (Masada H *et al*, 2004).

MexR es el regulador principal de la expresión de MexAB-OprM y actúa como un represor de la expresión del operón. Estudios recientes revelan que su capacidad de reprimir la expresión está gobernada por su estado de oxidación o reducción. Así, MexR podría regular la expresión del operón en respuesta al estrés oxidativo (Chen H *et al*, 2008 y 2010).

La actividad represora de MexR también está modulada por el producto de *armR* el cual ejerce de anti-represor de MexR uniéndose a él y mermando su capacidad para actuar sobre la región promotora de *mexAB-oprM* (Daigle DM *et al*, 2007, Wilke MS *et al*, 2008). *armR* forma parte del operón formado por los genes PA3720-*armR*, el cual está regulado negativamente por el producto de del gen *nalC*, ya que los mutantes en *nalC* (bien creados in vitro o en cepas clínicas) muestran una hiperexpresión del operón PA3720-*armR*, y por tanto una hiperexpresión de *mexAB-oprM* y un consiguiente fenotipo multirresistente (Cao L *et al*, 2004; Starr LM *et al*, 2012). No obstante NalC actuaría como un promotor secundario, ya que la pérdida de su función biológica se traduce en una hiperexpresión de MexAB-OprM, pero a niveles más bajos que los ocasionados por la pérdida de la función de MexR o de NalD (Srikumar R *et al*, 2000), un tercer represor involucrado en la compleja regulación de la expresión de *mexAB-oprM*. NalD es codificado por un gen externo al operón *mexAB-oprM* y al *nalC/PA3720-armR* el cual ejerce su acción desde otro promotor proximal. Las mutaciones en *nalD* se han descrito también en mutantes multirresistentes de laboratorio y en cepas clínicas (Sobel ML *et al*, 2005).

El gen que codifica para la porina (*oprM*), tiene la capacidad de expresarse independientemente de *mexA* y *mexB*, gracias a un promotor débil hallado en la región codificante de *mexB* (Zhao Q *et al*, 1998). Ya que OprM es una porina utilizada por las bombas MexXY, MexJK, MexVW, y MexMN (cuyos operones carecen de información para la codificación de su propia porina), la expresión independiente de *oprM* posiblemente tenga como objetivo procurar suficiente cantidad de dicha proteína para estos sistemas carentes de ella, especialmente en caso de expresión diferencial con MexAB-OprM o en el caso de que la expresión a través de su promotor principal, *mexR* se vea comprometida.

B. MexXY-OprM

Tal como se ha mencionado anteriormente, el operón MexXY carece del gen codificante para la proteína de membrana externa, o porina (TABLA 2, FIGURA 8). No obstante tiene la capacidad de asociarse con OprM, y posiblemente con otras porinas como OpmB, OpmG, OpmH y OpmI para formar un sistema funcional tricomponente (Chuanhuen R *et al*, 2005; Murata T *et al*, 2002). Como sustratos de esta bomba destacan las fluoroquinolonas, penicilinas (exceptuando carbenicilina y sulbenicilina), cefalosporinas (exceptuando ceftazidima y cefsulodina), aminoglucósidos, meropenem, tetraciclinas, cloranfenicol y eritromicina (Schweizer HP, 2003).

La expresión de *mexXY* es inducible por la presencia de tetraciclinas, eritromicina y gentamicina (Masuda N *et al*, 2000), y la delección de estos genes en la cepa salvaje de *P. aeruginosa* ocasiona una hipersensibilidad frente a estos antimicrobianos, sugiriendo su papel en la resistencia intrínseca de este microorganismo. No obstante, parece no contribuir a la resistencia intrínseca frente a fluoroquinolonas (sustrato conocido de dicha bomba) ya que estas han demostrado no inducir la expresión de *mexXY* (Masuda N *et al*, 2000).

Localizado en el mismo operón que *mexX* y *mexY*, encontramos el gen *mexZ*, cuyo producto pertenece a la familia de reguladores transcripcionales TetR y actúa como regulador negativo de la expresión de la bomba. Por tanto, mutaciones en *mexZ* o en la región intergénica *mexZ-mexX* se han asociado con una hiperexpresión modesta de *mexXY* (unas 5 veces más que la cepa salvaje) (Islam S *et al*, 2004; Vogne C *et al*, 2004). No obstante al exponer tanto el mutante nulo en *mexZ*, como la cepa salvaje a espectinomicina (inductor de *mexXY*) la expresión aumenta unas 18 veces (Hay T *et al*, 2013). Todo ello hace pensar que existen otros genes implicados en la regulación de este sistema los cuales todavía son desconocidos.

Recientemente se ha revelado la presencia de un anti-represor de MexZ, denominado ArmZ cuya función es bloquear la inhibición de la transcripción de *mexXY* por parte de MexZ, el cual actúa, por tanto, como un activador de la transcripción. Además, *armZ* debe estar intacto si *mexZ* lo está, para que se pueda inducir la expresión del sistema MexXY (Hay T *et al*, 2013).

Un último trabajo publicado recientemente ha caracterizado una tercera vía de activación de la expresión de *mexXY* debida a la alteración en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dos componentes del sensor histidina quinasa ParRS. Además el aumento de expresión del operón *mexXY* por esta tercera vía va asociado a un descenso en la expresión del gen codificante para la porina OprD (Guénard S *et al*, 2014).

C. MexCD-OprJ

El operón que codifica para MexCD-OprJ se secuenció por primera vez en 1996, y mostró un alto grado de homología con MexAB-OprM. Son muchos los compuestos que pueden ser expulsados por este sistema: fluoroquinolonas, ciertos betalactámicos, cloranfenicol, tetraciclinas, novobiocina, macrólidos y trimetoprim (Gotoh N *et al*, 1998; Masuda N *et al*, 1996; Srikumar R *et al*, 1998). A diferencia de MexAB-OprM, este sistema no posee un amplio perfil de extrusión de betalactámicos ya que básicamente solo expulsa

penicilinas (exceptuando carbenicilina y sulbenicilina), cefalosporinas de cuarta generación (cefepima, cefpiroma y cefopran) y meropenem.

Los mutantes de la cepa salvaje defectivos en uno o varios componentes del sistema tricompone no ven alterado su perfil de resistencia, hecho que demuestra que MexCD-OprJ no contribuye a la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa*. De hecho, a pesar de que existen unos niveles basales de expresión de *mexCD-oprJ* en la cepa salvaje, éstos no son suficientes para producir niveles detectables de proteína. La expresión de *mexCD-oprJ* se ve inducida durante la exposición a bromuro de etidio, rodamina, acrifalvina, y especialmente por agentes que dañan la membrana, como cloruro de benzalconio o clorhexidina. En esta situación la inducción es dependiente del factor sigma de respuesta a estrés AlgU, también llamado AlgT (Fraud S *et al*, 2008).

El gen *nfxB* está localizado corriente arriba y en sentido contrario de transcripción respecto a *mexCD-oprJ*, y su producto es el que gobierna la expresión de dicha bomba (TABLA 2, FIGURA 8)

NfxB posee el motivo de estructura secundaria hélice-bucle-hélice característico de proteínas capaces de unirse al ADN (FIGURA 9) y regula de forma negativa la expresión de *mexCD-oprJ*, así como su propia expresión, mediante su unión a una zona repetitiva de 39 pares de bases en la región intergénica *nfxB-mexC*. Las mutaciones en *nfxB* alteran la actividad represora de NfxB dando lugar a una hiperexpresión de *mexCD-oprJ*, en los llamados “mutantes *nfxB*” (Shiba T *et al*, 1995; Poole K *et al*, 1996). Se han descrito varios tipos de mutaciones inactivantes en el gen regulador, tanto en cepas clínicas como en cepas de laboratorio, como sustituciones, deleciones, o la interrupción del gen mediante una secuencia de inserción.

Al parecer no sólo *nfxB* es capaz de regular la expresión de *mexCD-oprJ* ya que los mutantes deficientes en *mexAB-oprM* también ven incrementada la expresión de *mexCD-oprJ* (Li XZ *et al*, 2000). El mecanismo mediante el cual MexAB-OprM ejerce su influencia sobre MexCD-OprJ todavía no está determinado.

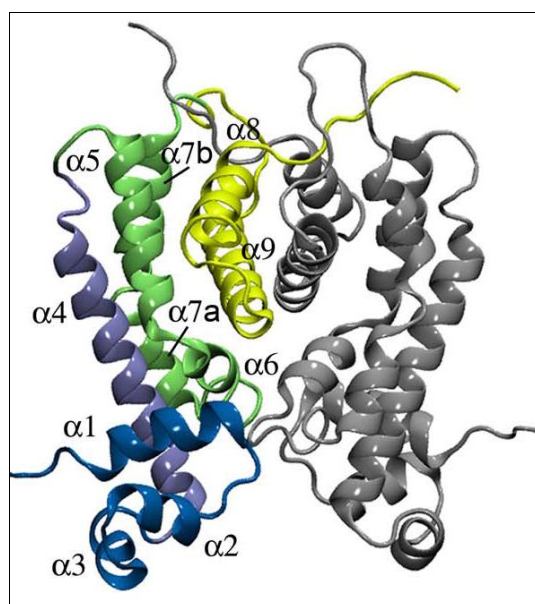


FIGURA 9. Modelo estructural tridimensional de NfxB (Monti RM *et al*, 2013)

Mientras la hiperproducción de MexCD-OprJ debida a mutación en *nfxB* confiere resistencia a los antimicrobianos capaces de actuar como sustratos de la bomba, en la misma cepa se observa un curioso fenotipo hipersensible a ciertos betalactámicos no sustratos de la bomba (tema que será tratado en profundidad en el apartado 1.7 de esta introducción) y aminoglucósidos (Masuda N *et al*, 1996; Poole K *et al*, 1996). La complementación de estos mutantes con el gen *nfxB* salvaje se sabe que restaura el fenotipo y perfil de sensibilidad de la cepa salvaje (Masuda N *et al*, 1996).

Además, no todas las mutaciones en *nfxB* producen el mismo nivel de expresión de la bomba, así Masuda y colaboradores describieron dos tipos de mutantes *nfxB* (A y B) con moderada y alta expresión *mexCD-oprJ* y observó que la hipersensibilidad descrita es mayor cuanto mayor es la producción de MexCD-OprJ.

D. MexEF-OprN

El operon *mexEF-oprN* fue caracterizado por primera vez en 1997 por Kohler T y colaboradores y la secuencia aminoacídica de su correspondiente producto presenta un alto grado de homología con MexAB-OprM y MexCD-OprJ (Kohler T *et al*, 1997).

El cloranfenicol, las fluoroquinolonas y el trimetoprim son sustratos bien conocidos de MexEF-OprN, no obstante la bomba no parece presentar afinidad por los betalactámicos. A diferencia de MexAB-OprM y MexCD-OprJ, la expresión de su operón no está regulada por un represor. Son muchos los factores que pueden controlar la transcripción de *mexEF-oprN*. *mexT* codifica para una proteína de la familia de activadores transcripcionales tipo LysR, y es capaz de activar la transcripción del operón. *mexT* está localizado corriente arriba respecto a *mexEF-oprN* y en el mismo sentido de transcripción que el propio operón (Kohler T *et al*, 1999) (TABLA 2, FIGURA 8).

Existe cierta variabilidad en la secuencia de *mexT* en diferentes cepas salvajes de *P. aeruginosa* y se han descrito dos alelos de *mexT* que contienen una o dos copias de una secuencia repetitiva de 8 pb, lo cual resulta en un cambio de marco de lectura que convierte la forma inactiva de MexT en activa (Maseda H *et al*, 2000). La activación puede llevarse a cabo por diferentes vías. En ciertas cepas *mexT* permanece en forma inactiva o latente debido a mutaciones supresoras en la región codificante, no obstante otras mutaciones adicionales o deleciones pueden convertir la forma inactiva de MexT en activa (Maseda H *et al*, 2004).

En otras cepas, sin embargo, la activación de la transcripción de *mexEF-oprN* ocurre tras la inactivación por mutación de *mexS*, gen localizado corriente arriba respecto a *mexT*, el cual codifica para una oxidorreductasa. Se cree que la inactivación de MexS ocasiona la acumulación de ciertos metabolitos que representan la señal química para la activación de MexT y la correspondiente producción de MexEF-OprN, la cual expulsará dichos metabolitos al exterior celular (Sobel ML *et al*, 2005).

Existen otros mecanismos para la regulación de la expresión del operón independientes de MexT. MvaT es un regulador global de genes implicados en la virulencia y formación de biofilms en *P. aeruginosa* que ha demostrado ser capaz de reprimir la expresión de MexEF-OprN. Así, la deleción de *mvaT* ocasiona un incremento en la expresión de *mexEF-oprN* no dependiente de *mexT* o *mexS* (Westfall LW *et al*, 2006).

De forma análoga al mutante *nfxB*, los mutantes *nfxC* que hiperexpresan MexEF-OprN también tornan hipersensibles a ciertos betalactámicos y aminoglucósidos (Fukuda H *et al*, 1995; Poole K, 2002). Dicha hipersensibilidad a betalactámicos se asocia a una disminución de la actividad de MexAB-OprM debida a la represión del sistema *quorum sensing* ocasionada por MexT (Maseda H *et al*, 2004).

Otro aspecto interesante de la regulación de MexEF-OprN es la influencia que ésta ejerce sobre OprD. Las cepas de *P. aeruginosa* que hiperexpresan *mexEF-oprN* a través de la activación de MexT tornan más resistentes a los antibióticos sustratos de la bomba y también al imipenem, el cual no puede ser bombeado a través de MexEF-OprN. Esta pérdida de sensibilidad que experimenta el imipenem se asocia con un descenso de la expresión de *oprD* que se traduce en una menor cantidad de OprD en la membrana externa y por tanto una menor entrada del carbapenem al interior celular (Masuda N *et al*, 1995; Kohler T *et al*, 1997; Ochs MM *et al*, 1999). Ciertos trabajos muestran como MexT es capaz de disminuir por sí mismo la expresión de *oprD*, causando una reducción significativa de OprD (Kohler T *et al*, 1999). Este fenómeno también se ha observado tras la activación de la transcripción de *mexEF-oprN* a través de la mutación en *mexS* (Sobel ML *et al*, 2005), no obstante la inactivación del regulador global MvaT ocasiona tanto la hiperexpresión de *mexEF-oprN* como la de *oprD* (Westfall LW *et al*, 2006).

E. Otras bombas

A parte de las cuatro bombas de expulsión ya mencionadas, existen otras seis cuya contribución a la resistencia antibiótica y los factores que gobiernan su expresión han empezado a describirse recientemente. MexJK se descubrió mediante la selección con triclosán de un mutante nulo en *mexAB-oprM* y *mexCD-oprJ*. El operón *mexJK* también carece del gen que codifica para la porina, pero es posible formar el sistema tricomponente con las porinas OprM y OpmH (Chuanchuen *et al*, 2005). MexJK-OprM es capaz de exportar eritromicina y tetraciclinas hacia el medio intercelular, mientras que MexJK-OpmH extruye triclosán. *mexJK* parece que no se expresa en cepas salvajes (Chuanchuen R *et al*, 2005). Corriente arriba de *mexJK*, y en sentido opuesto de transcripción se encuentra *mexL*. Su producto, MexL pertenece a la familia de reguladores TetR, y su función es unirse a la región intergénica *mexL-mexJ* reprimiendo así la expresión del operón y la propia expresión de *mexL*. Una mutación que afecte al motivo hélice-giro-hélice de MexL, impedirá su unión al promotor ocasionando la hiperexpresión de *mexJK* (Chuanchuen R *et al*, 2005). Se ha documentado la hiperexpresión de esta bomba en ciertos aislados clínicos de *P. aeruginosa*, no obstante su contribución a la resistencia antibiótica no está dilucidada (Hocquet D *et al*, 2006).

Otra bomba de expulsión activa es *mexGHI-opmD*. Su expresión es detectable en cepas salvajes (expresión constitutiva) y está gobernada por SoxR, una proteína con actividad redox perteneciente a la familia de reguladores transcripcionales MerR (Aendekerk S *et al*, 2002; Palma M *et al*, 2005). El único antibiótico capaz de ser expulsado por este sistema hasta ahora conocido es el norfloxacin, aunque también es capaz de extruir otros compuestos como Vanadio, acriflavina y bromuro de etidio (Aendekerk S *et al*, 2002). Curiosamente un mutante nulo en *mexI* y *opmD* muestra menor sensibilidad a tetraciclina, ticarcilina/clavulánico, kanamicina, espectinomicina, carbenicilina, ácido

nalidíxico y cloranfenicol (Aendekerk S *et al*, 2005), efecto que algunos autores atribuyen a un aumento en la expresión de otra bomba en un efecto compensatorio, tal como se ha observado con otras bombas de expulsión activa (Li XZ *et al*, 2000).

MexVW es otra bomba de expresión constitutiva en *P. aeruginosa* que no dispone del gen que codifica para la porina en su operón y por tanto usa OprM y otras porinas todavía no identificadas para poder expulsar fluoroquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol y eritromicina (Li Y *et al*, 2003). MexPQ-OpmE expulsa fluoroquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol y algunos macrólidos, mientras que MexMN en combinación con OprM es capaz de extruir cloranfenicol y tianfenicol (Mima T *et al*, 2005).

TriABC es otra bomba de expulsión activa perteneciente a la familia RND, que a diferencia de otros operones de dicha familia consta de dos genes que codifican para diferentes proteínas de fusión de membranas, TriA y TriB, y ambas son imprescindibles para la extrusión de sustratos (Mima T *et al*, 2007). OpmH es la porina que se asocia a TriABC para formar una bomba funcional capaz de expulsar triclosán (Mima T *et al*, 2007).

CzcCBA es otra bomba perteneciente a la familia RND cuya expresión es regulada por el sistema bicomponente perteneciente al mismo operón CzcRS. Es capaz de expulsar metales como Zinc, Cadmio y Cobalto (Rensing C *et al*, 1997; Hassan MT *et al*, 1999; Perron K *et al*, 2004; Caille O *et al*, 2007). Curiosamente CzcR también reprime la expresión de *oprD* haciendo aumentar las CMI de carbapenems (Trias J & Nikaido H, 1990) y reduce la expresión de genes implicados en la virulencia de *P. aeruginosa* (Dieppo G *et al*, 2012).

MuxABC-OpmB fue la última de las 12 bombas de expulsión activa pertenecientes a la familia RND que se describió (Mima T *et al*, 2009). La introducción del operón en un plásmido multicopia en la cepa salvaje defectiva en MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprM, hizo aumentar las CMI de novobiocina, aztreonam, macrólidos y tetraciclina (Mima T *et al*, 2009). Curiosamente trabajos recientes con el mutante nulo en *muxA* no experimentó una reducción alguna en las CMI de dichos antibióticos. Es más, dicho mutante nulo experimenta un aumento en las CMI de ampicilina y carbenicilina (Yang L *et al*, 2011).

1.4.2. Resistencia adquirida

Además de su resistencia intrínseca ya mencionada, *P. aeruginosa* puede presentar mutaciones en sus genes que conducen al desarrollo de resistencia y/o adquirir elementos genéticos foráneos que le conferirán resistencia, como aquellos que codifican betalactamasas (Gupta V, 2008; Zhao WH & Hu ZQ, 2010) y enzimas modificantes de aminoglucósidos (Poole K, 2005; Ramírez MS & Tolmasky ME, 2010) vía transferencia horizontal, los cuales representan los principales mecanismos contribuyentes en el desarrollo de resistencia en *P. aeruginosa* (Lister PD *et al*, 2009; Livermore DM, 2002; Poole K, 2011; Strateva T & Yordanov D, 2009).

1.4.2.1. Mutaciones en genes cromosómicos

- Mutaciones en el sistema de regulación de AmpC:

Constituyen el mecanismo más importante de resistencia a betalactámicos en *P. aeruginosa* y conducen a distintos grados de desrepresión de la producción de AmpC,

reduciendo la sensibilidad a cefalosporinas de amplio espectro como ceftazidima (Juan C *et al*, 2006; Queenan AM *et al*, 2010; Moya B *et al*, 2009) y penicilinas, como ticarcilina (Cavallo JD *et al*, 2007; Dubois V *et al*, 2008). Las principales mutaciones que conducen a este estado desreprimido acaecen en los siguientes genes:

➤ ***ampR***, cuya mutación haga cambiar su conformación irreversiblemente a la de activador de la transcripción de *ampC*. A pesar de ser un mecanismo común en enterobacterias, es relativamente infrecuente en *P. aeruginosa* (Bagge N *et al*, 2002; Juan C *et al*, 2005; Quale J *et al*, 2006; Cabot G *et al*, 2012).

➤ ***ampD***, o en *ampD* más alguno de sus homólogos (*ampDh2* y/o *ampDh3*). Dicha mutación inactivante implica el cese de la actividad amidasa citosólica de AmpD y por tanto el desplazamiento del equilibrio entre moléculas activadoras y represoras de la transcripción, ocasionando, vía activación de AmpR, la expresión de *ampC* (Juan C *et al*, 2006).

➤ ***dacB***, el cual es un gen que codifica para la proteína fijadora de penicilinas no esencial PBP4. Dicha inactivación conlleva la activación de la transcripción de *ampC* dependiente de AmpR (Moya B *et al*, 2009).

- Mutaciones en los genes que codifican para las topoisomerasas:

Ciertas mutaciones en los genes que codifican para las topoisomerasas II (*gyrA* y *gyrB*) y IV (*parC* y *parE*), confieren resistencia a las fluoroquinolonas más fácilmente en *P. aeruginosa* que en enterobacterias ya que una sola mutación le confiere resistencia a este grupo de antibióticos, mientras que en enterobacterias son necesarias dos o más mutaciones (Jalal S & Wretling B, 1998). Estas enzimas son las responsables del superenrollamiento del ADN, y además juegan un papel esencial en la replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN (Drlica K & Zhao X, 1997). En infecciones de heridas y del tracto urinario por *P. aeruginosa* las mutaciones principales que confieren resistencia a este grupo de antimicrobianos son las que afectan a las topoisomerasas II y IV (Jalal S & Wretling B, 1998), a diferencia de los aislados resistentes de enfermos de FQ donde las bombas de expulsión activa cobran mayor protagonismo (Jalal S *et al*, 2000).

- Mutaciones en *oprD*:

OprD es una porina especializada en la absorción de los aminoácidos cargados positivamente, como la lisina. La pérdida de OprD debido a una mutación inactivante en el gen *oprD*, se asocia con un aumento de resistencia a imipenem, ya que dicha porina es requerida para la internalización del carbapenem a través de la membrana externa. Así, esta pérdida incrementa la CMI de imipenem de 1-2 a 8-32 µg/mL (Pai H *et al*, 2001; Livermore DM, 2001) y causa una pérdida de sensibilidad a meropenem, sin entrar en los rangos de resistencia, según los puntos de corte (Pirnay JP *et al*, 2002; El Amin N *et al*, 2005; Wolter DJ *et al*, 2004). Para que *P. aeruginosa* adquiera resistencia a meropenem se requiere la combinación de la de pérdida de OprD con otro u otros mecanismos tales como la hiperexpresión de MexAB-OprM o la hiperproducción de AmpC (Gutierrez O *et al*, 2007).

No obstante, en la resistencia a imipenem por pérdida de OprD, AmpC juega un papel fundamental. Así, para que la reducción en el flujo de entrada de imipenem a través de la membrana por pérdida de OprD implique la resistencia a imipenem, es imprescindible que la célula disponga de un AmpC plenamente funcional y cuente con unos niveles aceptables de AmpC en el espacio periplásmico (Zamorano L *et al*, 2011)

- Mutaciones que conducen a la hiperexpresión de bombas de expulsión activa:

Como se ha mencionado, MexAB-OprM está implicado en resistencia intrínseca a diversos antibióticos. Los mutantes en sus genes represores, *mexR*, y *nalC* (y en menor medida, los mutantes en *nalD*), que sobreexpresan este sistema, ven su resistencia aumentada a fluoroquinolonas, betalactámicos, tetraciclina, macrólidos, cloranfenicol, novobiocina, trimetoprim, sulfonamidas y a meropenem (Srikumar R *et al*, 2000; Li XZ *et al*, 2003).

Los mutantes que sobreexpresan MexCD-OprJ debido a la mutación inactivante en su regulador negativo *nfxB*, ven aumentada su CMI de fluoroquinolonas, macrólidos, meropenem, cloranfenicol, novobiocina, tetraciclina, trimetoprim, cefalosporinas de cuarta generación, y triclosán. Sin embargo, estos mutantes son hipersensibles a carbenicilina, sulbenicilina, cefpodoxima, ceftriaxona, imipenem, aztreonam y a los aminoglucósidos (Poole K *et al*, 1996).

La sobreexpresión de MexEF-OprN (mutantes *nfxC*) confiere resistencia a fluoroquinolonas, cloranfenicol, trimetoprim, triclosán e imipenem (Köhler T *et al*, 1997). Estos mutantes, al igual que los mutantes en el gen *nfxB*, también son hipersensibles a los betalactámicos y los aminoglucósidos, como se verá más adelante (Fukuda H *et al*, 1995; Poole K, 2002).

Mutantes que sobreexpresan el sistema MexXY son moderadamente resistentes a aminoglucósidos y fluoroquinolonas (Poole K, 2001), mientras que la sobreexpresión del sistema MexJK confiere resistencia a triclosán, tetraciclina y eritromicina (Chuanchuen R *et al*, 2002).

1.4.2.2. Adquisición de determinantes de resistencia por transferencia horizontal

De todo el arsenal terapéutico antipseudomónico, es en el grupo de los betalactámicos y en el de los aminoglucósidos donde los determinantes de resistencia adquiridos por transferencia horizontal tienen un mayor impacto. Existen numerosas enzimas cuyos genes se pueden transmitir horizontalmente entre cepas de *P. aeruginosa*, o incluso entre cepas de esta y otras especies bacterianas.

La producción de betalactamasas inactivantes juega un papel crucial en resistencia adquirida a betalactámicos. La variedad, la prevalencia y la significancia clínica han sido motivo de alarma y preocupación, y por ello han sido ampliamente estudiadas en las últimas décadas (Hancock RE, 1998; Livermore DM, 2002; Livermore DM *et al*, 2006). Las más prevalentes en *P. aeruginosa* son penicilinasas de clase A (serín-betalactamasas), como las familias PSE, CARB y TEM. En este grupo las PSE parecen ser las más prevalentes, especialmente PSE-1 y PSE-4 (Bert F *et al*, 2002), no obstante su impacto clínico es limitado ya que no afectan a las cefalosporinas de amplio espectro, monobactámicos o

carbapenems. Aunque menos frecuentes, en *P. aeruginosa* también se han detectado betalactamasas de espectro extendido (BLEE) de clase A pertenecientes a las familias PER, CTX-M, TEM, SHV, GES y VEB (Weldhagen GF *et al*, 2003; Danel F *et al*, 1995; Castanheira M *et al*, 2004; Nordmann P & Naas T, 1994; Picão RC *et al*, 2009; Poirel L *et al*, 2001; Woodford N *et al*, 2008, así como BLEE de clase D pertenecientes a la familia OXA (Philippon LN *et al*, 1997).

De forma análoga a las enterobacterias, las BLEE no confieren resistencia frente a los carbapenems a *P. aeruginosa*, no obstante la prevalencia de enzimas con actividad carbapenemasa ha ido incrementándose de forma alarmante en los últimos años.

La primera carbapenemasa de clase B (metalobetalactamasas) caracterizada en *P. aeruginosa* se identificó en Japón, en 1991 (Watanabe M *et al*, 1991) y desde entonces se han ido describiendo en prácticamente todo el mundo. En esta especie se han descrito las familias VIM, IMP, SPM, GIM y recientemente las AIM, NDM y FIM pertenecientes a esta clase (Nordmann P, & Poirel L, 2002; Yong D *et al*, 2012; Jovcic B *et al*, 2011; Pollini S *et al*, 2013). Las metalobetalactamasas son las carbapenemasas más prevalentes y preocupantes en *P. aeruginosa*, especialmente las VIM, seguidas de las IMP, de hecho podría decirse que la VIM-2 es probablemente la carbapenemasa más extendida en todo el mundo (Walsh TR *et al*, 2005).

Las carbapenemasas de clase A en *P. aeruginosa* quedan circunscritas a las familias GES (GES-2 y GES-5) y KPC (KPC-2 y KPC-5), ambas de codificación plasmídica.

Las carbapenemasas de clase D pertenecientes a la familia de las OXA, se circunscriben prácticamente en *Acinetobacter baumannii* (Paton R *et al*, 1993) a excepción de la OXA-48, la cual está ampliamente extendida en enterobacterias. A partir de aquí su diversificación ha sido enorme.

La diseminación de estos determinantes de resistencia puede originar situaciones epidémicas de cepas multirresistentes. Un ejemplo de ello fue el reciente brote epidémico que tuvo lugar en el Hospital 12 de Octubre de Madrid, donde una cepa de *P. aeruginosa* productora de GES-5 y resistente a todos los antibióticos antipseudomónicos a excepción de la colistina, fue diseminada en 24 pacientes del hospital en el periodo 2007-2008 (Viedma E *et al*, 2009).

El otro grupo de enzimas que se adquiere por transferencia horizontal es el grupo de las enzimas modificantes de aminoglucósidos. Estos enzimas se unen a los grupos amino o hidroxilo de los aminoglucósidos, generando complejos inactivos, incapaces de afectar a la diana de actuación del antibiótico, el ribosoma. En función de la modificación que causan en el aminoglucósido, las enzimas modificantes pueden ser: acetiltransferasas (AACs), nucleotidiltransferasas (ANTs), o fosfotransferasas (APH) (Ramírez MS & Tolmasky ME 2010). Se han descrito más de 20 enzimas modificantes distintas, y dado que cada una puede afectar a más de un antibiótico y que un mismo antibiótico puede verse afectado por diferentes enzimas, los perfiles de resistencia son complejos. Estos genes se encuentran en integrones junto con otros genes de resistencia (Poole K, 2005; Ramírez MS and Tolmasky ME, 2010).

Las enzimas modificantes de aminoglucósidos más frecuentes en los aislados de *P. aeruginosa* son AAC(6')-II y ANT(2'')-I; otras enzimas presentes, aunque menos frecuentes,

Introducción

son por ejemplo AAC(3)-II y APH(3'). La distribución de los distintos tipos de estas enzimas es muy diferente según la región geográfica y sus patrones de administración de aminoglucósidos (Miller GH *et al*, 1997).

Otro tipo de enzimas modificadoras son las metilasas ribosomales 16S (Doi Y & Arakawa Y 2007), se han descrito en otras bacterias además de *P. aeruginosa*, como por ejemplo en miembros de la familia Enterobacteriaceae, así como también en no fermentadores. Estas enzimas han emergido como un potente mecanismo de resistencia, confiriendo resistencia de alto nivel a la gran mayoría de los aminoglucósidos utilizados, mediante la alteración de la unión del antibiótico a la molécula diana. Los organismos que producen esta metilasa son por lo general multirresistentes ya que además suelen producir betalactamasas de amplio espectro o metalobetalactamasas (Doi Y & Arakawa Y 2007; van Hoek AH *et al*, 2011).

1.5. Bombas de expulsión y *fitness*/virulencia

Tal como hemos visto, la resistencia intrínseca en *P. aeruginosa* se debe en parte a la presencia de varios sistemas o bombas de expulsión activa codificados en su genoma. La expresión de estos sistemas de expulsión está estrictamente regulada a la baja, al menos en las condiciones de crecimiento en el laboratorio (Poole K, 2000). No obstante, en el laboratorio se pueden obtener fácilmente mutantes que hiperexpresan uno o varios sistemas bajo la presión selectiva de un antibiótico (Kholer T *et al*, 1997). Además, estos mutantes son frecuentemente aislados en muestras clínicas de pacientes que acaban de recibir antibioterapia (Pumbwe L & Piddock LJ, 2000). Así, la desrepresión de determinantes de resistencia mediante una sola mutación puntual inactivante en el gen represor parece actuar como una herramienta con un papel crucial en la adquisición de resistencias durante el tratamiento antibiótico (Martinez JL & Baquero F, 2000).

Las bombas de expulsión activa, a diferencia de otros mecanismos de resistencia, no cuentan con una alta especificidad de sustrato ya que además de expulsar antimicrobianos de diversas familias son capaces de extruir compuestos biológicos como señales químicas pertenecientes al *quorum sensing*, metales pesados, factores de virulencia, sustancias procedentes del catabolismo celular, etc, y la externalización de dichos compuestos parece jugar un papel decisivo en la adaptación fisiológica a determinantes nichos o condiciones ambientales (Hirakata Y *et al*, 2002; Evans K *et al*. 1998; Piddock LJ, 2006). Así, aunque fácilmente una población resistente a un determinado antimicrobiano desplaza a la salvaje durante el tratamiento con el mismo, en un reservorio ambiental sin presión selectiva la cepa salvaje no debería ser desplazada (Andersson DI and Hughes D, 2010). Una posible explicación a esta falta de competitividad podría consistir en que la resistencia antibiótica lleva implícita un coste biológico que se refleja en el *fitness* bacteriano. Por eso, generalmente esta aceptado que la resistencia bacteriana, especialmente la debida a la expresión de elementos accesorios como enzimas inactivantes o bombas de expulsión activa, implican un coste biológico no específico debido a una sobrecarga metabólica relacionada con la replicación celular y el mantenimiento de los propios elementos accesorios (Andersson DI & Levin BR, 1999; Sanchez P *et al*, 2002).

Según trabajos recientes con una colección de cepas isogénicas sensibles y resistentes a betalactámicos de *P. aeruginosa* provenientes de antes y después de la antibioterapia con dichos antimicrobianos, todas los aislados resistentes post-antibioterapia mostraron una reducción significativa en la actividad elastasa, y la mayoría de ellos también experimentaron una reducción significativa en la tasa de crecimiento, en su actividad proteolítica y en la producción de mucus extracelular, respecto a sus cepas isogénicas sensibles. Aunque no se caracterizaron los mecanismos de resistencia y por tanto no queda clara la implicación de las bombas de expulsión, un 73% de los aislados sensibles fueron capaces de desplazar a sus pares isogénicos resistentes en experimentos de competición *in vitro*, indicando claramente que la expresión de determinantes de resistencia suele asociarse a un coste biológico (Sun Z *et al*, 2013).

Introducción

Estudios previos muestran como *in vitro*, los mutantes *nfxB* y *nalB* de *P. aeruginosa* que hiperexpresan MexCD-OprJ y MexAB-OprM respectivamente, tienen un *fitness* inferior al de la cepa salvaje (Sanchez P *et al*, 2002). Su supervivencia en agua o sobre una superficie seca es inferior a la de su cepa parental, y ambos mutantes han perdido la facultad de matar al nematodo *Caenorhabditis elegans* como lo hace su cepa parental. Así, una única mutación en el gen represor que se traduce en la hiperexpresión de ambas bombas respectivamente, es capaz de convertir al depredador en presa (Martínez JL). Además ambos mutantes muestran una producción significativamente inferior de factores de virulencia como piocianina, pioverdina, caseinasa y elastasa, respecto a la cepa salvaje. No obstante, ambos mutantes exhiben una capacidad de formación de biofilm superior o igual a la de la cepa salvaje, indicando que no todos los genes involucrados en el *quorum sensing* (esencialmente *las* y *rhl*) están afectados por la hiperexpresión de estas bombas de expulsión activa.

La hiperexpresión de MexEF-OprN se relaciona con una disminución en la producción de factores de virulencia extracelulares tales como piocianina, elastasa y ramnolípidos (Kohler T *et al*, 2001). Además, dicha hiperexpresión se ha podido observar en respuesta al estrés nitrosativo en ausencia de antibióticos (Fetar H *et al*, 2011). Recientes estudios relacionan MexT con reducción en el del sistema de secreción tipo III en *P. aeruginosa* (Jin Y *et al*, 2011; Linares JF *et al*, 2005), y una reducción en el sistema de secreción tipo VI (Olivares J *et al*, 2012). No obstante, a pesar de la disminución de la expresión de factores de virulencia y de ciertos genes implicados en el *quorum sensing* que ocasiona la hiperexpresión de *mexEF-oprN* vía activación de MexT, no se observa reducción alguna del *fitness* en estudios de competitividad *in vitro* (Olivares J *et al*, 2012).

Trabajos recientes muestran cómo el regulador transcripcional CzcR en presencia de Zinc, Cadmio o Cobalto, induce la expresión de la bomba *czcCBA*, y paralelamente afecta a la expresión de numerosos genes directamente involucrados en la virulencia de *P. aeruginosa*, incluso en la ausencia de dichos metales inducibles. Así la expresión de las moléculas autoinducidas pertenecientes al *quorum sensing* 3-oxo-C12-homoserín lactona y C4-homoserín lactona se ve afectada en ausencia de CzcR. Además, el mutante nulo *czcR* ve mermada su virulencia al ser incapaz de matar al nematodo *C. elegans*. Posteriores experimentos de inmunoprecipitación cromosómica permitieron localizar a CzcR en la región promotora de diversos genes regulados, sugiriendo un control directo sobre genes diana como *oprD*, *phzA1* y *lasI* (Dieppois G *et al*, 2012).

MuxABC-OpmB fue la última de las 12 bombas de expulsión activa pertenecientes a la familia RND descrita (Mima T *et al*, 2009). Curiosamente trabajos recientes con el mutante nulo en *muxA* constatan una disminución de la virulencia y de la movilidad twitching (Yang L *et al*, 2011).

Por otra parte, varias publicaciones ponen de manifiesto que la inactivación de la bomba de expulsión MexAB-OprM produce un acúmulo intracelular de 3-oxo-C12-HSL sugiriendo que los sistemas de expulsión activa en *P. aeruginosa* participan activamente en la externalización de señales autoinducidas pertenecientes al *quorum sensing* (Minagawa S *et al*, 2012; Pearson JP *et al*, 1999; Evans K *et al*, 1998).

Hasta el momento no se ha establecido la relación entre MexCD-OprJ y la extrusión de estos compuestos autoinductores pertenecientes al lenguaje del *quorum sensing*, y cómo puede verse afectada la virulencia en mutantes *nfxB* o en mutantes defectivos en la correspondiente bomba de expulsión. No obstante, varios estudios multicéntricos en los que se han caracterizado los mecanismos de resistencia de numerosos aislados de *P. aeruginosa* procedentes de hemocultivos muestran como la hiperexpresión de MexCD-OprJ no es un mecanismo prevalente (2%) en este tipo de infección aguda (Cabot G *et al*, 2011). En cambio, sí son frecuentes los aislados que hiperexpresan dicho sistema en muestras procedentes de infecciones crónicas, especialmente en las infecciones respiratorias (fibrosis quística, EPOC, bronquiectasias...). Todo ello hace pensar que la hiperexpresión de MexCD-OprJ en el mutante *nfxB* podría tener un impacto negativo en la virulencia y/o *fitness* de *P. aeruginosa*, pero quizá podría favorecer la adaptación celular en ciertos nichos ecológicos. Por este motivo, uno de los objetivos de este trabajo será cuantificar el impacto de la expresión de MexCD-OprJ sobre el *fitness* bacteriano mediante la capacidad de competencia contra la cepa salvaje y/o sobre la pérdida de virulencia, cuantificando su sensibilidad al complemento humano.

1.6. Bombas de expulsión y tasa de mutación

Las bombas de expulsión activa como se ha mencionado previamente, son capaces de extruir gran variedad de compuestos, como toxinas, compuestos derivados del metabolismo, etc. Trabajos previos demuestran como una bomba de expulsión de la superfamilia MATE (NorM) es capaz de compensar el efecto mutagénico ocasionado por la pérdida de función del sistema GO (mediante la delección de *mexT*) en *E. coli* (Guelfo JR *et al*, 2010). Así pues, estos datos sugieren que las bombas de expulsión activa pueden estar participando activamente en la extrusión de ciertos compuestos derivados del metabolismo celular (como los radicales libres del oxígeno) previniendo el acúmulo de sustancias mutagénicas para la bacteria en cuestión. Dicho de otra manera, la inactivación de una bomba o la represión de la misma por su propio regulador podría ocasionar un fenotipo hipermutador por acúmulo de compuestos mutagénicos que son sustratos de esa bomba de expulsión.

Otros trabajos sugieren que el gen *nfxB* podría estar involucrado en el fenómeno de la hipermutación cuando, mediante su clonación en un plásmido multicopia, es expresado en *E. coli* (Gabrovsky V *et al*, 2005). Este trabajo se centró en la búsqueda de genes de *P. aeruginosa* mediante mutagénesis aleatoria. Así, se crearon librerías aleatorias de ADN genómico y posteriormente se ligaron dichos fragmentos resultantes al vector multicopia pCR2.1-TOPO. A continuación dichas librerías de ADN se electroporaron indiscriminadamente en la cepa *E. coli* CC107, capaz de detectar un efecto hipermutador debido a cambios en el marco de lectura mediante la expresión diferencial del gen *lacZ*. De tal modo, los autores consiguen hallar 25 genes pertenecientes al genoma de *P. aeruginosa* (entre ellos *nfxB*) cuya expresión ocasiona un fenotipo hipermutador en *E. coli*. Así, los diferentes insertos que albergaban el gen *nfxB* ocasionaron un aumento de 600 veces el cambio de marco de lectura +1, y 170 veces el cambio de marco de lectura -1. Finalmente se determinó mediante la capacidad de resistencia a rifampicina, que los insertos con *nfxB* conseguían aumentar 43 veces las mutaciones debidas a sustitución de base.

Así pues, resulta razonable pensar que bien la sobreexpresión de la bomba MexCD-OprJ en *P. aeruginosa* o por contra su inactivación, o bien la interacción de su regulador negativo *nfxB* a otro nivel, pudieran tener un papel en la mutagénesis. Por ello, en este trabajo se tratará de evaluar la posible modificación de la tasa de mutación al alterar el funcionamiento de este sistema de expulsión activa o alguno de los elementos que lo componen.

1.7. Hipersensibilidad antibiótica en el mutante *nfxB*

Como se ha comentado anteriormente, el mutante *nfxB* experimenta hipersensibilidad a los betalactámicos no sustratos de MexCD-OprJ. Dicha hipersensibilidad ha sido ampliamente contrastada, y son muchos los autores que han intentado establecer las bases fisiológicas de este fenómeno observado.

Las primeras publicaciones atribuían este fenómeno a un mecanismo compensatorio mediante el cual la hiperproducción de MexCD-OprJ ocasiona una disminución de la producción de MexAB-OprM, disminuyendo así la extrusión de betalactámicos y por tanto la CMI de los mismos (Gotoh N *et al*, 1998). No obstante, posteriores análisis del mutante *nfxB* demostraron que ni la expresión de *mexB* ni la cantidad de proteína producida, ven disminuidos sus niveles respecto a la cepa parental. Así, se atribuyó la hipersensibilidad a betalactámicos a una disminución de la actividad (pero no de la cantidad) de MexAB-OprM (Jeannot K *et al*, 2008).

Por otra parte, se constató que la hipersensibilidad de este mutante también afectaba a otros betalactámicos como sulbenicilina, cefpodoxima, ceftriaxona, imipenem y biapenem, y ninguno de estos antimicrobianos puede actuar como sustrato de MexAB-OprM (Masuda N *et al*, 2001).

AmpC también ha estado en el punto de mira de varios trabajos. Se ha sugerido que un fallo en la ruta de inducción de AmpC podría ser el responsable de la hipersensibilidad descrita en el mutante *nfxB* (Masuda N *et al*, 2001). En este trabajo se analizó el cambio en la CMI de un determinado betalactámico con la adición de un inhibidor selectivo de AmpC y posteriormente se cuantificó la actividad betalactamasa del mutante *nfxB* deficiente en los sistemas MexAB-OprM y MexXY-OprM. Sus resultados indican que a pesar de que el mutante *nfxB* tiene una CMI más baja frente al betalactámico estudiado, su sensibilidad no se ve incrementada tras la adición del inhibidor respecto a su cepa parental, indicando que AmpC previamente no estaba desempeñando su función. Además la cuantificación de la actividad betalactamasa en presencia de inductores mostró una reducción en la capacidad de inducción de AmpC por parte del mutante *nfxB* (Masuda N *et al*, 2001). No obstante posteriores trabajos en los que también se evaluó la capacidad de inducción de AmpC mediante la cuantificación de la actividad betalactamasa específica, no constataron dicha disminución de la inducibilidad durante la exposición a imipenem en diferentes mutantes *nfxB*, además, la hiperexpresión de *mexCD-oprJ* en un mutante cuya expresión de *ampC* se encuentra parcial y totalmente desreprimida, no conllevó alteración alguna de la expresión de la propia betalactamasa (Wolter DJ *et al*, 2005). En ese mismo trabajo se evalúa además la posibilidad de que exista un incremento de la expresión de *oprD* que pudiera conllevar una mayor entrada de imipenem a través de las membranas celulares que se traduciría en una mayor sensibilidad al mismo, no obstante el mutante *nfxB* no mostró aumento alguno de la expresión de dicha porina. Paralelamente, se obtuvieron mutantes *nfxB* deficientes en *OprD* y estos seguían presentando hipersensibilidad a imipenem.

Como podemos ver, el mecanismo mediante el cual se produce este fenotipo ha sido motivo de controversia durante años, especialmente el mecanismo responsable de la

Introducción

hipersensibilidad a imipenem, el cual sigue sin ser dilucidado. Por este motivo este trabajo pondrá especial énfasis en investigar y caracterizar este fenómeno e intentará establecer el mecanismo responsable del mismo.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

P. aeruginosa es intrínsecamente resistente a la acción de la azitromicina. No obstante, en la práctica clínica, este macrólido es usado en pacientes con fibrosis quística por su capacidad de inhibir la formación de biofilms, interactuando con el *quorum sensing* bacteriano.

Las enfermedades respiratorias crónicas se caracterizan por una alta prevalencia de cepas de *P. aeruginosa* hipermutadoras y/o hiperproductoras de alginato. Estas cepas muestran una extraordinaria capacidad de adaptación al medio, bien sea mediante el desarrollo de resistencias a múltiples antimicrobianos en el primer caso o mediante la formación de biofilms en el segundo. Por tanto, este trabajo pretenderá:

1. Determinar el efecto bactericida de la azitromicina sobre los biofilms de *P. aeruginosa*.
2. Evaluar el efecto individual y combinado de la hipermutación y la hiperproducción de alginato sobre la actividad bactericida y el desarrollo de resistencias a azitromicina en biofilms de *P. aeruginosa* formados *in vitro*.
3. Establecer los mecanismos que confieren resistencia a azitromicina en crecimiento en forma de biofilm.
4. Caracterizar fenotípica y genóticamente el mutante nulo *nfxB*, así como determinar sus propiedades biológicas y establecer la relación entre la hiperexpresión de MexCD-OprJ y las mismas.

La alta capacidad de *P. aeruginosa* para desarrollar resistencias a antimicrobianos unida a la escasez de nuevos tratamientos disponibles, obliga a entender y descifrar las complejas interacciones entre los diferentes mecanismos de resistencia para poder establecer nuevas estrategias de tratamiento para el control de este tipo de infecciones. Por este motivo el presente trabajo también tendrá como objetivo:

5. Estudiar y caracterizar el mecanismo de hipersensibilidad a betalactámicos y aminoglucósidos observada en los mutantes *nfxB*.
6. Determinar las posibles interacciones entre la hiperexpresión de MexCD-OprJ y otros mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa*, tanto intrínsecos, como mutacionales o transferibles.

Dada la alta prevalencia de mutantes *nfxB* de *P. aeruginosa* en muestras clínicas procedentes de pacientes con enfermedades respiratorias crónicas, en contraste con la baja prevalencia de este tipo de aislamientos en muestras procedentes de infecciones agudas como es el caso de la bacteriemia, también se ha pretendido:

7. Explorar las ventajas evolutivas que ofrece el mutante *nfxB* frente a la acción de los antibióticos betalactámicos en el seno de un biofilm.
8. Estudiar la virulencia del mutante *nfxB* al ser expuesto al complemento del suero humano, y en un modelo murino de infección respiratoria.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas, plásmidos y cebadores

TABLA 3. Cepas de laboratorio usadas en este trabajo

Cepa	Genotipo/características relevantes	Referencia
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Cepa de referencia secuenciada completamente	Stover CK <i>et al</i> , 2000
PAOMA	PAO1 $\Delta mucA::lox$	Mena A <i>et al</i> , 2008
PAOMS	PAO1 $\Delta mutS::lox$	Mena A <i>et al</i> , 2008
PAOMSA	PAO1 $\Delta mutS::lox \Delta mucA::lox$	Mena A <i>et al</i> , 2008
PAONB::Gm	PAO1 $\Delta nfxB::loxGm$	Este trabajo
PAOMxD::Gm	PAO1 $\Delta mexD::loxGm$	Este trabajo
PAOM::Gm	PAO1 $\Delta oprM::loxGm$	Este trabajo
PAOMxR::Gm	PAO1 $\Delta MexR::loxGm$	Este trabajo
PAONB	PAO1 $\Delta nfxB::lox$	Este trabajo
PAOMSNB	PAO1 $\Delta mutS::lox \Delta nfxB::lox$	Este trabajo
PAOMxD	PAO1 $\Delta mexD::lox$	Este trabajo
PAOMSMxD	PAO1 $\Delta mutS::lox \Delta mexD::lox$	Este trabajo
PAODB	PAO1 $\Delta dacB::lox$	Moyá B <i>et al</i> , 2009
PAOAD	PAO1 $\Delta ampD::lox$	Juan C <i>et al</i> , 2006
PAOAC	PAO1 $\Delta ampC::lox$	Moyá B <i>et al</i> , 2008
PAOD	Mutante nulo <i>oprD</i> espontáneo (W65X) de	Moyá B <i>et al</i> , 2010
PAOM	PAO1 $\Delta oprM::lox$	Este trabajo
PAOMxR	PAO1 $\Delta MexR::lox$	Este trabajo
PAONBDB	PAO1 $\Delta nfxB::lox \Delta dacB::lox$	Este trabajo
PAONBMxD	PAO1 $\Delta nfxB::lox \Delta mexD::lox$	Este trabajo
PAONBAC	PAO1 $\Delta nfxB::lox \Delta ampC::lox$	Este trabajo
PAONBOM	PAO1 $\Delta nfxB::lox \Delta oprM::lox$	Este trabajo
PAONBDBOM	PAO1 $\Delta nfxB::lox \Delta dacB::lox \Delta oprM::lox$	Este trabajo
PAONBDBMxD	PAO1 $\Delta nfxB::lox \Delta dacB::lox \Delta mexD::lox$	Este trabajo
JW	Aisldo clínico de <i>P. aeruginosa</i>	Zamorano L <i>et al</i> , 2010
JWNB	JW $\Delta nfxB::lox$	Este trabajo
GPP	Aisldo clínico de <i>P. aeruginosa</i>	Zamorano L <i>et al</i> , 2010
GPPNB	GPP $\Delta nfxB::lox$	Este trabajo

Materiales y Métodos

E. coli

XL-1 blue	F':Tn10 <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lac1</i> ^q Δ(<i>lacZ</i>)M15 <i>recA1 endA1</i>	Cepa de laboratorio
S17.1	RecA <i>pro</i> (RP4-2Tet:: Mu Kan::Tn7)	Cepa de laboratorio

TABLA 4. Plásmidos usados en este trabajo

Plásmido	Genotipo/características relevantes	Referencia
pUCP24	Gm ^R , basado en pUC18, vector puente <i>Escherichia-Pseudomonas</i> .	West SE <i>et al</i> , 1994
pUCPNB	Gm ^R , pUCP24 con <i>nfxB</i> de la cepa salvaje PAO1	Este trabajo
pEX100Tlink	Ap ^R , <i>sacB</i> , basado en pUC19 vector de reemplazamiento de genes con un sitio de policlonaje	Quénée L <i>et al</i> , 2005
pUCGm lox	Ap ^R , Gm ^R , vector basado en pUC18 con el gen <i>aacC1</i> flanqueado por las secuencias <i>lox</i>	Quénée L <i>et al</i> , 2005
pCM157	Tc ^R , vector de expresión de la recombinasa <i>cre</i>	Quénée L <i>et al</i> , 2005
pEXNB	pEX100Tlink con <i>nfxB</i>	Este trabajo
pEXNBGm	pEX100Tlink con <i>nfxB::Gm-lox</i>	Este trabajo
pEXMxD	pEX100Tlink con <i>mexD</i>	Este trabajo
pEXMxDGm	pEX100Tlink con <i>mexD::Gm-lox</i>	Este trabajo
pEXdacBGm	pEX100Tlink con <i>dacB::Gm-lox</i>	Moyá B <i>et al</i> , 2009
pEXACGm	pEX100Tlink con <i>ampC::Gm-lox</i>	Moyá B <i>et al</i> , 2008
pEXmexR	pEX100Tlink con <i>mexR</i>	Este trabajo
pEXmexRGm	pEX100Tlink con <i>mexR::Gm-lox</i>	Este trabajo
pEXOM	pEX100Tlink con <i>oprM</i>	Este trabajo
pEXOMGm	pEX100Tlink con <i>oprM::Gm-lox</i>	Este trabajo
pUCPBEL3	pUCP24 con <i>bla</i> _{BEL-3}	Juan C <i>et al</i> , 2010
pUCPVIM2	pUCP24 con <i>bla</i> _{VIM-2}	Este trabajo
pUCPOXA161	pUCP24 con <i>bla</i> _{OXA-161}	Este trabajo
pUCPSHV12	pUCP24 con <i>bla</i> _{SHV-12}	Este trabajo
pUCPGES1	pUCP24 con <i>bla</i> _{GES-1}	Este trabajo

Materiales y Métodos

TABLA 5. Cebadores usados en este trabajo

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño producto PCR (pb)	Uso	Referencia
nBF1BHI	TCGGATCCGCACCTCGGGACCCGC	523	Inactivación <i>nfxB</i>	Este trabajo
nBR1HDIII	TCAAGCTTCGAGCATCTGCACCAGGTTG			
nBF2HDIII	TCAAGCTTGCCTTCTTCTCGCGGAC	434		
nBR2ERI	CGGAATTCCTGGGGAGGTGTG			
mxDf1BHI	TCGGATCCATCAAGCGCCGAACCTTCG	446	Inactivación <i>mexD</i>	Este trabajo
mxDf1HDIII	TCAAGCTTGGTGTGCTGCGCTGAGC			
mxDf2HDIII	TCAGCTTCACCACGAGAAGCGGGCTTC	563		
mxDf2ERI	TCGAATTCAGCAGCGCTTCGCGGCCG			
<i>dacB</i> -F-ERI	TCGAATTCGACCATTGCGGATATGAC	571	Inactivación <i>dacB</i>	Moyá B et al, 2009
<i>dacB</i> -I-R-HD3	TCAAGCTTGTGCGCATCAGCAGCCAG			
<i>dacB</i> -I-F-HD3	TCAAGCTTGCCAGGGCAGCGTACCGC	693		
<i>dacB</i> -R-BHI	TCGGATCCCGGTAATCCGAAGATCCATC			
<i>ampC</i> -F-ERI	TCGAATTCGCGCGCAGGGCGTTCAG	415	Inactivación <i>ampC</i>	Moyá B et al, 2009
<i>ampC</i> -I-R-HDIII	TCAAGCTTCGTCCTCTTACGAGGCCAG			
<i>ampC</i> -I-F-HDIII	TCAAGCTTCAGGGCAGCCGCTTCGAC	432		
<i>ampC</i> -R-BHI	TCGGATCCCAGGTTGGCATCGACGAAG			
OMF1ERI	TCGAATTCGATCGGTACCGCGTGATC	471	Inactivación <i>oprM</i>	Este trabajo
OMR1HDIII	TCAAGCTTACCGTCCACGCCGATCCG			
OMF2HDIII	TCAAGCTTCTTCCCAGCATCAGCCT	522		
OMR2BHI	TCGGATCCAAGCCTGGGGATCTTCTTC			
NfxB-1	GCCTCCTGTGCTCTTCCG	957	Secuenciación y amplificación <i>nfxB</i>	Este trabajo
NfxB-2	CTGTGAGGCACTTTGTGCGC			
ACrnaF	GGGCTGGCCTCGAAAGAGGAC	246	Cuantificación ARNm <i>ampC</i>	Juan et al 2005
ACrnaR	GCACCGAGTCGGGGAAGTCA			

MexB-U	CAAGGGCGTCGGTGACTTCCAG	273	Cuantificación ARNm <i>mexB</i>	Oh H <i>et al</i> , 2003
MexB-L	ACCTGGGAACCGTCGGGATTGA			
MexD-U	GGAGTTCGGCCAGGTAGTGCTG	236	Cuantificación ARNm <i>mexD</i>	Oh H <i>et al</i> , 2003
MexD-L	ACTGCATGTCTCGGGGAAGAA			
MexF-U	CGCCTGGTCACCGAGGAAGAGT	254	Cuantificación ARNm <i>mexF</i>	Oh H <i>et al</i> , 2003
MexF-L	TAGTCCATGGCTTGCGGGAAGC			
MexY-Fa	TGGAAGTGCAGAACCGCCTG	270	Cuantificación ARNm <i>mexY</i>	Oh H <i>et al</i> , 2003
MexY-Ra	AGGTCAGCTTGGCCGGGTC			
OprM-F3	CACTACCGCTGGGAACTC	259	Cuantificación ARNm <i>oprM</i>	Este trabajo
OprM-R3	GGTCGAGCGCGGAGGCG			
RpsL-1	GCTGCAAACTGCCGCAACG	250	Cuantificación ARNm <i>rpsL</i>	Oh H <i>et al</i> , 2003
RpsL-2	ACCCGAGGTGTCCAGCGAACC			
CreD-RNA-F	CGGCGTGCTGCAGGATATCGC	254	Cuantificación ARNm <i>creD</i>	Este trabajo
CreD-RNA-R	TGTCGACGTGGTACAGGCGCG			
VIM2-F-ERI-2	<u>TCGAATTCACGTTATGCCGCACTCAC</u>	801	Clonación VIM-2	Este trabajo
VIM2-R-BHI	<u>TCGGATCCCTACTCAACGACTGAGCG</u>			
SHV12-F-ERI	<u>TCGAATTC</u> CACTCAAGGATGTATTGTGGT T	867	Clonación SHV-12	Este trabajo
SHV12-R-HDIII	<u>TCAAGCTTT</u> TAGCGTTGCCAGTGCTCGA			
GES1-F-ERI	<u>TCGAATTC</u> GATAAATTTCCATCTCAAGGGA TC	864	Clonación GES-1	Este trabajo
GES1-R-HDIII	<u>TCAAGCTT</u> CTATTTGTCCGTGCTCAGGAT			
OXA161-F-smaI	<u>TCCCCGGG</u> ATGGCAATCCGAATCTTCGC	864	Clonación	Este trabajo
OXA161-R-BamHI	<u>TCGGATCCT</u> TATCGCGCAGCGTCCGAG			

3.2. Construcción de mutantes nulos

La construcción de todos los mutantes nulos, tanto simples como dobles o triples se ha llevado a cabo siguiendo los procedimientos descritos previamente por Quénéé L y colaboradores (Quénéé L *et al*, 2005) para la delección de genes. Ver proceso detallado en la FIGURA 9.

Para este trabajo se construyeron los mutantes nulos *nfxB* (PAONB), *mexD* (PAOMxD), *oprM* (PAOM) y *mexR* (PAOMxR), usando la PAO1 como cepa parental. Adicionalmente se construyeron varios mutantes dobles usando como cepas parentales varios mutantes simples pertenecientes al presente trabajo y a trabajos previos (ver TABLA 3).

Inicialmente se llevó a cabo una PCR de la parte inicial y final (PCR1 y PCR2) de cada uno de los genes a interrumpir. Los cebadores para cada gen en particular vienen recogidos en la TABLA 5.

Entre la PCR1 y la PCR2 se dejó sin amplificar una región de tamaño variable en función del gen, la cual representará la zona escindida del gen a interrumpir, dejando así la correspondiente transcrito y la posterior proteína traducida totalmente afuncional.

Los cebadores internos de cada PCR incluyen una diana para HindIII en el extremo 5', mientras que los externos incluyen una diana para BamHI y EcoRI. Su posterior digestión con dichas endonucleasas genera extremos internos cohesivos HindIII, y extremos externos a los que se les ha creado un punto BamHI y EcoRI. Posteriormente se ligarán usando la ADN ligasa del fago T4 (New England Bio Labs, Ipswich, EEUU) al plásmido pEX100Tlink (no replicable en *P. aeruginosa*) con la diana HindIII deleccionada. Los plásmidos resultantes (pEXNB, pEXMxD, pEXOM y pEXmexR) se transformaron en *E. coli* XL1 Blue por el método de shock térmico con células competentes con CaCl₂ (Sambrook J *et al*, 1989). Brevemente, las células se hicieron competentes mediante cultivo hasta fase exponencial (aproximadamente 1 x 10⁸ células/ml), y posteriores lavados y resuspensiones con volúmenes decrecientes de CaCl₂ 0,1 M en frío, previamente esterilizado por filtración (MILLEX GV 0.22µm Durapore PVDF membrane, MILLIPORE, Carrington, Co. Cork, Ireland). A continuación se añadieron 10 µl del producto de ligación correspondiente a 100 µl de las mismas. Tras un shock térmico de 1 minuto a 42°C, estas células se incubaron una hora a 37°C en 1 ml de caldo Luria Bertani (LB). Los transformantes fueron seleccionados en placas de agar LB (LBA) con una concentración de 30 µg/mL de ampicilina-

Seguidamente se extrajeron los plásmidos de varias colonias mediante el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) para finalmente ser comprobados por PCR y ulterior digestión con HindIII. A continuación, los plásmidos extraídos se sometieron por separado a una digestión con HindIII y se ligaron al cassette de resistencia a gentamicina denominado *aacC1* flanqueado por las secuencias *lox*, obtenido tras su liberación del plásmido pUCGm*lox* por digestión con HindIII. De tal manera se obtuvieron los siguientes plásmidos pEXNBGm, pEXMxDGm, pEXOMGM y pEXmexRGm, que fueron clonados en *E. coli* XL1 Blue. Los nuevos transformantes fueron seleccionables en placas de LBA con 30 µg/mL de ampicilina y 5 µg/mL de gentamicina.

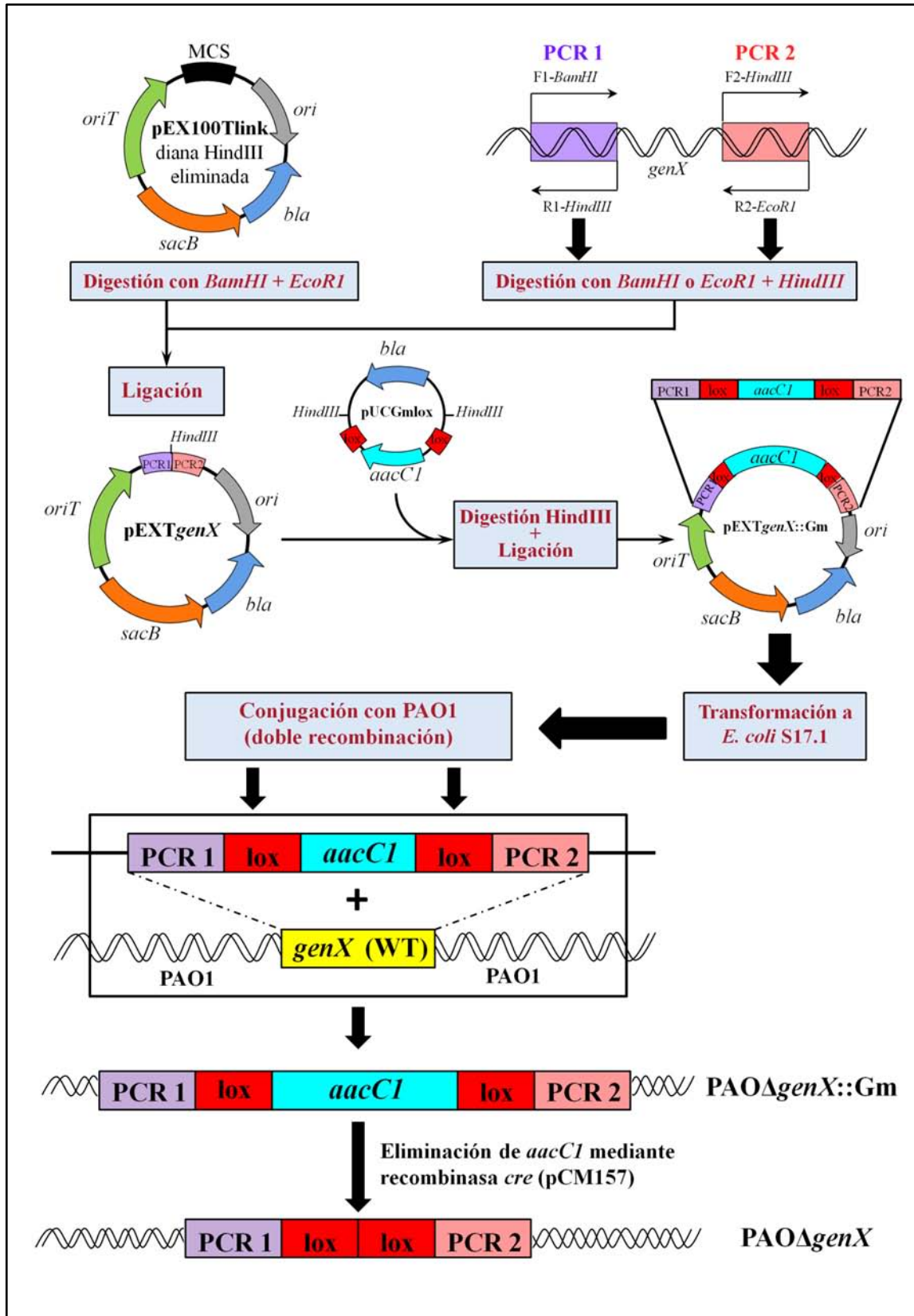


FIGURA 9. Esquema de la construcción de plásmidos y posterior inactivación de genes en *P. aeruginosa*

Materiales y Métodos

Debido a la imposibilidad de replicación de este tipo de plásmido en *P. aeruginosa*, se extrajo dicho plásmido para transformarlo en la cepa coadyuvante S17.1 de *E. coli* por el método de shock térmico/ CaCl_2 , descrito anteriormente. A continuación se llevó a cabo una conjugación entre la cepa S17.1 portadora del plásmido con el correspondiente gen inactivado y la cepa de referencia PAO1 (para crear un mutante nulo simple), o algún derivado de la PAO1 ya defectivo en algún otro gen de interés, al que previamente le hemos retirado el cassette de resistencia a gentamicina de su cromosoma para permitir la construcción y selección de mutantes nulos dobles o triples.

La conjugación se realizó de la siguiente manera: se centrifugaron (3000 rpm, 15') 5 mL de cultivo en fase exponencial de la cepa donadora S17.1 juntamente con 500 μL de cultivo de la cepa receptora PAO1, también en fase exponencial. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en el escaso medio remanente presente en el mismo tubo. Esta suspensión se depositó en forma de botón en una placa de Agar Columbia con 15% de sangre, durante 6-8 horas a 37°C.

A continuación se recogió todo el botón con un asa de siembra para suspenderlo en 1 mL de suero fisiológico estéril, y posteriormente plaquearlo en placas de LBA con un 5% de sacarosa, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cefotaxima cuya función es eliminar *E. coli* tras la conjugación. Dicha composición viene justificada por la esencia del propio plásmido pEX100Tlink, el cual es un vector suicida en el género *Pseudomonas*. Dicho plásmido lleva incorporado el gen de resistencia a gentamicina y el gen *sacB*, el cual ocasiona la muerte celular en presencia de sacarosa. De esta forma resulta imperativa una doble recombinación para que las células puedan crecer en este medio, integrando en el genoma únicamente el cassette de resistencia a gentamicina, dejando en el vector el gen *sacB*.

Los recombinantes obtenidos fueron sujetos a una doble comprobación, primeramente por su susceptibilidad carbenicilina a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (debido a que ya no se dispone del gen *bla* presente en el plásmido original y que confiere resistencia a carbenicilina), y en segundo lugar por su capacidad de crecer en presencia de sacarosa, demostrándolo en sucesivos pases en LBA con 5% de sacarosa y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina (con y sin carbenicilina). De esta forma y atendiendo a su crecimiento diferencial en estos dos medios de cultivo, fue posible seleccionar los dobles recombinantes deseados. Estas cepas con su correspondiente gen inactivado por la inserción de las secuencias *lox* y el gen *aacC1* pasaron a denominarse PAONB::Gm, PAOMxD::Gm, PAOM::Gm y PAOMxR::Gm. Estos recombinantes fueron comprobados definitivamente mediante amplificación por PCR usando los cebadores externos de cada gen respectivamente. El producto de esta PCR debe tener un tamaño igual a la suma de los tamaños de los fragmentos que lo componen la construcción de cada gen en particular. Esto es, la suma de los productos de PCR que componen el inicio y el final de cada gen (PCR1 + PCR2), más el cassette de resistencia a gentamicina flanqueado por secuencias *lox* (aproximadamente 1100 pb).

Una vez realizadas las correspondientes comprobaciones, se procedió a eliminar el cassette de resistencia *aacC1* mediante la electroporación, en cada mutante por separado, el plásmido pCM157. Este plásmido posee el gen que codifica para la recombinasa cre, la

cual es capaz de reconocer y recombinar las secuencias *lox* que flanquean dicho cassette. Brevemente, se añadieron 5 µl de cada plásmido a 100 µl de células electrocompetentes (células previamente incubadas hasta fase exponencial y lavadas con solución SMEB (ver ANEXO 1). Para ello se utilizó un aparato Bio Rad Gene Pulser X Cell (Bio Rad, La Jolla, EE.UU.) con pulsos de 2500 V durante 5 milisegundos. Tras la electroporación, las células se incubaron en 1 ml de solución SOC (véase ANEXO 1) durante una hora a 37°C. Los transformantes se seleccionaron en placas de LBA con 250 µg/ml de tetraciclina. Para mantener el plásmido y permitir la recombinación para la eliminación del cassette se hizo un cultivo overnight con 250 µg/ml de tetraciclina, de dos transformantes para cada gen. El plásmido pCM157 fue curado mediante sucesivos pases en LB sin marcador de selección.

A continuación se sembró la dilución 10^{-6} de cada cultivo con el fin de obtener colonias aisladas y someterlas a un cribado individual de sensibilidad, mediante estría en paralelo en LBA, LBA con tetraciclina 250 µg/mL y LBA con 30 µg/mL de gentamicina. Se escogió el mutante que sólo presentó crecimiento en LBA, ya que la ausencia de crecimiento en tetraciclina y gentamicina implica la curación del plásmido pCM157 y la pérdida del cassette de resistencia a gentamicina.

Todos los mutantes nulos obtenidos en este punto se sometieron a la última comprobación por PCR usando los cebadores externos de cada gen respectivamente. En tal caso el tamaño de la construcción resultante debe equivaler a la suma de los tamaños de las PCR externas (PCR1 y PCR2) más 100 pb correspondientes a las secuencias *lox*. Los mutantes dobles y triples fueron construidos de forma análoga, a partir de mutantes simples liberados del cassette de resistencia a gentamicina.

3.3. Actividad, mecanismos y dinámica de desarrollo de resistencia a azitromicina en biofilms de *P. aeruginosa*; efecto de la hipermutación y la hiperproducción de alginato

3.3.1. Actividad de la azitromicina y estudio de la dinámica de desarrollo de resistencias

3.3.1.1. En cultivo planctónico

Inicialmente se determinó la actividad de la azitromicina frente a las cepas PAO1, PAOMS, PAOMA y PAOMSA. Para ello se usó un inóculo bacteriano final de 5×10^5 UFC/mL en fase exponencial de crecimiento y se determinó su CMI por microdilución en caldo MH (Ver ANEXO 1).

A continuación se evaluó el efecto de una exposición prolongada a concentraciones subinhibitorias de azitromicina en cultivos planctónicos. Para ello, se inocularon en 6 réplicas independientes, las cepas PAO1 y PAOMS en 10 mL de caldo MH a los que se les añadió 4 µg/mL de azitromicina. Los cultivos se incubaron 7 días a 37°C y 180 rpm, haciendo una dilución diaria 1/100 en un nuevo tubo con caldo MH fresco y renovación del antibiótico. Pasados los 7 días, se diluyeron de forma seriada cada uno de los cultivos para finalmente sembrarlos en MHA (ver ANEXO 1). Se almacenaron a -80°C dos colonias de cada una de las 6 réplicas independientes de cada cepa, para posteriores estudios.

3.3.1.2. En cultivo en forma de biofilm

La formación de biofilms o biopelículas se llevó a cabo siguiendo una modificación del protocolo previamente descrito (Moskowitz SM *et al.*). Brevemente, se formó el biofilm incubando las bacterias de forma estática, a 37°C durante 24 h en el dispositivo Calgary. Dicho dispositivo consiste en una placa microtiter de 96 pocillos y de una tapa con 96 proyecciones hacia el interior de los pocillos (Nunc, Dinamarca), que son los sustratos para la adherencia y formación de los biofilms. Cada pocillo contuvo aproximadamente 2×10^8 células/mL de las cepas PAO1, PAOMA, PAOMS y PAOMSA en caldo MH. Una vez formado el biofilm, éste se sometió a tres lavados con suero fisiológico estéril y se incubó en caldo MH con concentraciones crecientes de azitromicina, 0, 0,5, 1, 4, 16, 64 ó 256 µg/mL. Para poder evaluar la dinámica del desarrollo de resistencias a azitromicina, se iniciaron 4 experimentos independientes en los cuales los biofilms ya formados se incubaron en presencia de azitromicina a las concentraciones mencionadas durante 1, 2, 4 ó 7 días. Diariamente se realizaron 3 lavados de las proyecciones de la tapa del dispositivo Calgary, con el fin de eliminar las células que crecen en forma planctónica alrededor del biofilm, y se renovó el medio de cultivo y el antibiótico. Transcurrido el periodo determinado para cada cultivo, se practicaron de nuevo 3 lavados a los biofilms para posteriormente transferir las células del biofilm a un pequeño volumen de caldo MH, mediante centrifugación a 1000 rpm, 4°C, durante 20 minutos. A continuación se sembraron diluciones seriadas 1/10 en MHA con el fin de determinar el número de células

viabiles. En total se llevaron a cabo seis réplicas del experimento por cepa, concentración de antibiótico y periodo de incubación. Tras el experimento se subcultivaron en MHA 2 colonias por cepa, y concentración de azitromicina procedentes del biofilm de 7 días, y se congelaron a -80°C , donde permanecerán almacenadas para posteriores experimentos.

Debido a los resultados obtenidos se repitió el mismo experimento de 7 días, esta vez con biofilms de los mutantes nulos en *mexD* de las cepas PAO1 y PAOMS (PAOMxD y PAOMSMxD). Se procedió con 6 réplicas independientes de cada experimento. De igual forma se congelaron 2 UFC por réplica y cepa procedentes del día 7, para ulteriores estudios.

3.3.2. Caracterización de los mutantes resistentes a azitromicina

3.3.2.1. Caracterización fenotípica

Se determinaron las CMI usando tiras de Etest (Biomérieux) siguiendo las recomendaciones del fabricante, de todos los linajes almacenados procedentes del día 7 de incubación con $4\ \mu\text{g}/\text{mL}$ de azitromicina tanto de los experimentos realizados en cultivo planctónico como en biofilm, de los principales antibióticos antipseudomónicos: ceftazidima, cefepima, aztreonam, imipenem, tobramicina y colistina en placas de MHA. En el caso de la azitromicina se determinó su CMI por microdilución en caldo MH, usando un inóculo bacteriano final de 5×10^5 UFC/mL en fase exponencial de crecimiento.

Adicionalmente, y con la intención de comprobar si el fenotipo resistente a azitromicina presente en la arquitectura del biofilm de 7 días se había desarrollado durante la exposición al antibiótico y éste era estable, es decir, mediado por mutación y no por resistencia fenotípica o adaptativa, las cepas almacenadas pertenecientes al biofilm de 7 días, se sometieron a un nuevo experimento donde se incubaron los biofilms ya formados en caldo MH con una concentración de $4\ \mu\text{g}/\text{mL}$ de azitromicina y se compararon los porcentajes de supervivencia con el de su cepa parental. Para ello se realizaron 6 réplicas del experimento para cada cepa almacenada.

3.3.2.2. Caracterización genotípica

A. Determinación de la expresión de *mexD*

De todos los linajes almacenados procedentes de los experimentos tanto en cultivo planctónico y forma de biofilms, así como en los nuevos mutantes nulos creados en el laboratorio (PAONB, PAOMxD, PAOMSNB y PAOMSMxD) se determinaron mediante PCR a tiempo real los niveles de expresión génica de *mexD* (uno de los tres componentes del sistema de expulsión activa MexCD-OprJ), siguiendo las directrices de protocolos previamente descritos (Oh H *et al*, 2003). Brevemente, se extrajo el ARN total de cultivos en fase exponencial, usando el RNeasy minikit (Qiagen, Hilden, Alemania). El ARN obtenido fue disuelto en agua libre de ARNasas y tratado posteriormente con 2 U de TURBO DNA-freeTM (Ambion) durante 30' a 37°C para eliminar las posibles trazas de ADN. La reacción se detuvo añadiendo $5\ \mu\text{l}$ de DNase inactivation reagent. Seguidamente se normalizaron sus concentraciones a $50\ \text{ng}/\mu\text{L}$. Se usó una cantidad total de $50\ \text{ng}$ de

Materiales y Métodos

ARN purificado para llevar a cabo una PCR por transcripción inversa a tiempo real mediante el kit QuantiTect SYBR green reverse transcription-PCR (Qiagen, Hilden, Alemania), el termociclador SmartCycler II (Cepheid, Sunnyvale, CA), y los pares de cebadores MxD-U/MxD-L para la amplificación de *mexD* y RpsL-1/RpsL-2 para amplificar el gen *rpsL*, el cual es un gen muy conservado usado como referencia para calcular la cantidad relativa de ARNm correspondiente al gen *mexD*.

En todos los casos se consideró la media de 2 valores de expresión de cada una de las 3 réplicas obtenidas en experimentos independientes.

B. Secuenciación del gen regulador *nfxB*

Seguidamente se amplificó por PCR el gen *nfxB* de estas cepas almacenadas, el cual codifica para el regulador negativo del sistema *MexCD-oprJ*. Para ello se usaron los cebadores NfxB-1 y NfxB-2 (véase TABLA 5) bajo las siguientes condiciones: 12' a 94°C, 35 ciclos de 45" a 94°C, 45" a 62°C, y 1' a 72°C, con una extensión final de 10' a 72°C. Se secuenciaron ambas hebras de los productos de PCR obtenidos. Para ello se utilizó el kit BigDye Terminator (PE.Applied Biosystems), mediante el cual se llevaron a cabo las reacciones de secuenciación para finalmente ser analizadas en el secuenciador ABI Prism 3100 DNA sequencer (PE.Applied BioSystems). A continuación las secuencias obtenidas del gen *nfxB* se compararon con la de la PAO1 usando el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.4. Caracterización fenotípica y genotípica del mutante nulo *nfxB*

3.4.1. Patrón de sensibilidad

Se determinaron las CMI por Etest (Biomérieux) en MHA y por duplicado, del mutante nulo *nfxB* (PAONB), del mutante doble *nfxB-mexD* (PAONBMxD), del mutante doble *nfxB-dacB* (PAONBDB) y del mutante triple *nfxB-dacB-mexD* (PAONBDBMxD) de los antibióticos antipseudomónicos más relevantes: ceftazidima, cefepima, cefotaxima, piperacilina/tazobactam, aztreonam, imipenem, meropenem, ciprofloxacino, tobramicina y colistina.

3.4.2. Clonación de *nfxB* y estudios de complementación

Para la clonación, se amplificó dicho gen por PCR usando como molde el ADN de la cepa silvestre PAO1. Se usaron los pares de cebadores nBF1BHI y nBR2ERI (véase TABLA 5). Los consiguientes productos de PCR se digirieron con BamHI y EcoRI para posteriormente ligarlos mediante la ligasa T4, al plásmido pUCP24 digerido con los mismos enzimas, para finalmente obtener el plásmido pUCPNB, el cual se transformó usando CaCl₂ (ver apartado 3.2) en la cepa de *E. coli* XL1-Blue. Los transformantes se seleccionaron en placas de agar MacConkey con 5 µg/mL de gentamicina. El fragmento de ADN clonado se secuenció completamente para confirmar la ausencia de mutaciones generadas durante la reacción de amplificación del gen.

A continuación, el plásmido pUCPNB y el pUCP24 (usado como control) se electroporaron en la PAO1 y en el mutante *nfxB* y sus derivados. Los transformantes se seleccionaron en LBA con 30 µg/mL de gentamicina.

3.4.3. Competitividad biológica

3.4.3.1. Tiempo de generación

Para la evaluación del *fitness* bacteriano o competitividad biológica, se calculó el tiempo de generación del mutante PAONB y se comparó con el de su cepa parental, con el mutante PAOMxD, PAONBMxD y PAONB complementada con el plásmido pUCPNB que contiene el gen *nfxB* de la cepa silvestre. Para ello se ajustó un cultivo overnight en LB de cada cepa, a una densidad óptica final a 600 nm de 0,01. Se tomaron muestras de cada cultivo a los tiempos; 1h, 1h 45'y 2h 30'. Se sembraron 100 µL de la dilución correspondiente a cada tiempo en placas de LBA y se incubaron 24h. Tras el conteo de UFC y aplicando la siguiente relación (Powell EO, 1956), se calcularon las constantes de crecimiento (μ) para los tiempos de muestreo determinados. De cada cultivo se obtuvieron 3 valores y se expresó el valor final como la media de estos valores. Cada experimento se realizó de forma triplicada.

$$\mu = (\ln N - \ln N_0) / t - t_0$$

μ constante de crecimiento
 N número UFC a tiempo t
 N_0 número UFC a tiempo t_0
 $t - t_0$ tiempo de muestreo

Una vez obtenidas las constantes de crecimiento se procedió a calcular el tiempo de generación (g) mediante la siguiente relación:

$$g = \ln 2 / \mu$$

3.4.3.2. Índice de competición

Se llevaron a cabo experimentos de competición in vitro entre PAO1 y el mutante *nfxB* (PAONB) y entre la PAO1 y el mutante doble *nfxB-mexD* (PAONBMxD).

Se mezclaron en una proporción 1:1 aproximadamente 10^3 células procedentes de un cultivo en fase exponencial de PAO1 y el correspondiente mutante, se inocularon en 3 tubos con 10 ml de LB y se dejaron crecer a 37°C y 180 rpm durante 16-18 horas (aprox. 20 generaciones). Posteriormente se sembraron diluciones seriadas de cada réplica en LBA y LBA con 0,5 µg/ml de ciprofloxacino para seleccionar el mutante PAONB, y LBA con 15 µg/ml de gentamicina para seleccionar el mutante PAONBMxD, cuyo cromosoma lleva incorporado el cassette de resistencia a gentamicina permitiendo así realizar el recuento de UFC totales (LB) y el recuento de mutantes correspondiente (LB-ciprofloxacino y LB-gentamicina).

Posteriormente se calculó su índice de competición (IC) mediante la siguiente relación:

$$IC = UFC_{mutante} / UFC_{wild\ type}$$

3.4.4. Virulencia del mutante *nfxB*

3.4.4.1. Cuantificación de la resistencia a la acción bactericida del complemento del suero humano

La prevalencia del mutante *nfxB* en muestras clínicas procedentes de infecciones agudas (Jakics EB *et al*, 1992; Jeannot K *et al*, 2008) es muy baja en contraste con la alta prevalencia de estos aislados en muestras procedentes de infecciones crónicas respiratorias (Jalal S *et al*, 2000). La incapacidad para establecer una infección aguda por parte del mutante *nfxB* sugiere que su virulencia debe verse comprometida.

Por este motivo se ha pretendido evaluar la resistencia a la acción bactericida del complemento presente en el suero humano, tanto en el mutante *nfxB* procedente de la PAO1, como en diferentes mutantes *nfxB* cuyas cepas parentales son aislados clínicos, así como en diferentes mutantes creados in vitro que presentan otros mecanismos de resistencia como pueden ser la pérdida de OprD (PAOD), la hiperexpresión de *ampC* (PAODB, PAOAD), la hiperexpresión de MexAB-OprM (PAOMxR) y la hiperexpresión de MexXY-OprM (PAOMxZ). Paralelamente y con el fin de poder asociar el efecto observado a un mecanismo de resistencia determinado, también se añadieron los mutantes isogénicos a los que se les practicó una delección, siguiendo el protocolo previamente descrito, de un determinado gen responsable del mecanismo de resistencia en cuestión: PAOAC (mutante defectivo en *ampC*), PAOM (mutante defectivo en *oprM*, porina compartida por los sistemas de expulsión MexAB-OprM y MexXY-OprM) y PAONBMxD (mutante *nfxB* deficiente en *mexD*).

Para ello se cultivaron dichas cepas hasta fase exponencial y resuspendidos en PBS estéril (véase ANEXO 1) hasta una concentración final de 10^5 UFC/mL. A continuación se tomaron 10 μ L de cada suspensión a los que se les añadieron 40 μ L de PBS estéril y 50 μ L de suero humano no inmune, para finalmente obtener una concentración del 50% en suero. Paralelamente se procedió de igual forma con 50 μ L de suero inactivado por calor como control negativo de cada cepa. Dichas suspensiones se incubaron 1 hora a 37°C y a continuación se sembraron en LB agar para el posterior recuento de viables.

Posteriormente se cuantificó la unión del componente del complemento C3. Para ello se opsonizaron todas las cepas durante 30 minutos en suero humano no inmune y suero humano inactivado por calor, se lavaron 3 veces con PBS estéril para finalmente resuspenderlas en tampón carbonato-bicarbonato 50mM a pH 9,0 al que se le ha adicionado hidróxido amónico para romper los enlaces éster presentes entre C3 y la superficie celular, hasta una concentración final 1M. Transcurridas 2 horas a 37°C se eliminaron las bacterias por centrifugación y se cuantificó C3 mediante ELISA, siguiendo protocolos previamente establecidos (De Astorza B *et al*, 2004).

Seguidamente se pretendió averiguar si la acción local del complemento en el pulmón humano participa en la opsonización bacteriana. Para ello se incubaron las cepas mencionadas con fluido procedente de lavados broncoalveolares (BAL) humanos y se cuantificó la unión de C3 mediante ELISA, de forma análoga a la cuantificación en suero humano (De Astorza B *et al*, 2004)

3.4.4.2. Efecto de la hiperexpresión de MexCD-OprJ en un modelo murino de infección pulmonar

Se infectaron por vía intranasal 3 grupos de ratones albinos BALB/c compuestos por 7 ratones en cada grupo, con una suspensión que contenía 2×10^7 UFC de PAO1, del mutante *nfxB* (PAONB) y del mutante doble PAONBMxD, respectivamente.

Tras 12 horas se procedió a la extracción de los pulmones y se homogeneizaron para finalmente sembrarlos en LBA y cuantificar el número de viables presentes en cada homegenizado.

3.4.5. Estabilidad: tasa de reversión del fenotipo y estudio de los mecanismos implicados

El *fitness* bacteriano es un parámetro complejo que hace referencia no sólo al índice de competición, a la tasa de duplicación y a ciertos aspectos concretos referentes a la virulencia, sino que también contempla aspectos relacionados con la expresión de ciertos genes implicados en el *quorum sensing*, capacidad de supervivencia en condiciones adversas, etc.

No obstante, una tasa de duplicación, un índice de competición, y una virulencia significativamente inferior respecto a la cepa silvestre y al revertiente creado en el laboratorio (PAONBMxD) sugieren que la mutación en *nfxB* que conduce a la hiperexpresión de la correspondiente bomba de expulsión debe ser asociada a cierto lastre metabólico desfavorable en ausencia de las condiciones medioambientales determinadas. Por este motivo y en base a datos preliminares que mostraron una baja estabilidad del fenotipo *nfxB*, se procedió a determinar cuán estable es dicho mutante, o dicho de otro modo, con qué facilidad revierte su fenotipo espontáneamente para detener la hiperexpresión de MexCD-OprJ.

Para ello, y teniendo en cuenta que los mutantes *nfxB* muestran una clara hipersensibilidad a imipenem (CMI de imipenem es 0,19), se procedió a cuantificar la tasa de mutación en imipenem 0,5 µg/mL del mutante PAONB y del mutante doble PAONBDB. Así, se cultivaron las cepas PAONB y PAONBDB en MHA y se tomaron 10 UFC aisladas para suspenderlas por separado en 1 mL de suero fisiológico estéril. Se inoculó un pocillo con caldo MH, con 10 µL de la dilución 10⁻² de cada una de estas suspensiones obteniendo un total de 10 pocillos por cepa. Tras incubarlo 16-18h se sembraron diluciones seriadas 1/10 de cada pocillo en placas de MHA, en presencia y ausencia de imipenem a concentración 0,5 µg/mL. Tras una incubación de 24h se procedió al conteo de las placas de agar. A continuación, se calculó la tasa y frecuencia de mutación (o reversión) preliminar, a partir de los datos del test de fluctuación usando el software disponible en el sitio web <http://www.bio.upenn.edu/people/paul-sniegowski>, desarrollado en el laboratorio del Dr. Sniegowski (Gould CV *et al*, 2007).

Posteriormente se practicaron estrías a 30 colonias de cada placa en MHA con ciprofloxacino a concentración 0,25 µg/mL con el fin de averiguar qué porcentaje de esas UFC que crecen en imipenem 0,5 µg/mL seguían siendo mutantes *nfxB* con una mutación adicional en el gen *oprD*. Finalmente se pudo comprobar la ausencia de OprD tras realizar una extracción de proteínas de membrana externa con sarcosinato y posterior SDS-PAGE. Teniendo en cuenta esta corrección, se recalculó la tasa y la frecuencia de reversión de acuerdo con los protocolos previamente establecidos (Oliver A *et al*, 2000).

3.4.6. Determinación de la tasa de mutación espontánea

Se determinó la tasa de mutación de resistencia a rifampicina a una concentración de 300 µg/mL, de las cepas PAO1-pUCPNB, PAO1-pUCP24, PAONB-pUCPNB, PAONB-pUCP24, PAOMxD-pUCPNB y PAOMxD-pUCP24. La tasa de mutación fue determinada basándose en las técnicas descritas previamente (Oliver A *et al*, 2000), con algunas modificaciones. Se inocularon 10 pocillos con 200 µL de caldo MH con aproximadamente

10³ células en cada uno y se incubaron durante 16-18h a 37°C. Posteriormente se sembraron diluciones seriadas 1/10 de cada cultivo en MHA y MHA suplementado con 300 µg/mL de rifampicina. Tras 36-48h de incubación a 37°C se contaron las colonias y se procedió al cálculo y comparación estadística de las respectivas tasas de mutación de forma análoga al apartado anterior (Gould CV *et al*, 2007).

3.4.7. Contribución de MexCD-OprJ a la resistencia antibiótica en crecimiento en forma de biofilm

Con el fin de cuantificar la aportación del sistema MexCD-OprJ a la resistencia antimicrobiana en un biofilm se inició un experimento en el que se partió de biofilms formados siguiendo la metodología previamente descrita, de la cepa de referencia PAO1, del mutante que hiperexpresa dicho sistema de expulsión activa PAONB y del mutante nulo PAOMxD. Así, se incubaron durante 24h los biofilms en presencia de concentraciones crecientes de azitromicina (0,5, 1 y 4 µg/mL) y ciprofloxacino (0,125, 0,25, 0,5, 1, y 2 µg/mL), de forma independiente.

Transcurrido el tiempo de incubación se transfirieron las células pertenecientes al biofilm a caldo MH fresco mediante centrifugación, para posteriormente sembrarlo en MHA a las diluciones seriadas pertinentes. Se incubaron dichas placas overnight, y se contaron las UFC pertenecientes a cada biofilm. Se llevaron a cabo 4 réplicas de cada experimento y cepa, y se expresó el valor final como la media de los 4 valores.

3.4.8. Inducibilidad del sistema MexCD-OprJ

Se evaluó la inducibilidad del sistema MexCD-OprJ en la cepa silvestre PAO1, en presencia de antibióticos. Para ello se suplementaron los cultivos exponenciales con antibióticos que fuesen sustratos de esa bomba de expulsión activa, a diferentes concentraciones y durante las 3 horas previas a la extracción de ARN. Como posibles antibióticos inductores del sistema, se usó azitromicina a concentraciones 0,5 µg/mL, 4 µg/mL y 16 µg/mL, y ciprofloxacino a una concentración de 0,06 µg/mL. Se usó el valor expresión de *mexD* de la PAO1 sin inductor como referencia. Para ello se extrajo por triplicado el ARN total (siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.3.2.2.A). Posteriormente se trataron los extractos con DNAsa y a continuación se normalizaron sus concentraciones a 50 ng/µL siguiendo los procedimientos previamente descritos. Se usó una cantidad total de 50 ng de ARN purificado para llevar a cabo una PCR por transcripción inversa a tiempo real usando los pares de cebadores MxD-U/MxD-L para la amplificación de *mexD* y RpsL-1/RpsL-2 para amplificar el gen *housekeeping rpsL*, usado como referencia para calcular la cantidad relativa de ARNm correspondiente al gen *mexD*.

En todos los casos se consideró la media de 3 valores de expresión obtenidos en experimentos independientes.

3.4.9. Análisis del transcriptoma del mutante *nfxB*

Para efectuar un análisis de la expresión diferencial de los posibles genes implicados en la hiperproducción de MexCD-OprJ, se realizó un estudio mediante microarray del mutante PAONB y del mutante PAONBMxD juntamente con la PAO1 como

Materiales y Métodos

control. Brevemente, se realizó un cultivo en caldo LB de tres réplicas independientes de cada una de las cepas de estudio (PAONB, PAONBMxD y PAO1) los cuales se dejaron crecer a 37°C y 180 rpm hasta la fase exponencial tardía, con una densidad óptica a 600 nm de 1. Las células fueron recolectadas mediante centrifugación a 8000 *g* durante 5' a 4°C. Posteriormente se procedió a la extracción del ARN total usando el RNeasy minikit (QIAGEN, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN fue disuelto en agua libre de RNasas y tratado posteriormente con 2 U de TURBO DNA-free™ (Ambion) durante 30' a 37°C para eliminar las posibles trazas de ADN. La reacción se detuvo añadiendo 5 µl del Reactivo de inactivación de DNasa (DNase inactivation reagent). Antes de empezar la síntesis de ADNc (ADN copia) la calidad del extracto de ARN fue comprobada cargando 10 µg en un gel de agarosa. Una vez comprobado el estado del extracto se procedió a la síntesis de ADNc, fragmentación, marcaje e hibridación siguiendo el protocolo recomendado (GeneChip *Pseudomonas aeruginosa* genome array, Affymetrix, Santa Clara, CA). Brevemente, se hibridaron 750 ng de cebadores aleatorios (random primers, Amersham, GE Healthcare Limited, Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire) con 10 µg de ARN total siguiendo un ciclo de temperatura inicial de 70°C durante 10' seguido de 10' a 25°C para posteriormente dejar la mezcla a 4°C. Para la síntesis de ADNc se utilizaron las condiciones: 10' a 25°C, 60' a 37°C y 60' a 42°C con la siguiente mezcla de reacción denominada *first strand buffer*: DTT 10mM, dNTPs a 0.5 mM, 30 U de SuperScript II RT y 30 U de inhibidor de RNasas (inhibitor SUPERase, Life Technologies, Gibco/BRL). La reacción fue inactivada 10' a 70°C y después enfriada a 4°C. Se procedió posteriormente a la hidrólisis con NaOH durante 30' a 65°C seguido de neutralización con HCl.

El ADNc se purificó con QIAquick mini kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) y posteriormente cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 260 nm y se fragmentó con DNasa I 0.6 U/µg de ADNc. Finalmente se procedió al marcaje del ADNc con Biotina-ddUTP usando el BioArray Terminal Labelling kit™ (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY) siguiendo el protocolo recomendado por Affimetrix GeneChip.

Los arrays fueron hibridados según las recomendaciones del fabricante y la extracción de resultados y normalización se realizó usando el parámetro denominado Promedio Robusto de Multiarray (RMA) descrito por Irizarry RA y colaboradores (Irizarry RA et al, 2003). La expresión diferencial entre las cepas de estudio PAONB, PAONBMxD y la cepa control (PAO1) se analizaron mediante una aproximación Bayesiana (Hatfield GW et al, 2003), usando el programa CyberT. Solo fueron consideradas significativas las diferencias que conllevaran un incremento mayor o igual que el doble del valor obtenido para la cepa de referencia o, por otro lado que supusieran un decremento menor o igual que la mitad del valor de expresión de la cepa tipo. En todos los casos la probabilidad posterior de expresión diferencial (PPDE) obtuvo valores entre 0.999 y 1.

3.5. Interacción de MexCD-OprJ con otros mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa*, en crecimiento planctónico y en forma de biofilm

3.5.1. Patrón de sensibilidad y estudios de complementación del mutante doble *nfxB-dacB* (PAONBDB)

Se determinaron las CMI mediante tiras de Etest (Biomérieux) en MHA siguiendo las instrucciones del fabricante, de todos los nuevos mutantes, y se compararon con las CMI de sus cepas parentales.

A continuación se usó la clonación del gen salvaje de la PAO1 *nfxB* en el pUCP24 (pUCPNB, ver TABLA 4) para electroporarlo en el mutante doble *nfxB-dacB*. Una vez finalizada la complementación se determinaron las CMI de los clones y se compararon con el mismo mutante sin complementar.

3.5.2. Determinación de los niveles de expresión de genes de resistencia en el mutante doble *nfxB-dacB* (PAONBDB)

3.5.2.1. Expresión de bombas de expulsión activa

Se determinaron los niveles de expresión de los genes *mexD*, *mexB*, *mexY*, *mexF* y *oprM*, como representantes de las principales bombas de expulsión activa en *P. aeruginosa*, y se compararon con los datos obtenidos de sus respectivas cepas parentales de la PAO1, y de los mutantes nulos PAONB, PAOMxD, PAODB y PAONBDB, y PAONBDBMxD.

Para ello se extrajo el ARN total de cultivos en fase exponencial y se procedió a su cuantificación tal como se describe en el apartado 3.3.2.2.A, usando los pares de cebadores MxD-U/MxD-L, MexB-U/MexB-L, MexY-Fa/MexY-Ra, MexF-U/MexF-L, OprM-F3/OprM-R3. El par RpsL-1/RpsL-2 se utilizó para amplificar el gen *rpsL* usado como referencia para calcular la cantidad relativa de ARNm correspondiente a los otros genes estudiados.

3.5.2.2. Expresión de *ampC* y *creD*

De forma análoga se cuantificó la expresión génica de *ampC* y *creD*. En este caso se usaron los pares de cebadores ACrnaF/ACrnaR, CreDF/CreDR, y RpsL-1/RpsL-2

Paralelamente se pretendió evaluar si la inactivación de *nfxB* ejerce algún efecto sobre la inducibilidad del sistema AmpC. Para ello se determinaron las expresiones génicas relativas de dichos mutantes en presencia de 0,015 µg/mL de imipenem como inductor de dicha cefalosporinasa cromosómica.

3.5.3. Estatus de las bombas de expulsión intrínsecas en el mutante nulo *nfxB*: MexAB-OprM y MexXY-OprM. Análisis de proteínas de membrana externa

Una vez observada la ausencia de cambios transcripcionales del gen que codifica para la porina común a los dos sistemas de expulsión intrínsecos MexAB-OprM y MexXY-OprM, se pretendió investigar la posible interacción postranscripcional entre la hiperproducción del sistema MexCD-OprJ y la traducción de otras bombas de expulsión activa bien conocidas en *P. aeruginosa*. Con tal fin, se procedió a extraer las proteínas de membrana externa en el mutante PAONB, así como en la cepa de referencia PAO1 y los mutantes PAONBMxD, PAOM, PAOMxR, PAONBOM y PAOD. Para ello se adaptaron protocolos previamente descritos (Filip C *et al*, 1973). Brevemente, se prepararon de las cepas indicadas en 10 mL de caldo LB. A las cepas PAONB y PAONBOM se les adicionó 0,125 µg/mL de ciprofloxacino para evitar la aparición de revertientes espontáneos. Tras su incubación overnight, se inocularon 200 mL de caldo LB en un matraz estéril, en una proporción resultante de 1/40, y se incubaron dichos matraces a 37°C y 180 rpm hasta que alcanzaron una densidad óptica a 600 nm de 1 (crecimiento exponencial tardío). Llegado a este punto se centrifugaron los cultivos a 7000 *g* durante 15 minutos para desechar el sobrenadante. A cada pellet bacteriano proveniente de los cultivos anteriores, se le practicaron un lavado con 100 mL de tampón TRIS-Mg a pH 7,3 frío (10 mM TRIS, 5 mM CaMg_2), para finalmente dejar las células lavadas en 5 mL de la misma solución tamponadora y congelarlas no menos de 18 horas a -20°C. Tras su descongelación se procedió a la rotura de la arquitectura celular mediante sonicado. Para ello se seleccionó una amplitud de sonicación del 20% y se procedió con 4 ciclos de 40 segundos de sonicado en hielo, donde cada ciclo consta de 5 segundos de sonicación por uno de reposo, siempre manteniendo el extracto en hielo. Seguidamente se centrifugó a 4000 *g* durante 15 minutos para eliminar las células que no hubieran resultado dañadas por el proceso de sonicado. Posteriormente se procedió a la ultracentrifugación de los extractos a 100.000 *g* durante 1 hora a 4°C. Tras dicho proceso, se suspendió el pellet con 10 mL de una solución al 1 % de sarcosinato sódico en tampón TRIS-HCl a pH 8 (25 mM TRIS) a temperatura ambiente. Se dejó en reposo a 30°C durante 30 minutos para que el sarcosinato solubilizara los lípidos procedientes de las membranas celulares. Transcurrido ese tiempo se ultracentrifugó cada tubo a 70.000 *g* durante 1 hora a 25°C. Se procedió de forma análoga para efectuar un lavado más con sarcosinato al 1%. Finalmente se suspendió el pellet resultante, constituido por proteínas de membrana externa, en 0,2 mL de agua, al que se adicionó el mismo volumen de Laemmli Sample Buffer 2X (Bio-Rad). Se desnaturalizaron las proteínas a 100°C durante 5 minutos y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos para eliminar todo material insoluble. La suspensión resultante se sometió a electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida (ver ANEXO 1) y se tiñó con azul de Coomassie al 1%.

3.5.4. Determinación de los perfiles de expresión de las Proteínas Fijadoras de Penicilinas (PBP) en el mutante *nfxB*

Se obtuvo un extracto purificado de las PBP de las cepas PAO1 y PAONB siguiendo protocolos previamente descritos (Zhao G *et al*, 1999; Moya B *et al*, 2010) Se incubaron a 37°C y 180 rpm, 500 mL de caldo LB previamente inoculados con las cepas PAO1 y PAONB. A continuación se centrifugó todo el cultivo y se lavó el pellet con el tampón A (20 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, pH 7,5), se concentró de nuevo mediante centrifugación y finalmente se suspendió en 50 mL de la misma solución tamponada. A continuación se rompieron las células mediante sonicación, realizando 4 ciclos de sonicatedo de 30 segundos cada uno. Cada ciclo se compone de 5 segundos de sonicatedo por 1 segundo de reposo. Todo el proceso de sonicatedo debe realizarse en hielo para retrasar la degradación del extracto. Acto seguido se procedió a centrifugarlo a 12.000 *g* durante 10 minutos con la intención de eliminar las células que no hubieran resultado dañadas por el sonicatedo, para posteriormente concentrar las membranas celulares y purificar el extracto mediante ultracentrifugación a 150.000 *g* 1 hora a 4°C y posterior lavado con la solución tamponada A dos veces por cada extracto.

En este punto las Proteínas Fijadoras de Penicilinas se marcaron con Bocillin FL (Zhao G *et al*, 1999), una penicilina sintética que se une covalentemente a las PBP y emite fluorescencia a 533 nm al ser excitada con radiación de una longitud de onda de 488 nm, permitiendo así visualizarlas tras separarlas en el posterior gel de poliacrilamida/dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Una vez separadas las bandas correspondientes a las PBPs, se visualizó con el escáner de Bio-Rad FX-Pro molecular imager.

3.5.5. Determinación de la actividad betalactamasa específica en los mutantes nulos *nfxB* en diferentes compartimentos celulares

La actividad hidrolítica específica de la betalactamasa cromosómica (nanomoles de nitrocefín hidrolizados por minuto y miligramo de proteína) se determinó espectrofotométricamente (longitud de onda de 482 nm, utilizando una solución de nitrocefín 10⁻⁵ M) en cada extracto determinado siguiendo protocolos descritos previamente (Oliver A *et al*, 1999).

Para los experimentos de inducción, antes de la obtención de extractos, las cepas PAO1 y PAONB se incubaron en 30 ml de medio LB caldo (en dilución 1:10 a partir de un cultivo líquido overnight) con 0,015 µg/ml de imipenem durante tres horas. En los ensayos sin inducción se usaron las cepas PAO1 y el mutante doble PAONBDB, y se procedió de igual modo, sin añadir imipenem al caldo LB.

Además se pretendió averiguar cómo varía la actividad en función del tiempo en estos mutantes. Para ello, y en cada cepa estudiada, se procedió a medir dicha actividad en fase exponencial temprana (DO = 0,2), fase exponencial tardía (DO = 1), y fase estacionaria (18 horas de incubación). En todos los casos se tuvo en cuenta la media de los valores de la actividad betalactamasa obtenidos en al menos tres experimentos independientes.

3.5.5.1. Actividad betalactamasa total (extracto crudo)

Se procedió a precipitar (centrifugación de 15' a 3000 rpm) del orden de 5×10^9 células para después eliminar el medio de cultivo, y lavar las células con 20 ml de PBS 0,1 M (pH 7). Se volvieron a precipitar las células de igual modo, y posteriormente fueron resuspendidas en un volumen final de 3 ml de PBS 0,1 M (pH7). Antes de llevar a cabo la sonicación, las muestras se congelaron a -80°C para facilitar la posterior lisis celular. Una vez descongeladas, la sonicación se llevó a cabo en un sonicador Branson Digital Sonifier 450 (Branson Ultrasonics Corp, Danbury, EE.UU.), con las condiciones: amplitud del 10%, pulsos de 1s ON y 1s OFF durante 3 minutos. Una vez llevada a cabo la sonicación, se centrifugaron las muestras 5' a 13000 rpm, y el sobrenadante se guardó a -80°C como extracto proteico crudo sonicado, para ulteriormente efectuar la medición de la actividad betalactamasa en dicho extracto.

3.5.5.2. Actividad betalactamasa periplasmática

Se obtuvo la fracción periplasmática mediante la formación de esferoplastos con lisozima y MgCl_2 , siguiendo protocolos previamente descritos (Imperi F *et al*, 2009). Brevemente, se centrifugaron aproximadamente 5×10^9 células en fase estacionaria temprana ($\text{DO} = 1$) y se suspendieron en 1 mL de tampón 10mM Tris-HCl, 200 mM de MgCl_2 y 0,5 mg/mL de lisozima. Tras un incubación de 30 minutos a temperatura ambiente con agitación se volvieron a centrifugar (11.000 g, 15 min, 4°C) para finalmente obtener la fracción periplasmática en el sobrenadante del centrifugado. A continuación se procedió a medir la actividad betalactamasa específica tal y como se explica anteriormente.

3.5.5.3. Actividad betalactamasa en sobrenadante

Se centrifugaron del orden de 5×10^9 células procedentes de cada cultivo y a continuación se procedió a medir la actividad betalactamasa específica en el sobrenadante de sendos cultivos.

3.5.6. Estudio de la supervivencia del mutante *nfxB* en biofilms tratados con antibióticos betalactámicos

Tras los hallazgos realizados se pretendió averiguar si la alteración de la fisiología de AmpC en el mutante *nfxB* supone una ventaja biológica al proporcionarle un nicho ecológico favorable, como pudiera ser un biofilm tratado con antibióticos betalactámicos.

Con tal fin, se procedió a formar biofilms en el dispositivo Calgary (ver metodología en apartado 3.3.1.2 para realizar dos experimentos complementarios. En el primero se usaron las cepas PAO1, PAONB, PAOAC y PAONBAC, y se trataron los biofilms ya formados, con imipenem (potente inductor de AmpC, a pesar de ser relativamente estable a su hidrólisis) durante 24 h a concentraciones 0, 0,25 y 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Paralelamente se inicio otro experimento análogo con las cepas PAO1, PAONB, PAODB y PAONBDB, e incubando los biofilms ya formados con ceftazidima (débil inductor de AmpC, pero muy susceptible a ser hidrolizado por dicha cefalosporinasa) durante 24 h a concentraciones 0, 1, 2 y 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Una vez finalizado el periodo de incubación con el antimicrobiano determinado, se procedió a la transferencia del biofilm a caldo MH, siguiendo las directrices de los protocolos previamente descritos. A continuación se hicieron diluciones seriadas 1/10 y se sembraron en MHA para posteriormente hacer un recuento de viables.

En todos los experimentos se realizaron 3 réplicas por cepa y concentración de antibiótico.

3.5.7. Inactivación de *nfxB* en cepas clínicas

Siguiendo protocolos de inactivación de genes previamente descritos en el apartado 3.2, se inactivó el gen *nfxB* en las cepas clínicas GPP y JW, con la intención de averiguar si el fenotipo observado es o no específico de la PAO1. Los mutantes obtenidos se denominaron GPPNB y JWNB.

Una vez construidos, se procedió a determinar su CMI de los principales antibióticos antipseudomónicos: ceftazidima, cefepima, aztreonam, imipenem, tobramicina y colistina en placas de MHA.

Seguidamente y con la intención de comprobar si la alteración en la fisiología y localización de AmpC también era extrapolable a otras cepas diferentes a la PAO1, se inició un experimento de medición de actividad betalactamasa en sobrenadante, con las cepas PAONB, JWNB, GPPNB, y sus respectivas cepas parentales usadas como control. Dicho experimento se realizó en fase exponencial tardía y en condiciones de inducción con imipenem a concentración 0,015 µg/ml. Una vez finalizado, se compararon los valores obtenidos de actividad betalactamasa de los mutantes *nfxB* con sus respectivas cepas parentales.

3.5.8. Estudio preliminar del efecto de la inactivación *nfxB* en la resistencia mediada por betalactamasas transferibles

Llegados a este punto se intentó averiguar si la permeabilización que sufre la betalactamasa AmpC en el mutante *nfxB* se hace extensiva a otras de carácter transferible. Para ello se clonaron diferentes betalactamasas pertenecientes a las otras tres clases de la clasificación de Ambler diferentes a la clase C, como son la clase A (BEL-3, SHV-12, GES-1), la clase B (VIM-2) y la clase D (OXA-161), usando como vector el pUCP24. Para ello se amplificaron y secuenciaron dichas betalactamasas procedentes de cepas de nuestra colección de laboratorio y una vez caracterizadas se procedió a amplificar por PCR dicho gen usando cebadores específicos para cada betalactamasa, a los que se les ha añadido una diana EcoRI o SmaI en el extremo 5' del cebador forward y una diana HindIII en el extremo 5' del cebador reverse (ver TABLA 5). El producto de PCR una vez purificado se sometió a digestión enzimática con los enzimas correspondientes. Los productos resultantes de la digestión enzimática se ligaron al plásmido pUCP24, el cual contiene ambos sitios de restricción, mediante la ligasa T4. Posteriormente se transformó el plásmido resultante en la *E. coli* XL1 Blue mediante el método con CaCl₂, siguiendo la metodología explicada en el apartado 3.2. A continuación se extrajeron los plásmidos de cada uno de los transformantes y se electroporaron en los mutantes PAOAC y PAONBAC.

Materiales y Métodos

En el caso de la clonación BEL-3 se usó el plásmido pUCPBEL3 procedente de trabajos previos (Juan C *et al*, 2010).

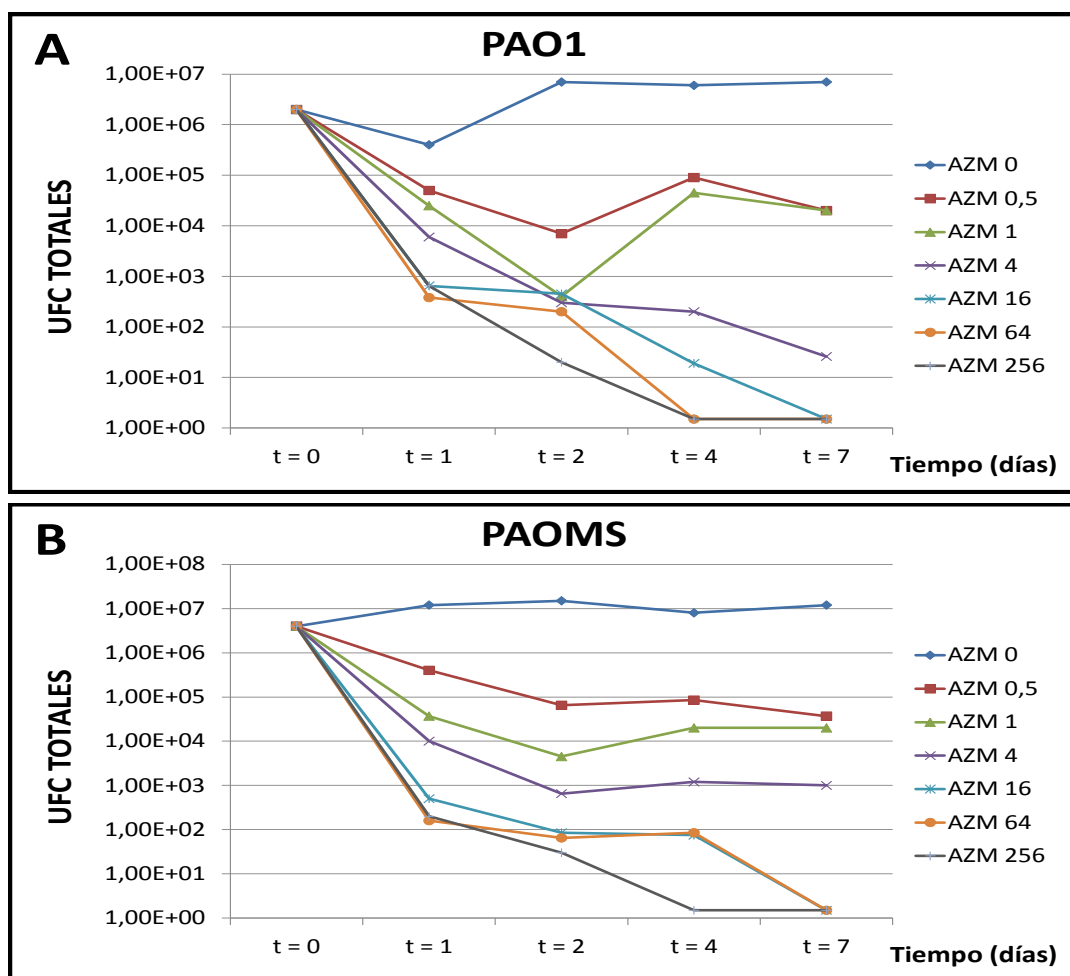
Una vez obtenidas todas las transformaciones se procedió a determinar su CMI de ceftazidima, imipenem, y en el caso del mutante PAONBAC también se determinó en paralelo la CMI de ciprofloxacino para verificar el fenotipo *nfxB* y descartar la posibilidad de que durante el proceso de transformación no hubiéramos obtenido revertientes espontáneos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de la inactivación de *mutS* y *mucA* sobre la actividad de la azitromicina en crecimiento en forma de biofilm

Como era predecible, *P. aeruginosa* mostró una resistencia de alto nivel a azitromicina cuando ésta crece de forma planctónica. En el estudio de sensibilidad realizado, las cuatro cepas PAO1, PAOMS, PAOMA y el mutante doble PAOMSA mostraron una CMI idéntica, de 128 µg/mL, lo cual indica que tanto la inactivación del gen *mutS* como la del gen *mucA* (o ambas inactivaciones simultáneamente) no tienen ningún efecto en cuanto a la resistencia a azitromicina se refiere.

No obstante cuando nos referimos a crecimiento en forma de biofilm, si han podido observarse diferencias en la dinámica poblacional a través del tiempo (FIGURA 10). A tiempo cero la carga bacteriana dispuesta para la formación del biofilm fue similar en las 4 cepas estudiadas, con unos valores que oscilan entre $5,2 \times 10^5$ y $4,0 \times 10^6$ UFC. Tal como se aprecia en la figura 10, transcurrido el día 1 la azitromicina mostró una actividad bactericida que aumenta de forma proporcional a la concentración del antimicrobiano. Por otro lado, concentraciones por debajo de 0,5 µg/mL no produjeron ninguna reducción significativa respecto a la carga bacteriana inicial.



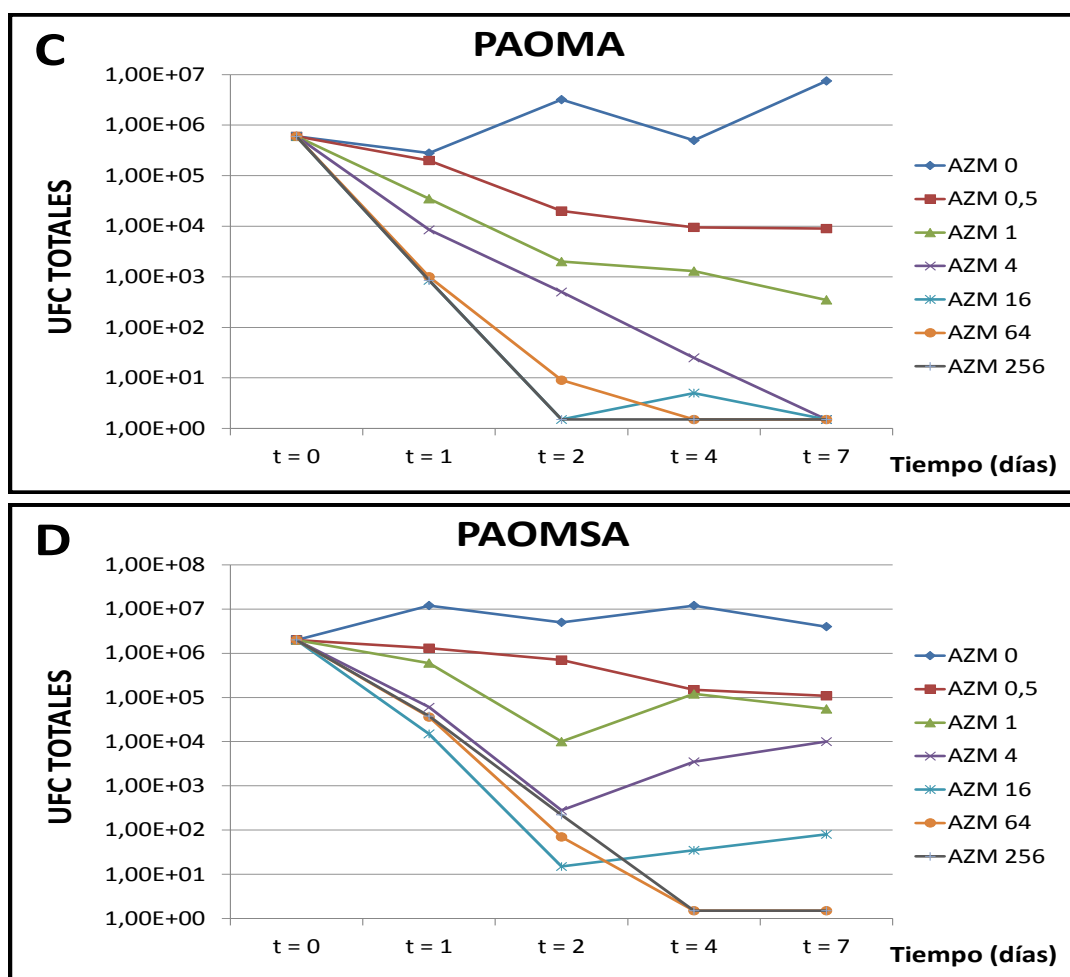


FIGURA 10. Dinámica poblacional frente al tiempo (0, 1, 2, 4 y 7 días) de los biofilms tratados con diferentes concentraciones de azitromicina para las cepas PAO1 (A), PAOMS (B), PAOMA (C) y PAOMSA (D).

En la cepa de referencia PAO1, la reducción en la carga bacteriana a día 1 oscila en torno a 2 logaritmos para una concentración de azitromicina de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 4 logaritmos con la exposición a 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (FIGURA 10A). Los resultados fueron similares para la cepa PAOMS (FIGURA 10B), no obstante, los mutantes deficientes en *mucA* PAOMA y PAOMSA (FIGURAS 10C y 10D) experimentaron una reducción poblacional menor transcurridas las primeras 24h del experimento, lo cual es especialmente observable el mutante doble *mucA-mutS* (PAOMSA), cuya reducción poblacional oscila entre la mitad de la carga bacteriana inicial para la concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de azitromicina a una reducción de 2 logaritmos en 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (FIGURA 10D).

El segundo día las reducciones en la población de cada biofilm fueron todavía más acusadas. Una vez más, la reducción de menor magnitud fue la observada en el mutante doble PAOMSA.

No obstante, en la fase de incubación prolongada con azitromicina (días 4 y 7) las poblaciones de las 4 cepas estudiadas parecen estabilizarse a bajas concentraciones de azitromicina (0,5 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Sin embargo, a partir del segundo día, y a concentraciones de azitromicina superiores a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las cepas PAO1 y PAOMA mostraron una continua reducción de la carga bacteriana con el tiempo, mientras que las cepas PAOMS y

especialmente la PAOMSA aumentaron en número su población tras la incubación prolongada con 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de azitromicina. En el día 7, el número total de células es 50 veces mayor para la PAOMS que para la PAO1 (FIGURAS 10A y 10B), y aproximadamente 5000 veces superior para la PAOMS al compararla con la PAOMA (FIGURAS 10B y 10C). El mutante doble *mucA-mutS* (FIGURA 10D) fue el único que experimentó un aumento poblacional, aunque discreto, para la fase de incubación prolongada (días 4 y 7) a una concentración de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de azitromicina.

Los datos obtenidos demuestran que la azitromicina efectivamente posee actividad bactericida in vitro frente *P. aeruginosa*, eso sí, circunscrita al crecimiento en forma de biofilm. Trabajos previos habían constatado que las concentraciones inhibitorias en biofilm (BIC) eran superiores a sus respectivas CMI para todos los antibióticos ensayados a excepción de la azitromicina (Moskowitz SM *et al*, 2004), cuya actividad se cree que puede residir en el bloqueo del *quorum sensing* bacteriano (Hoffmann N *et al*, 2007). Dicho efecto bactericida se ha podido observar a concentraciones tan bajas como 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los recuentos de la cepa hiperproductora de alginato (PAOMA) parecen indicar que el alginato no ejerce, por sí mismo, un efecto significativo sobre la actividad de la azitromicina respecto a la cepa de referencia PAO1, no obstante sí se observaron diferencias estadísticamente significativas en la dinámica poblacional frente al tiempo, entre biofilms de cepas y no hipermutadoras tratados con azitromicina. Así, se observó un aumento significativo en los contajes de las cepas PAOMS y PAOMSA a concentraciones de azitromicina de hasta 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respecto a las no hipermutadoras, sugiriendo que la resistencia a la acción de la azitromicina en los biofilms podría estar mediada por mecanismos mutacionales.

4.1.1. Desarrollo de resistencias en biofilms tratados con azitromicina

4.1.1.1. Mecanismos de resistencia a azitromicina mutacionales o adaptativos

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que existe una selección de poblaciones resistentes a azitromicina en los biofilms tratados con 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, especialmente en los mutantes en *mutS*.

Con el fin de dilucidar si este elevado número de supervivientes al tratamiento en las cepas *mutS* se debe a un mecanismo de resistencia a azitromicina estable (mutacional) o adaptativo (inducible), se recuperaron los 12 linajes por cepa almacenados a -80°C procedentes del biofilm de 7 días y 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de azitromicina, de las cepas deficientes en *mutS*: PAOMS y PAOMSA. Tras un subcultivo en agar LB, se inició de nuevo la formación de biofilms con cada linaje y se trataron durante 24h con una concentración fija de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de azitromicina. Tal y como se muestra la FIGURA 11, la actividad de la azitromicina es significativamente más baja en estos linajes que en su cepa parental, respectivamente. Los porcentajes de supervivencia (obtenidos como el cociente entre células viables en biofilms tratados y los no tratados) resultaron oscilar entre 1 a 2 logaritmos más altos que los porcentajes de supervivencia de sus respectivas cepas parentales (PAOMS y PAOMSA). Esta diferencia observada en los porcentajes de supervivencia resultó ser

Resultados y Discusión

estadísticamente significativa ($P < 0,05$) en 12 de 12 linajes de la cepa parental PAOMS y en 9 de 12 linajes de la cepa PAOMSA.

La mayor supervivencia a azitromicina 4 $\mu\text{g/mL}$ por parte de los linajes almacenados en comparación con su cepa parental después de un subcultivo en medio no selectivo, indica que se han establecido en ellos unos mecanismos permanentes (mutacionales) capaces de inhibir o atenuar la acción bactericida de la azitromicina sobre biofilms.

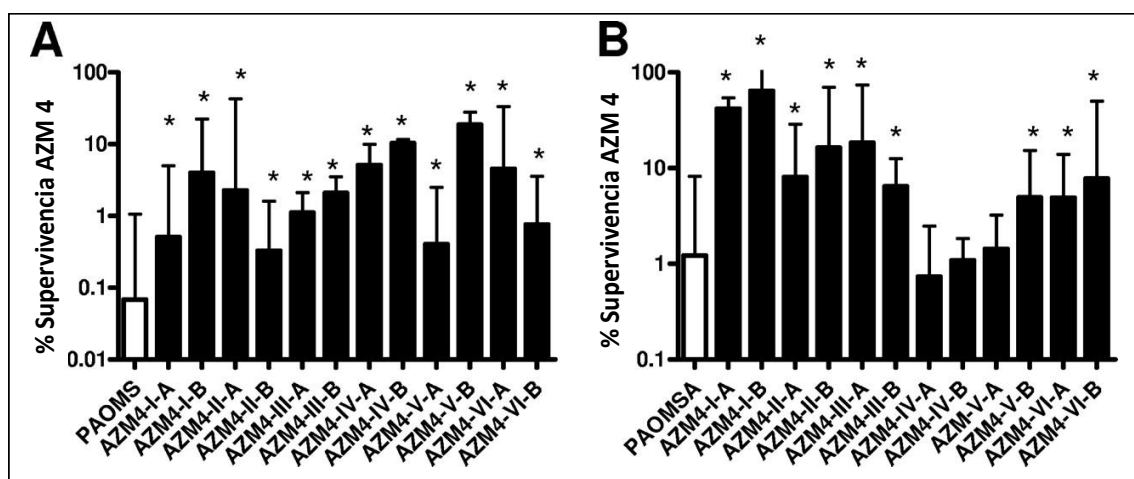


FIGURA 11. Representación gráfica de los porcentajes de supervivencia (células viables en biofilms tratados frente a los no tratados) después de 24h de incubación con azitromicina 4 $\mu\text{g/mL}$ de 12 linajes de la PAOMS (A) y 12 de la PAOMSA (B) provenientes del experimento de 7 días y azitromicina 4 $\mu\text{g/mL}$.

4.1.1.2. Desarrollo de resistencia mutacional a azitromicina. Caracterización e impacto en el perfil global de sensibilidad antibiótica.

A. Perfil de sensibilidad antibiótica de los mutantes resistentes a azitromicina

Se determinaron las CMI de los 12 linajes de la PAOMS y PAOMSA procedentes del biofilm de 7 días y concentración 4 $\mu\text{g/mL}$, de los principales antibióticos antipseudomónicos actuales.

Los datos de sensibilidad antibiótica efectivamente mostraron que el 83% (10 de 12) y el 50% (6 de 12) de los linajes procedentes de la PAOMS y la PAOMSA respectivamente, experimentaron un aumento en la CMI de ciprofloxacino y cefepima (véase TABLA 6).

A la luz de estos resultados se decidió proceder con un cribado utilizando la CMI de ciprofloxacino como variable discriminadora, de los supervivientes del biofilm tratado 7 días a concentraciones de azitromicina de 0, 0,5, 1 y 4 $\mu\text{g/mL}$, no sólo de las cepas deficientes en *mutS*, sino también en las cepas no hipermutadoras PAO1 y PAOMA.

Se consideró un resultado positivo para un determinado linaje cuando presentara una CMI de ciprofloxacino superior al doble que la de la cepa salvaje (CMI > 0,25 $\mu\text{g/mL}$).

Como podemos observar en la TABLA 6, para las cepas no hipermutadoras PAO1 y PAOMA son pocos los linajes (uno o dos por concentración y cepa) que muestran un incremento en la resistencia a ciprofloxacino. Estos datos indican que este tipo de

mutación que conferirá resistencia a azitromicina en biofilm también es seleccionable, aunque en menor medida, en cepas no hipermutadoras y a concentraciones de azitromicina tan bajas como 0,5 µg/mL.

TABLA 6. Cribado de resistencia a ciprofloxacino de los aislados procedentes de los biofilms de 7 días, incubados en presencia de diferentes concentraciones de azitromicina

Cepa	Resistencia a CIP (UFC resistentes a CIP/UFC examinadas) ^a			
	0 µg/mL	0,5 µg/mL	1 µg/mL	4 µg/mL
PAO1	0/12	2/12	2/8	2/10
PAOMA	0/12	1/12	2/8	0/0
PAOMS	0/12	12/12	10/12	10/12
PAOMSA	0/12	8/12	7/12	6/12
PAOMxD	0/12	0/12	0/12	0/10
PAOMSMxD	0/12	0/12	0/12	0/12

^aSe examinaron un máximo de 12 UFC por cepa y concentración de azitromicina (2 UFC por cada una de las 6 réplicas). Se consideró resistente a ciprofloxacino cuando la CMI exhibida fue dos diluciones superior a la cepa salvaje (CMI > 0,25 µg/mL)

Como era de esperar, en ausencia de presión selectiva (concentración 0 µg/mL de azitromicina), no se recuperó ningún linaje del biofilm, de ninguna de las 4 cepas estudiadas, que presentara un aumento en la resistencia a ciprofloxacino.

Tal como se muestra en la TABLA 7 los mutantes procedentes del biofilm de 7 días que experimentaron un aumento de la de la resistencia a ciprofloxacino (con CMI que van desde 0,5 a 4 µg/mL) también exhiben un aumento en la resistencia a cefepima, con unas CMI que oscilan de 6 a 16 µg/mL. En las CMI de ceftazidima y colistina no se observan diferencias respecto a sus cepas parentales. Por el contrario los linajes recuperados del biofilm mostraron una clara disminución en la CMI (aumento de la sensibilidad) de imipenem y tobramicina respecto a sus respectivas cepas parentales, dejando la CMI de imipenem y tobramicina hasta 4 diluciones por debajo del valor de la cepa de referencia PAO1.

Los datos obtenidos sugieren que el mecanismo responsable de la resistencia a azitromicina en biofilms es el mismo en prácticamente la totalidad de los linajes estudiados, y dicha resistencia ocasiona el aumento de resistencia conjunta a ciprofloxacino y cefepima. Por el contrario, el mecanismo de resistencia que afecta a estos antimicrobianos tiene lugar a expensas de una reducción en las CMI de otros agentes antipseudomónicos como pueden ser imipenem y tobramicina.

La selectividad que muestra dicho mecanismo para un determinado grupo de antibióticos parece sugerir que las bombas de expulsión activa podrían efectivamente estar implicadas en este fenotipo. Además, la resistencia a quinolonas asociada a un perfil de resistencia similar en aislados provenientes de pacientes con fibrosis quística

Resultados y Discusión

frecuentemente se ha relacionado frecuentemente con la hiperexpresión de MexCD-OprJ (Hirai K *et al*, 1987; Jakics E *et al*, 1992; Jalal S *et al*, 2000; Jeannot K *et al*, 2008).

TABLA 7. Patrones de resistencia de los mutantes resistentes a azitromicina procedentes del biofilm de 7 días

Cepa	Conc./réplica	CMI ($\mu\text{g/mL}$)						
		CIP	FEP	CAZ	AT	IP	TOB	COL
PAO1	WT	0,125	1,5	1,5	2	1,5	1,5	2
PAO1	AZM 0,5-IV-A	3	12	1,5	0,75	0,25	0,19	1,5
	AZM 1-V-A	3	12	1	0,5	0,38	0,38	2
	AZM 4-IV-A	2	12	1,5	0,75	0,38	0,25	1,5
PAOMA	AZM 0,5-1-B	3	12	0,5	0,5	0,25	0,38	1
	AZM 1-II-A	2	12	1	0,75	0,38	0,38	1
PAOMS	AZM 0,5-II-B	4	12	1	0,75	0,25	1	2
	AZM 1-I-A	4	12	1	2	1	1	2
	AZM 4-II-A	2	8	1,5	0,75	0,38	0,75	2
	AZM 4-II-B	2	12	2	2	1	1	2
	AZM 4-III-A	2	16	2	1	0,25	0,5	2
	AZM 4-III-B	2	8	2	2	1	1	2
	AZM 4-IV-A	1	6	1,5	0,75	0,19	0,5	3
	AZM 4-IV-B	0,75	6	1,5	1,5	1	1,5	3
	AZM 4-V-A	0,5	8	2	2	1,5	1,5	2
	AZM 4-V-B	1,5	12	1,5	0,75	0,38	0,5	1,5
	AZM 4-VI-A	1	12	1,5	0,75	0,25	1	1,5
	AZM 4-VI-B	0,5	12	2	1	0,5	1	0,5
PAOMSA	AZM 0,5-II-A	3	12	1,5	1	0,38	0,75	1
	AZM 1-II-B	3	8	1	0,75	0,25	0,38	2
	AZM 4-I-B	2	12	2	2	1	1	3
	AZM 4-II-A	3	16	1,5	1	0,38	0,5	3
	AZM 4-II-B	3	12	2	1	0,25	0,5	2
	AZM 4-III-A	3	12	2	2	1	1,5	2
	AZM 4-VI-A	3	16	1,5	1	0,38	0,5	2
	AZM 4-VI-B	2	16	1,5	1	0,38	1	1

B. Niveles de expresión génica de bombas de expulsión activa de los mutantes resistentes a azitromicina

Al observar este patrón de resistencia tan singular y sugerente de la hiperexpresión de MexCD-OprJ, se procedió a determinar los niveles de expresión de *mexD* para todos los linajes estudiados.

Tal como se muestra en la TABLA 8, todos los linajes estudiados presentaron hiperexpresión de MexCD-OprJ con unos niveles de *mexD* que oscilan entre 30 veces y 1300 veces más que la expresión basal de la cepa de referencia PAO1.

C. Secuenciación del gen *nfxB*. Alteraciones genéticas del regulador negativo del sistema MexCD-OprJ

A la luz de los datos de expresión génica obtenidos, se procedió a secuenciar el gen regulador negativo del sistema MexCD-OprJ (*nfxB*) de todos los linajes estudiados y efectivamente se hallaron mutaciones en el gen regulador *nfxB* (véase TABLA 8). Entre todas las cepas estudiadas se detectaron 18 tipos de mutaciones diferentes en el regulador negativo. Tal como se ha observado en los aislados clínicos investigados hasta el momento (Higgins PG *et al*, 2003; Jeannot K *et al*, 2008), las mutaciones más frecuentes, halladas en 19 de 25 de los linajes estudiados, son mutaciones de cambio de sentido. En 10 de esas 19 cepas, dichas mutaciones implicaron el cambio de una leucina por una prolina en diferentes residuos de NfxB (véase TABLA 8). Por otro lado, en sólo 5 de los linajes aparecieron mutaciones directamente inactivadoras (mutaciones sin sentido o de terminación prematura, cambios en el marco de lectura, inserciones o deleciones).

De forma similar a trabajos recientes, uno de nuestros linajes presentó la mutación en el codón stop T562C impidiendo la correcta terminación de la traducción proteica (Pursell A. & Poole K, 2013). Además el citado trabajo halla otra mutación en común con nuestro trabajo (G539A), caracterizada por residir muy cerca del extremo C-terminal.

En total se hallaron 25 linajes con mutaciones en el gen regulador. Cabe decir que 17 de ellos provenían del biofilm de 7 días con 4 µg/mL de azitromicina, 4 provenían de la incubación con 1 µg/mL de azitromicina, y 4 provenían de la de 0,5 µg/mL.

En un trabajo previo los autores afirman que en un biofilm de *P. aeruginosa* es posible seleccionar fenotipos que hiperexpresan MexCD-OprJ (Gillis RJ *et al*, 2005). No obstante, y en contraste con nuestros resultados, dichos autores no observaron resistencia cruzada a ciprofloxacino y cefepima ni tampoco hallaron mutación alguna en el gen regulador *nfxB*. Así, según ese trabajo el fenotipo *nfxB* es atribuido a mecanismos inducibles, no mutacionales, y específicos del crecimiento en forma de biofilm. Resulta necesario hacer constar que en el mencionado trabajo no se descartan poblaciones mixtas con diferentes transcriptomas en el mismo biofilm ya que no se realiza un cribado en la población del biofilm suficientemente grande para poder extrapolar los hallazgos a toda la población del biofilm.

En cambio, en nuestros experimentos la mayoría de los linajes resistentes a azitromicina poseen alguna alteración genética inactivante en *nfxB* que los conduce a un estado de hiperexpresión desreprimida de MexCD-OprJ, y además todas las cepas del experimento que hiperexpresan MexCD-OprJ deben este fenotipo a la mutación en *nfxB*.

Resultados y Discusión

TABLA 8. Niveles de expresión de *mexD* relativa a la cepa silvestre PAO1 y mutaciones en *nfxB* de los mutantes resistentes a azitromicina procedentes del biofilm de 7 días

Cepa	Concentración /réplica	Expresión relativa <i>mexD</i>	Mutación en <i>nfxB</i>	Efecto
PAO1	AZM 0,5-IV-A	465	Duplicación 230 pb (nt. 333)	Cambio marco lectura/codón STOP
	AZM 1-V-A	755	Delección 13 pb (nt. 231-244)	Cambio marco de lectura
	AZM 4-IV-A	241	T248C	Leu83Pro
PAOMA	AZM 0,5-1-B	433	G125T	Arg24Leu
	AZM 1-II-A	639	C25T	Arg9-STOP
PAOMS	AZM 0,5-II-B	333	T380C	Leu127Pro
	AZM 1-I-A	372	C116T	Thr39Ile
	AZM 4-II-A	169	T533C	Leu178Pro
	AZM 4-II-B	83	Delección C534	Cambio marco lectura
	AZM 4-III-A	419	T86C	Leu29Pro
	AZM 4-III-B	390	T41C	Leu14Pro
	AZM 4-IV-A	168	T86C	Leu29Pro
	AZM 4-IV-B	526	T562C	No STOP
	AZM 4-V-A	31	G461A	Gly154Asp
	AZM 4-V-B	254	C116T	Thr39Ile
	AZM 4-VI-A	352	G539A	Gly180Asp
	AZM 4-VI-B	428	T77C	Leu26Pro
PAOMSA	AZM 0,5-II-A	452	C89T	Ala30Val
	AZM 1-II-B	545	C25T	Arg9-STOP
	AZM 4-I-B	148	T544C	Ser182Pro
	AZM 4-II-A	324	T86C	Leu29Pro
	AZM 4-II-B	1314	T86C	Leu29Pro
	AZM 4-III-A	59	T77C	Leu26Pro
	AZM 4-VI-A	709	C89T	Ala60Val
	AZM 4-VI-B	449	C89T	Ala30Val

D. Papel de MexCD-OprJ en el desarrollo de resistencia cruzada a ciprofloxacino en los biofilms tratados con azitromicina

Una vez demostrado que una exposición prolongada a azitromicina permite la selección de mutantes que presentan resistencia cruzada a ciprofloxacino (particularmente observado en cepas hipermutadoras), y esa resistencia se debe a la hiperexpresión del sistema MexCD-OprJ, se pretendió averiguar si una exposición prolongada a azitromicina podía o no, seleccionar otros mecanismos de resistencia que den lugar a un aumento en la resistencia a ciprofloxacino (como por ejemplo la hiperexpresión de la bomba MexAB-OprM). Así, se procedió a realizar el mismo experimento con 1, 2, 4 y 7 días de incubación y las mismas concentraciones de azitromicina, pero esta vez con los mutantes nulos en *mexD* de la PAO1 y de la PAOMS (PAOMxD y PAOMSMxD). Una vez finalizado y de forma análoga a experimentos

anteriores, se procedió a seleccionar 12 linajes (de 6 réplicas independientes) por concentración de azitromicina y por cepa. Se determinó la CMI de ciprofloxacino por Etest (Biomérieux) de todos los linajes, y tal como se muestra en la TABLA 6 no se encontró ningún linaje defectivo en *mexD*, ni si quiera en las cepas hipermutadoras, que presentase un aumento de la resistencia a ciprofloxacino.

Tales resultados revelan que la selección de mutantes resistentes a azitromicina y que presentan resistencia cruzada a ciprofloxacino durante el tratamiento prolongado con azitromicina, es un proceso exclusivamente mediado por la hiperexpresión de MexCD-OprJ.

La terapia de mantenimiento con azitromicina es hoy día ampliamente usada en la práctica clínica en pacientes con fibrosis quística, no obstante el impacto de dicha terapia todavía no ha sido evaluado. El presente trabajo muestra como este tratamiento selecciona mutantes que hiperexpresan MexCD-OprJ, y por este motivo parece razonable pensar que en la medida de lo posible se debe evitar el uso de antibióticos como ciprofloxacino y cefepima en estos pacientes, ya que son sustratos bien conocidos de MexCD-OprJ.

4.1.2. Desarrollo de resistencia a azitromicina en crecimiento planctónico

Se determinó la CMI de ciprofloxacino y los niveles de expresión génica de *mexD* de todos los linajes almacenados provenientes del experimento con cultivos planctónicos de la PAO1 y la PAOMS. Solamente en 2 linajes procedentes de cepa hipermutadora PAOMS (y en ningún linaje proveniente de la PAO1) se halló una CMI de ciprofloxacino por encima del doble los valores de la cepa de referencia. Esos dos linajes presentaban también una hiperexpresión de *mexD*, y mutaciones en el regulador *nfxB*.

Estos resultados claramente indican que la selección de este tipo mutantes también ocurre en crecimiento planctónico, aunque aparentemente con mucha menor proporción que en un biofilm, donde la mayoría de los linajes provenientes de la PAOMS eran mutantes *nfxB*.

4.2. Caracterización del mutante *nfxB*

4.2.1. Patrón de sensibilidad antibiótica y estudios de complementación

De acuerdo con trabajos previamente publicados (Gotoh N *et al*, 1998), la hiperexpresión de MexCD-OprJ debido a la inactivación del gen regulador *nfxB* en la cepa PAONB hizo aumentar significativamente la CMI de ciprofloxacino hasta un valor 16 veces superior a la de la cepa de referencia PAO1, así como la CMI de cefepima hasta un valor 4 veces superior a la cepa de referencia, puesto que ambos antimicrobianos son sustratos de dicha bomba de expulsión activa (véase TABLA 8).

Por otra parte se aprecia una clara disminución de la CMI de otros agentes antipseudomónicos como el imipenem (16 veces) y la tobramicina (4 veces) respecto a la cepa de referencia PAO1, tal y como ya se observó en los mutantes procedentes del biofilm de 7 días tratado con azitromicina. De forma menos acusada este fenómeno de hipersensibilidad también fue observado para los otros betalactámicos a excepción de cefepima (véase TABLA 9).

Tal como se esperaba, el mutante simple *mexD* de la PAO1 (PAOMxD) no experimentó alteración alguna en las CMI de quinolonas, betalactámicos o aminoglicósidos, corroborando que la expresión basal de MexCD-OprJ es prácticamente nula.

De forma paralela al mutante in vitro en *nfxB* (PAONB), se construyó el mutante doble *nfxB-mexD* (PAONBMxD). Tal como se aprecia en la TABLA 9, este mutante doble muestra una clara reversión del fenotipo *nfxB*, igualando por completo las CMI de la cepa de referencia PAO1. Este hallazgo indica que el fenotipo *nfxB* depende única y exclusivamente de la expresión de MexCD-OprJ y no de otras posibles interacciones del gen regulador *nfxB* con otros sistemas de regulación o a otros niveles.

La complementación usando el plásmido portador del gen *nfxB* salvaje, pUCPNB, restauró el fenotipo salvaje, equiparando las CMI a las del fenotipo salvaje.

TABLA 9. Patrones de sensibilidad antibiótica tras la inactivación de *nfxB* y/o *mexD* en la PAO1.

Cepa	CMI (µg/mL)								
	CAZ	FEP	CTX	PTZ	ATM	IP	MER	CIP	TOB
PAO1	1,5	1,5	8	2	2	1,5	0,38	0,094	1
PAONB	0,5	6	3	1,5	0,38	0,094	0,125	1,5	0,25
PAOMxD	1,5	1,5	8	2	2	1,5	0,38	0,094	1
PAONBMxD	1	1,5	8	2	2	1,5	0,38	0,094	1
PAONB pUCPNB	1,5	1,5	8	2	2	1,5	0,38	0,094	1

Así, confirmamos previas evidencias que indican que la hiperexpresión del sistema de flujo MexCD-OprJ debida a la inactivación de su regulador negativo *nfxB* ocasiona un fenotipo cuyo patrón de sensibilidad sugiere que puedan haber interacciones entre la

propia expresión de la bomba y otros mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa*, tema que será tratado en profundidad más adelante (Gotoh N *et al*, 1998; Jeannot K *et al*, 2008; Masuda N *et al*, 2001).

4.2.2. Competitividad biológica del mutante *nfxB*

4.2.2.1. Tiempo de generación

En cultivos exponenciales se puede apreciar de forma empírica que el mutante *nfxB* (PAONB) así como todos sus derivados tardan más tiempo que las cepas que tienen el gen salvaje en alcanzar una densidad óptica determinada. Por este motivo se pretendió cuantificar el tiempo de generación o duplicación.

Los datos obtenidos corroboran esta observación. El mutante PAONB mostró un tiempo de duplicación de $42,7 \pm 8,8$ minutos, mientras que la PAO1 tardó $26,9 \pm 6,8$ minutos en dar lugar a una nueva generación.

El mutante doble *nfxB-mexD* (PAONBMxD), el cual ha demostrado presentar unas CMI similares a las de la PAO1, también mostró un tiempo de generación equiparable ($30,8 \pm 7,1$ minutos) al de la cepa de referencia, ratificando así que las propiedades observadas en el mutante *nfxB* se deben exclusivamente a la hiperexpresión y presencia de la bomba MexCD-OprJ en la membrana, descartando así cualquier otra interacción posible del gen regulador.

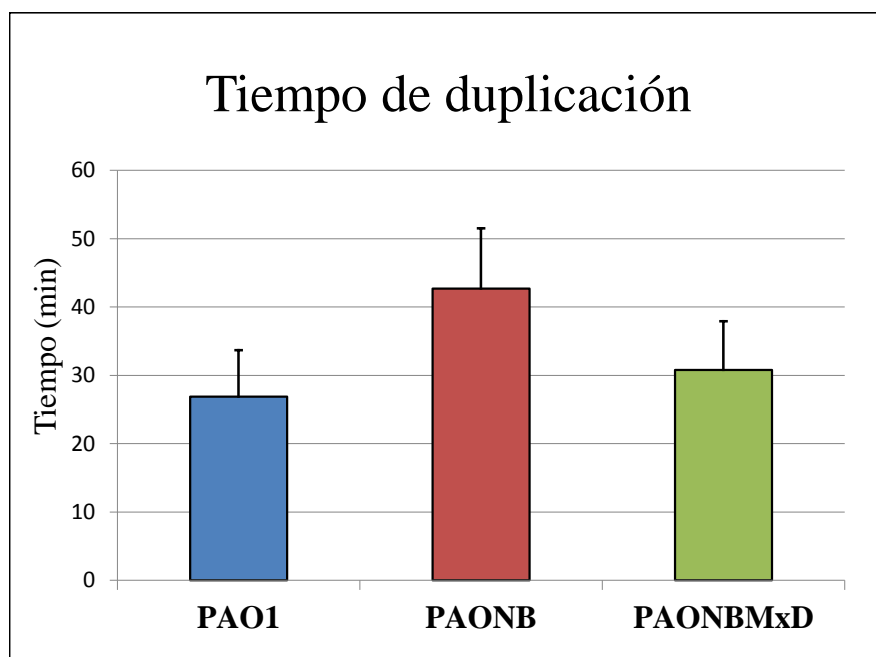


FIGURA 12. Representación gráfica de los tiempos de duplicación del mutante simple *nfxB* y el mutante doble *nfxB-mexD* respecto a la PAO1

4.2.2.2. Índice de competición

Tras una incubación de 24 horas desde la inoculación equitativa del medio, se establecieron los porcentajes poblacionales de cada una de las dos cepas, así como su índice de competición. Los datos se obtuvieron mediante cuatro réplicas independientes

Resultados y Discusión

en cultivo planctónico y resultaron ser totalmente consecuentes con el tiempo de duplicación, corroborando así una marcada reducción del *fitness* en el mutante *nfxB* respecto a su cepa parental.

Transcurridas 24 horas desde la inoculación, el porcentaje poblacional final resultó ser del 95,15 % para la PAO1 y del 4,85 % para el mutante nulo *nfxB* (PAONB). Por tanto el índice de competición de la PAONB frente a la PAO1 resultó ser $5,1 \times 10^{-2}$.

Por otra parte, la competición iniciada entre la PAO1 y el mutante doble *nfxB-mexD* (PAONBMxD) mostró unos porcentajes poblacionales a las 24 horas del 54,56 % y 45,44 % respectivamente, y un índice de competición para el mutante doble frente a la cepa de referencia igual a 0,8.

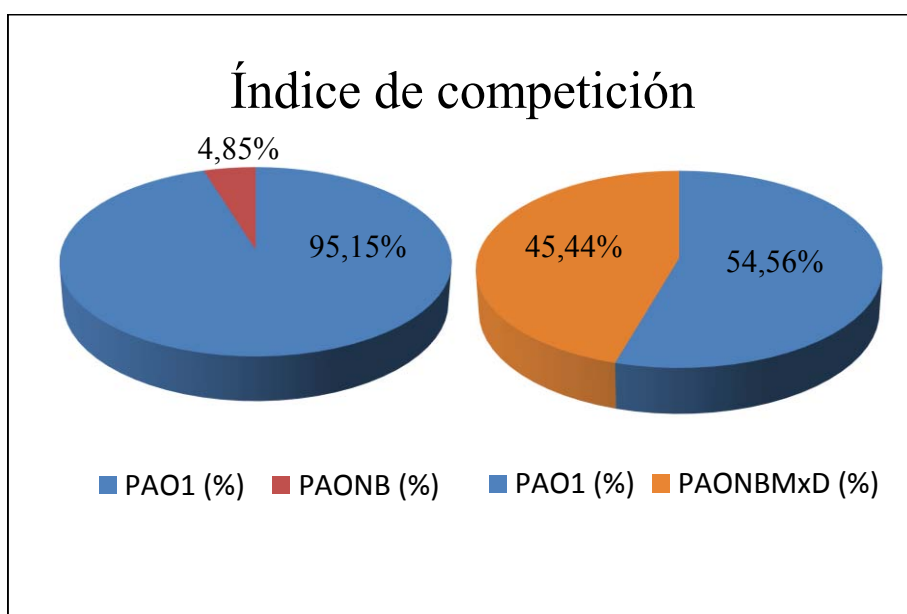


FIGURA 13. Representación gráfica de los índices de competición del mutante simple *nfxB* y el mutante doble *nfxB-mexD* respecto a la PAO1

Estos datos sugieren de nuevo que dicha reducción del *fitness* bacteriano es consecuencia del elevado coste energético que representa la hiperexpresión de MexCD-OprJ, y no de la pérdida en sí de la proteína reguladora NfxB o del propio gen y las posibles interacciones de los mismos a otros niveles. Los resultados aquí expuestos junto con los datos obtenidos en la determinación del tiempo de generación, están en consonancia con trabajos previos que también constatan y describen el coste biológico ligado al lastre metabólico que supone la hiperexpresión de una bomba de expulsión activa o a la expresión de determinantes de resistencia en general (Andersson DI & Levin BR, 1999; Sanchez P *et al*, 2002).

4.2.3. Virulencia del mutante *nfxB*

4.2.3.1. Cuantificación de la resistencia al complemento del suero humano del mutante *nfxB*

De todas las cepas incluidas en este experimento, solamente el mutante PAONB mostró una reducción significativa en la resistencia a la acción bactericida mediada por el complemento al ser comparada con la cepa de referencia PAO1 (véase TABLA 10). Por tanto, de todos los mecanismos de resistencia representados por esta colección de mutantes que incluye la hiperexpresión o supresión de otras bombas, la pérdida de OprD, la supresión de AmpC o bien su hiperproducción constitutiva, sólo la hiperexpresión de MexCD-OprJ a través de la mutación en su regulador negativo *nfxB* confiere sensibilidad al suero humano. Con la intención de confirmar estos resultados, se analizaron los resultados procedentes de las cepas clínicas procedentes de pacientes con fibrosis quística (JW y GPP) juntamente con los datos obtenidos de sus respectivos mutantes isogénicos en el gen *nfxB* creados in vitro (JWNB y GPPNB). Si bien es cierto que ambas cepas ya eran más sensibles al complemento que la PAO1, sus respectivos mutantes *nfxB* creados in vitro resultaron a su vez significativamente más sensibles al complemento q sus cepas parentales (véase TABLA 10).

TABLA 10. Porcentaje de supervivencia al suero humano no inmune y unión de C3 de los diferentes mutantes ensayados

Cepa	% supervivencia en suero humano no inmune	Unión de C3
PAO1	93 ± 2	0,405 ± 0,039
PAONB	36 ± 2	0,890 ± 0,030
PAONBMxD	88 ± 3	0,479 ± 0,021
PAODB	92 ± 4	0,399 ± 0,021
PAOAD	89 ± 4	0,389 ± 0,010
PAOAC	87 ± 1	0,410 ± 0,019
PAOD	88 ± 3	0,478 ± 0,023
PAOM	88 ± 2	0,450 ± 0,054
PAOMxR	89 ± 4	0,379 ± 0,023
PAOMxZ	96 ± 6	0,349 ± 0,013
JW	74 ± 5	0,650 ± 0,029
JWNB	32 ± 3	0,910 ± 0,030
GPP	8 ± 1	1,279 ± 0,050
GPPNB	1 ± 0,3	1,479 ± 0,051

Resultados y Discusión

También se cuantificó mediante ELISA la unión del componente C3 del complemento a esta colección de cepas. Todas las cepas unieron una cantidad similar de C3 respecto a la PAO1 con la excepción de los mutante *nfxB* (PAONB), el cual unió más de dos veces la cantidad de PAO1. Las cepas clínicas JW y GPP mostraron unos valores más elevados que los de la PAO1, no obstante una vez más sus respectivos mutantes *nfxB* unieron todavía más C3 que sus cepas parentales (TABLA 10).

El mutante doble PAONBMxD mostró una clara resistencia a la acción del complemento en comparación con su cepa parental PAONB, con una supervivencia al suero humano similar a la de PAO1. Además también unió una cantidad similar de C3 a la de la PAO1, muy por debajo de la cantidad unida por la PAONB.

Seguidamente se procedió a comprobar si la opsonización observada con el complemento presente en el suero humano también se podía hacer extensiva al fluido broncoalveolar humano. Tras la incubación con el BAL, tal como ya observamos con el suero humano, el mutante PAONB unió el doble de C3 que la cepa de referencia PAO1 y que el mutante doble PAONBMxD (FIGURA 14). Además estos resultados indican que los componentes del sistema del complemento presentes en el fluido broncoalveolar son efectivamente suficientes para desencadenar la opsonización bacteriana.

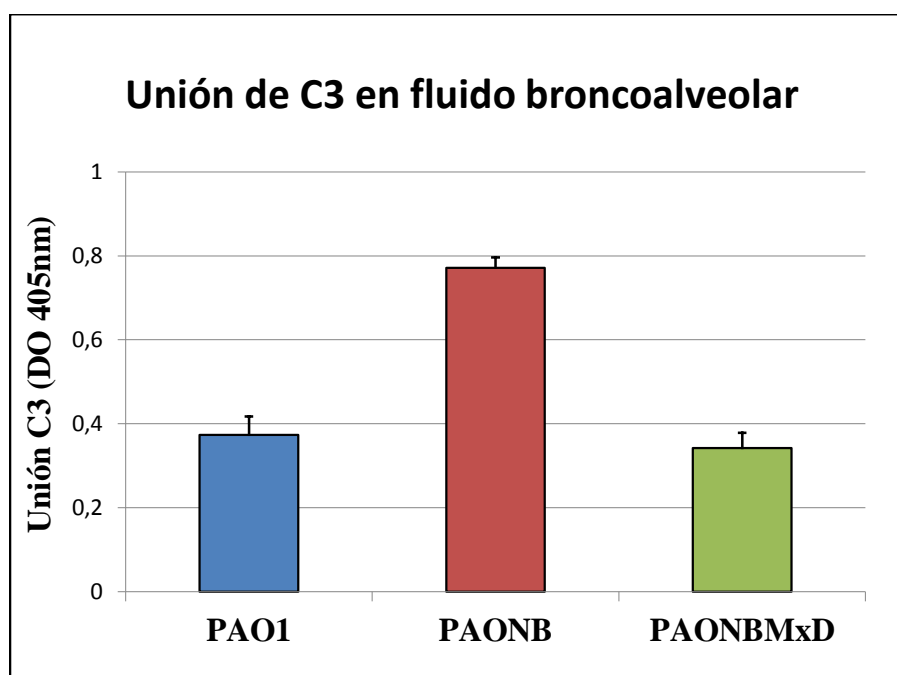


FIGURA 14. Representación gráfica cuantitativa de la unión de C3 en fluido broncoalveolar en mutante simple *nfxB* y el mutante doble *nfxB-mexD* respecto a la PAO1

La evidencia experimental nos sugiere que la adquisición de determinantes de resistencia antimicrobiana suele implicar una reducción de la virulencia en *P. aeruginosa* (Andersson DI & Levin BR, 1999; Hirakata Y *et al*, 2002; Sanchez P *et al*, 2002; Abdelraouf K *et al*, 2011; Olivares J *et al*, 2012). Además, se sabe que la mutación en *nfxB* que conduce a la hiperexpresión de MexCD-OprJ ocasiona cambios globales en la fisiología y metabolismo de *P. aeruginosa*, especialmente en la membrana celular (Stickland HG *et al*,

2010). Los datos aquí presentados muestran como dichos cambios fisiológicos implican una reducción en la virulencia mostrada por el mutante PAONB al unir significativamente más C3 que su cepa parental. Por otra parte, el hecho de que el mutante doble PAONBMxD siga siendo igual de virulento que la cepa silvestre indica inequívocamente que la hipersensibilidad al complemento humano observada en el mutante *nfxB* está íntimamente relacionada con la hiperexpresión de la bomba MexCD-OprJ y su presencia en la membrana celular, más que con alguna otra alteración fisiológica que pueda desencadenar la propia mutación en *nfxB*.

Para finalizar se realizó un inmunoblot para evidenciar la unión entre OprJ y C3 marcado con Infrared Dye 800CW (datos no mostrados) y los resultados indicaron que C3 no es capaz de unirse a OprJ, sugiriendo por tanto, que el incremento de la unión de C3 observado en el mutante *nfxB* debe ser ocasionado por el aumento de expresión de los sitios de unión de C3 o bien por cambios en la accesibilidad de los mismos.

4.2.3.2. Efecto de la hiperexpresión de MexCD-OprJ en el modelo murino de infección pulmonar

Tras la incubación de las placas en las que se sembraron los homogeneizados pulmonares se procedió a su contaje. Tal como cabía esperar atendiendo a los resultados anteriores, la carga bacteriana pulmonar presente en los ratones infectados con las cepas PAO1 y PAONBMxD fueron similares, y significativamente superiores a la carga bacteriana pulmonar presente en los ratones infectados con el mutante *nfxB* (PAONB), tal como se ve en la FIGURA 15.

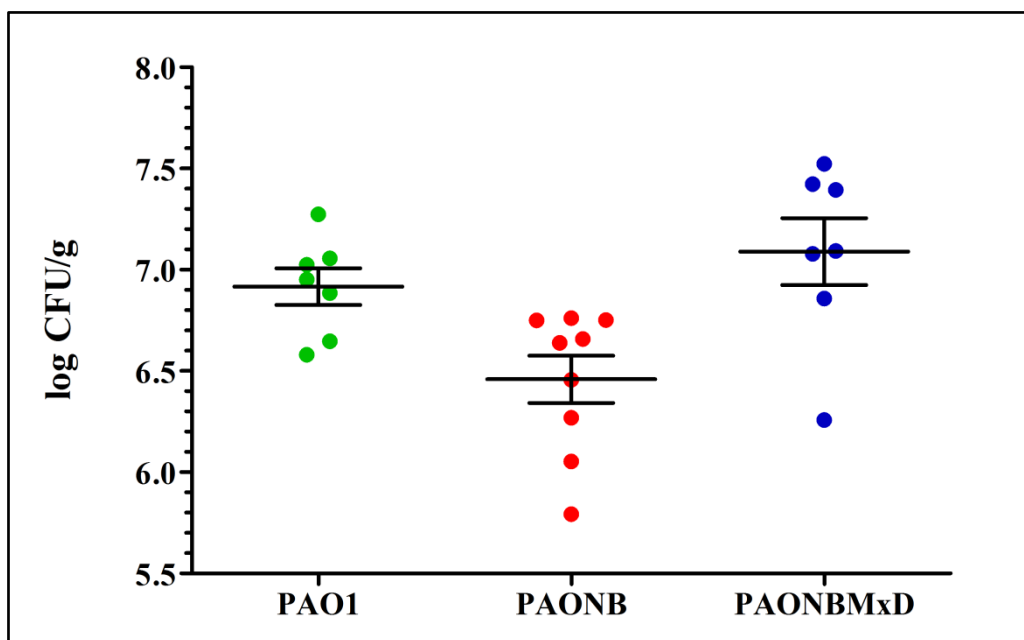


FIGURA 15. Representación gráfica del efecto de la sobreexpresión de MexCD-OprJ en la infección pulmonar por *P. aeruginosa*.

Estos resultados parecen indicar que la hipersensibilidad a la acción del complemento humano en el mutante *nfxB*, observada en experimentos anteriores, incrementa el aclaramiento pulmonar de *P. aeruginosa* en el modelo murino establecido.

Resultados y Discusión

Además dicha hipersensibilidad al complemento local presente en el fluido broncoalveolar, al igual que la observada en suero, depende de la propia hiperexpresión de MexCD-OprJ y no de la inactivación de su gen regulador *nfxB* ya que el mutante doble PAONBMxD (totalmente incapaz de sintetizar el sistema tricomponente) obtuvo unos recuentos en homogeneizado pulmonar similares a los de la cepa de referencia PAO1. No obstante, estos resultados deben ubicarse dentro del contexto de infección aguda ya que en infecciones pulmonares crónicas *P. aeruginosa* es capaz de evadir la respuesta inmune del hospedador mediante otros mecanismos como la producción de alginato y especialmente la formación de biofilms.

4.2.4. Tasa de reversión del fenotipo NfxB

Tras la incubación de las placas de MH con y sin imipenem, se procedió a su conteo. Debido a que el mutante *nfxB* es hipersensible a imipenem, su crecimiento en las placas de imipenem 0,5 µg/mL implicaría, en un principio, el cese de la expresión la bomba y con ello la recuperación del nivel de resistencia basal a imipenem que caracteriza a la cepa silvestre. No obstante, también resulta necesario considerar los posibles mutantes *nfxB* que debido a la exposición al carbapenem hubieran incorporado alguna mutación en *oprD*, ya que dichos mutantes mantendrían la hiperexpresión de MexCD-OprJ y a la vez serían más resistentes a imipenem que la PAONB debido a la pérdida de OprD.

Tras el conteo de las placas de MHA con y sin imipenem se procedió al cálculo de la tasa de mutación preliminar (en este caso, tasa de reversión), usando el software basado en el test de fluctuación elaborado por el Dr. Sniegowski (Gould CV *et al*, 2007).

Seguidamente, las colonias provenientes de las placas con imipenem, fueron estriadas paralelamente en MHA y MHA con ciprofloxacino 0,25 µg/mL para comprobar su sensibilidad a ciprofloxacino. Aproximadamente el 10% de las UFC presentes en las placas con imipenem resultaron ser resistentes a ciprofloxacino 0,25 µg/mL, y por tanto se procedió a investigar el perfil de proteínas de membrana externa de una muestra representativa de ambos fenotipos presentes con la intención de distinguir entre verdaderos revertientes y mutantes PAONB- Δ *oprD*. Tras la extracción con sarcosinato y posterior electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE), se pudo verificar la ausencia de la banda correspondiente a OprD y la presencia de una intensa banda correspondiente a OprJ en las colonias resistentes a imipenem 0,5 µg/mL y ciprofloxacino 0,25 µg/mL (FIGURA 16, carril 5). Por el contrario, en las colonias resistentes a imipenem 0,5 pero sensibles a ciprofloxacino 0,25 µg/mL se verificó la presencia de la banda correspondiente a OprD y la ausencia de la banda correspondiente a OprJ (FIGURA 16, carril 3), asemejando el perfil al de la cepa silvestre PAO1.

Así pues, un 10% de los posibles revertientes resultaron ser mutantes espontáneos en *oprD* que seguían conservando las propiedades del mutante *nfxB*, incluida la resistencia a ciprofloxacino conferida por la hiperproducción de MexCD-OprJ. Atendiendo a esta corrección del 10%, se recalcularon sendas tasas de mutación (véase TABLA 11).

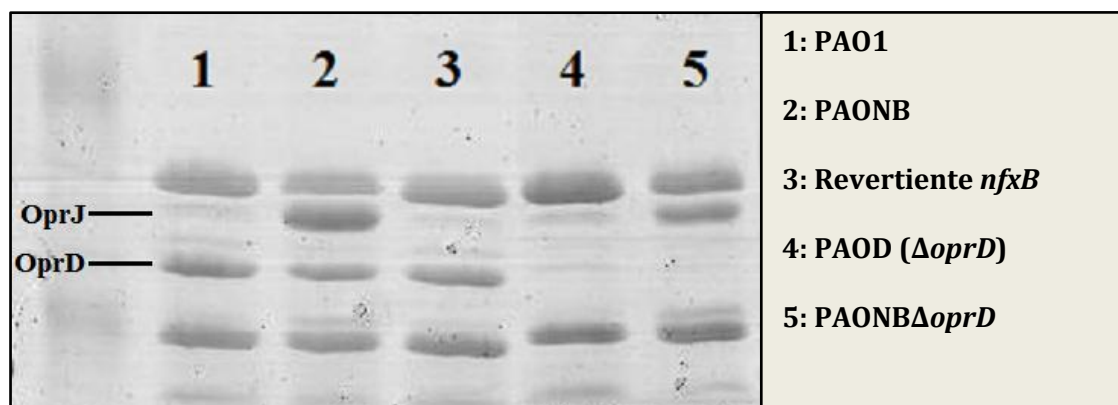


FIGURA 16. Perfil de proteínas de membrana externa del mutante *nfxB*.

Tal como podemos observar, la tasa de mutación en *oprD* en el mutante *nfxB* con imipenem 0,5 µg/mL es similar a la obtenida en trabajos previos con la PAO1 con imipenem 4 µg/mL ($1,8 \times 10^{-8}$) (Moya B *et al*, 2010), solo que en este caso, y debido a la hipersensibilidad a imipenem por parte del mutante *nfxB*, la diferencia reside solamente en la concentración de imipenem a la cual se seleccionan dichos mutantes. No obstante, la tasa de mutación en *oprD* es relativamente baja en comparación a la aparición de una mutación compensatoria que permite revertir el fenotipo *nfxB*, haciéndola prácticamente despreciable.

TABLA 11. Tasa de mutacion en imipenem, tasa de reversión del fenotipo *nfxB* y tasa de mutacion en *oprD*

Cepa	Tasa de mutación IP	Tasa de Reversión	Tasa de mutación <i>oprD</i>
PAONB	$1,22 \times 10^{-7}$	$1,10 \times 10^{-7}$	$1,22 \times 10^{-8}$
PAONBDB	$1,25 \times 10^{-7}$	$1,13 \times 10^{-7}$	$1,25 \times 10^{-8}$

4.2.5. Papel de *nfxB* y MexCD-OprJ en la tasa de mutación espontánea

Trabajos anteriores nos muestran como la hiperexpresión del regulador negativo EmrR de la bomba EmrAB en *E. coli* es capaz de aumentar significativamente la tasa de mutación (Yang H *at al*, 2004). Dicho hallazgo sugiere que la hiperexpresión del represor de la bomba puede dar lugar a una reducción en la excreción y posterior acumulación de compuestos intermediarios (sustratos de EmrAB procedentes de la síntesis y metabolismo de bases púricas y pirimidínicas) que tras rebasar ciertas concentraciones intracelulares límite podrían ejercer cierto efecto mutagénico.

Posteriormente otra publicación en la que se crearon librerías de ADN genómico de *P. aeruginosa* y *Lactococcus lactis* a partir de digestiones aleatorias con la enzima de restricción Sau3AI sugirió que la expresión del gen *nfxB* de *P. aeruginosa* ejerce un efecto

Resultados y Discusión

hipermutador cuando es introducido en *E. coli* mediante un plásmido multicopia (Gabrovsky V *et al*, 2005).

Con el objeto de averiguar si la hiperexpresión de *nfxB* hace extensivo su efecto hipermutador en *P. aeruginosa* mediante una reducción de la detoxificación de compuestos mutagénicos, se procedió a medir la tasa de mutación de la cepa salvaje complementada con el plásmido pUCPNB (ver apartado 3.1, TABLA 4). Además, se añadieron al experimento los mutantes *nfxB* (PAONB) y *mexD* (PAOMxD) complementados con dicho plásmido, para averiguar si el posible efecto hipermutador pudiera estar gobernado por la hiperexpresión de la bomba, por la expresión del propio gen *nfxB*, o bien por su propio efecto biológico (la represión de la expresión de *mexCD-oprJ*).

TABLA 16. Efecto de tanto la hiperexpresión de *nfxB* o MexCD-OprJ como la ausencia de los mismos sobre la tasa de mutación espontánea

Cepa	Tasa de mutación espontánea	IC 95%
PAO1 pUCPNB	$2,80 \times 10^{-9}$	$(1,87 \times 10^{-9} - 4,20 \times 10^{-9})$
PAO1 pUCP24	$2,77 \times 10^{-9}$	$(1,84 \times 10^{-9} - 4,16 \times 10^{-9})$
PAONB pUCPNB	$1,42 \times 10^{-9}$	$(8,09 \times 10^{-10} - 2,59 \times 10^{-9})$
PAONB pUCP24	$3,51 \times 10^{-9}$	$(2,33 \times 10^{-9} - 5,21 \times 10^{-9})$
PAOMxD pUCPNB	$2,11 \times 10^{-9}$	$(1,45 \times 10^{-9} - 3,07 \times 10^{-9})$
PAOMxD pUCP24	$2,65 \times 10^{-9}$	$(1,87 \times 10^{-9} - 3,77 \times 10^{-9})$

Tal como podemos observar en la TABLA 16, las tasas de mutación de resistencia a rifampicina obtenidas, tanto en la cepa salvaje no revelaron ningún efecto hipermutador ocasionado por la sobreexpresión de *nfxB*. De forma análoga, tampoco se observó efecto hipermutador alguno debido a la hiperexpresión de la bomba MexCD-OprJ en la cepa PAONB pUCP24, ni debido a la pérdida funcional del sistema de expulsión activa en la cepa PAOMxD pUCP24.

Aun considerando la ligera diferencia existente entre el valor de la tasa de mutación correspondiente a la cepa PAONB complementada con pUCPNB y los demás valores, el solapamiento de los intervalos de confianza confirma que las diferencias entre ellos no son significativas.

Por tanto, a pesar de que hay indicios de que ciertas bombas de expulsión activa están involucradas en la expulsión de compuestos tóxicos con un posible efecto mutagénico (Burkovski A and Krämer R, 2002; Helling RB *et al*, 2004; Van Dyk TK *et al*, 2004), nuestros datos indican que ni la hiperexpresión ni la deficiencia de tanto la bomba MexCD-OprJ como de su regulador negativo *nfxB* alteran significativamente la tasa de mutación en *P. aeruginosa*. No obstante, como ya hemos visto anteriormente *P. aeruginosa* dispone de diversas bombas de expulsión activa, posiblemente capaces de compensar la ausencia de una de ellas. Por ello, para poder realizar este tipo de aseveraciones resultaría

adecuado disponer de mutantes nulos en las otras bombas que no fueran objeto de estudio para evitar el posible efecto compensatorio.

4.2.6. Contribución de MexCD-OprJ en la resistencia antibiótica en crecimiento en forma de biofilm

De acuerdo con los resultados de este trabajo, el mutante *nfxB* de la PAO1 mostró un aumento en la resistencia a azitromicina en crecimiento en forma de biofilm, con unos porcentajes de supervivencia tras 24 horas de incubación con el antimicrobiano del orden de 1 a 2 logaritmos superiores a los de su cepa parental y a todas las concentraciones ensayadas (de 0,5 a 4 µg/mL).

Tal y como muestra la FIGURA 17, el efecto de la inactivación de *nfxB* en la resistencia antibiótica fue mucho más acusado cuando la incubación de 24 horas se realizó con ciprofloxacino, donde los porcentajes de supervivencia fueron hasta 4 logaritmos superiores a la cepa parental a concentraciones de ciprofloxacino 0,25 y 0,5 µg/mL, y dos logaritmos a concentración 1 µg/mL.

Por otro lado, la inactivación de *mexD* en la PAO1 no conllevó un aumento en la sensibilidad a azitromicina o ciprofloxacino respecto a la PAO1 en crecimiento en forma de biofilm, sugiriendo de nuevo que MexCD-OprJ no juega un papel relevante a menos que el sistema se esté hiperexpresando a través de la mutación en su gen regulador *nfxB*.

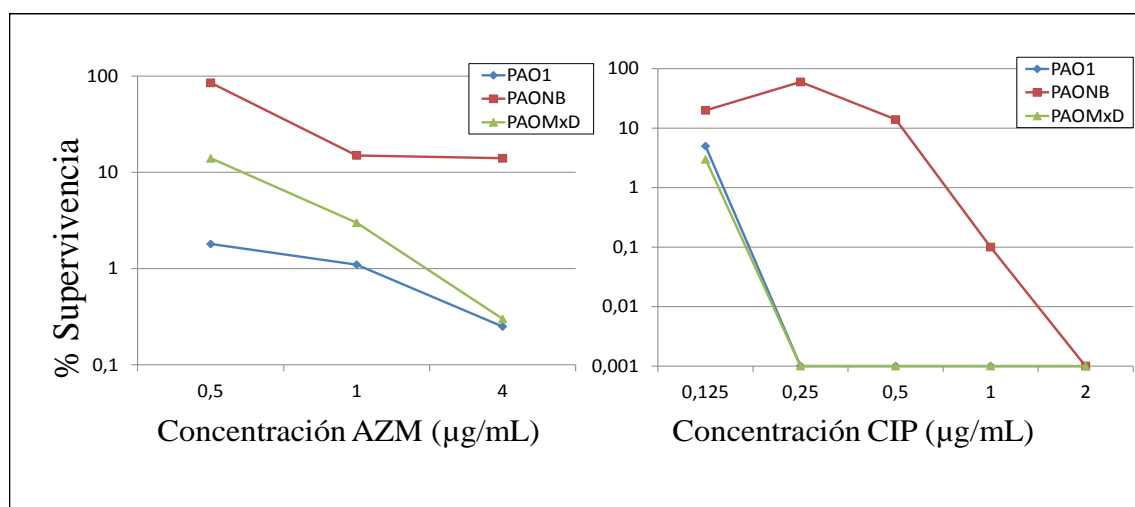


FIGURA 17. Representación gráfica de la contribución de la sobreexpresión de MexCD-OprJ sobre la acción de la azitromicina y el ciprofloxacino en crecimiento en forma de biofilm.

Tal como se puede observar en este experimento, la hiperexpresión de MexCD-OprJ contribuye de forma significativa en la resistencia antibiótica en el seno de un biofilm, y además es capaz de conferir resistencia a azitromicina y ciprofloxacino sin requerir la intervención de otros mecanismos de resistencia específicos como pueden ser la reducción de la permeabilidad celular, la producción de enzimas modificantes, la modificación del ARN ribosomal o la modificación por mutación de las topoisomerasas II y IV.

Resultados y Discusión

Por otro lado, se demuestra que la expresión basal de MexCD-OprJ no juega un papel importante en la resistencia antimicrobiana de *P. aeruginosa*, ya que en ningún caso el mutante nulo *mexD* (PAOMxD), incapaz de expresar la bomba MexCD-OprJ, resulta ser más sensible a ciprofloxacino o azitromicina que la cepa silvestre

4.2.7. Inducibilidad del sistema MexCD-OprJ

Los experimentos de expresión génica con inductores revelaron que tanto con inducción con azitromicina a cualquier concentración, como con ciprofloxacino, no se obtuvo ningún valor de expresión de *mexD* que sobrepasara al del control (PAO1 sin inductor). Estos datos indican que MexCD-OprJ no es una bomba cuya expresión génica pueda verse alterada por la presencia antibióticos sustratos de dicha bomba, sino como indican trabajos anteriores, exclusivamente por compuestos que ocasionan daños en la membrana celular tales como la clorhexidina, el cloruro de benzalconio, etc (Morita Y *et al*, 2003, Fraud S *et al*, 2008) o por mutación en el propio gen regulador *nfxB*.

4.2.8. Análisis del transcriptoma del mutante *nfxB*

El análisis del transcriptoma del mutante *nfxB* respecto a la estirpe silvestre (PAO1) reveló la presencia de 34 genes que significativamente mostraron una expresión modificada respecto a la PAO1. De todos ellos, 24 presentaron una expresión génica aumentada y 10 una expresión disminuida respecto a la PAO1, pero solamente los pertenecientes al operón del propio sistema de expulsión activa, *mexCD-oprJ*, guardan relación directa con la resistencia a antimicrobianos (TABLA 17).

De entre los restantes genes destaca la expresión significativamente aumentada de los genes reguladores de la cadena respiratoria del nitrógeno: *nirF*, *nirC*, *nirM* y *nirS* (reducción de nitritos), *norC*, *norB*, *norD* (reducción de óxido nítrico) y *nosZ* (reducción de óxido nitroso). La cadena respiratoria de nitrógeno permite obtener energía en condiciones de anoxia y sabemos que su regulación es capaz de modular la formación de biofilms, así como la motilidad y la virulencia (Van Alst NE *et al*, 2007).

Los genes *rsaL* y *lasI* también muestran una expresión diferencial aumentada respecto a la PAO1. Ambos genes están directamente relacionados con la regulación global del *quorum sensing* y la virulencia en *P. aeruginosa*, y son capaces de regular la expresión de otros genes para obtener una respuesta biológica compleja coordinada, especialmente en el contexto de las enfermedades crónicas respiratorias como la fibrosis quística (Harmer C *et al*, 2013). También merece la pena destacar la expresión disminuida de los genes *phzS* y *phzB2* (este último de forma más discreta) ya que ambos están involucrados en la biosíntesis de fenazinas en *P. aeruginosa* (Nowroozi J *et al*, 2012). La producción de estas fenazinas como la piocianina, al igual que el cambio de modo de crecimiento de planctónico a biofilm, es un proceso en el que se sabe que el quorum sensing bacteriano juega un papel fundamental.

TABLA 17. Genes con una expresión diferencial significativamente modificada en el mutante *nfxB* y *nfxB-mexD* en relación a la cepa silvestre PA01, usando Affymetrix GenChips.

Locus	Descripción	Expresión relativa a la PA01	
		PAONB	PAONBMxD
PA0024	<i>hemF</i> : coproporphyrinogen III oxidase, aerobic	2,04	1,35
PA0122	conserved hypothetical protein	-2,33	1,27
PA0200	hypothetical protein	2,86	1,44
PA0515	probable transcriptional regulator	1,86	2,03
PA0516	<i>nirF</i> : heme d1 biosynthesis protein NirF	2,16	2,25
PA0517	<i>nirC</i> : probable c-type cytochrome precursor	2,46	2,56
PA0518	<i>nirM</i> : cytochrome c-551 precursor	2,90	3,14
PA0519	<i>nirS</i> : nitrite reductase precursor	2,89	3,20
PA0523	<i>norC</i> : nitric-oxide reductase subunit C	11,45	4,90
PA0524	<i>norB</i> : nitric-oxide reductase subunit B	11,85	4,56
PA0525	probable dinitrification protein NorD	3,99	2,47
PA0918	cytochrome b561	2,71	1,70
PA1431	<i>rsaL</i> : regulatory protein RsaL	2,01	2,24
PA1432	<i>lasI</i> : autoinducer synthesis protein LasI	2,38	1,44
PA1555	probable cytochrome c	-2,88	-1,80
PA1556	probable cytochrome c oxidase subunit	-2,71	-1,71
PA1557	probable cytochrome oxidase subunit (cbb3-type)	-2,85	-2,14
PA1658	conserved hypothetical protein	-2,11	-1,03
PA3205	hypothetical protein	-2,03	-1,98
PA3361	<i>lecB</i> : fucose-binding lectin PA-III	-2,79	1,31
PA3392	<i>nosZ</i> : nitrous-oxide reductase precursor	3,12	2,36
PA3790	<i>oprC</i> : Putative copper transport outer membrane porin OprC precursor	-2,21	-1,92
PA3813	<i>iscU</i> : probable iron-binding protein IscU	2,25	-1,12
PA3873	<i>narJ</i> : respiratory nitrate reductase delta chain	1,15	2,35
PA3874	<i>narH</i> : respiratory nitrate reductase beta chain	-1,13	2,05
PA3875	<i>narG</i> : respiratory nitrate reductase alpha chain	-1,21	3,36
PA3876	<i>narK2</i> : nitrite extrusion protein 2	-1,17	2,95
PA3877	<i>narK1</i> : nitrite extrusion protein 1	-1,18	4,09
PA3915	<i>moaB1</i> : molybdopterin biosynthetic protein B1	1,15	3,02
PA4133	cytochrome oxidase subunit (cbb3-type)	-2,33	1,07

Resultados y Discusión

PA4141	hypothetical protein	-1,42	2,63
PA4211	<i>phzB2</i> : probable phenazine biosynthesis protein	-1,53	2,04
PA4217	<i>phzS</i> : flavin-containing monooxygenase	-2,20	1,90
PA4385	<i>groEL</i> : GroEL protein	2,28	1,62
PA4386	<i>groES</i> : GroES protein	3,09	2,48
PA4596	probable transcriptional regulator (<i>esrC</i>)	1,87	2,37
PA4597	<i>oprJ</i> : Multidrug efflux outer membrane protein OprJ precursor	5,53	1,07
PA4598	<i>mexD</i> : Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) multidrug efflux transporter MexD	7,29	-1,30
PA4599	<i>mexC</i> : Resistance-Nodulation-Cell Division (RND) multidrug efflux membrane fusion protein MexC precursor	11,00	4,68
PA4687	<i>hitA</i> : ferric iron-binding periplasmic protein HitA	2,25	1,23
PA4918	hypothetical protein	2,06	1,03
PA4919	<i>pncB1</i> : nicotinate phosphoribosyltransferase	2,55	1,11
PA4920	<i>nadE</i> : NH ₃ -dependent NAD synthetase	2,14	1,26
PA5015	<i>aceE</i> : pyruvate dehydrogenase	2,01	1,31

El gen PA4596 muestra una expresión aumentada en torno a dos veces respecto a la PA01 tanto en la PAONB como en el mutante doble PAONBMxD. Trabajos muy recientes afirman que ese gen es un homólogo de *nfxB* y actúa como un represor secundario de la expresión de *mexCD-oprJ* y su propia expresión se ve inducida sólo en condiciones de estrés de membrana dependiente de AlgU (Purssell A *et al*, 2014). Según este trabajo la inactivación de este gen en un mutante *nfxB* no incrementa todavía más la expresión de *mexCD-oprJ* en ausencia de estrés de membrana. PA4596 (renombrado *esrC*) se encuentra corriente abajo de *oprJ* y posee un 60% de identidad y 76% de similitud con *nfxB*. Al parecer la expresión de este gen podría ser útil como moderador de la expresión de *mexCD-oprJ* en condiciones de inducción por daño en la membrana. En nuestro experimento, tal como se observa en el citado trabajo, la mutación en *nfxB* indujo la expresión de PA4549 como un posible mecanismo moderador. No obstante hacen falta más estudios para poder relacionar la expresión de este gen con la inactivación de *nfxB* o bien con la presencia de la bomba de expulsión en la membrana, ya que el mutante doble PAONBMxD, incapaz de ensamblar la el sistema tricomponente también vio aumentada la expresión de dicho gen.

Por otro lado, el análisis transcriptómico del mutante nulo *nfxB-mexD* (PAONBMxD) mostró 22 genes con una expresión significativamente modificada respecto a la PA01. De ellos, 21 genes presentaron una expresión aumentada y 1 mostró una expresión disminuida respecto a la cepa silvestre. De los genes que ven aumentada su expresión en el mutante doble PAONBMxD destacan de nuevo los genes responsables de la cadena respiratoria de nitrógeno así como también el gen *rsaL*. Como se ha mencionado antes, *rsaL* es un regulador global de la expresión genética en *P. aeruginosa*, además de un

modulador de la virulencia y del crecimiento en forma de biofilm (Rampioni G *et al*, 2007 y 2009), lo cual podría sugerir que NfxB tuviera su función en la regulación del *quorum sensing* además de reprimir la expresión de *mexCD-oprJ*, ya que al expresarse diferencialmente en el mutante doble, no guardaría relación con la propia expresión de la bomba MexCD-OprJ.

Por todo ello, la alteración de la expresión de estos genes reguladores sugiere que *nfxB* o bien su inactivación, ciertamente puedan incidir en la regulación del *quorum sensing* bacteriano, quizá, como sugieren trabajos muy recientes, a través de VqsM y LasI (Liang H *et al*, 2014). No obstante hay que tener en cuenta que para hacer aseveraciones de este tipo haría falta confirmar y cuantificar individualmente y de forma más precisa todos estos valores de expresiones génicas diferenciales ya que los valores obtenidos, en algunos casos, distan poco de ser considerados como no significativos (dos veces más o dos veces menos que la cepa silvestre PAO1).

En cualquier caso no se observó la modificación de la expresión de ningún gen involucrado en la resistencia antibiótica en la PAONB ni en la PAONBMxD, como pudiera ser *ampC*, *oprD* u otra bomba de expulsión activa. Así, estos resultados sugieren que el mutante *nfxB* no debe su fenotipo hipersensible a cambios en la regulación transcripcional.

4.2.9. Efecto de la inactivación del gen *nfxB* en las cepas clínicas GPP y JW

Las CMI de sendos mutantes *nfxB* consatruídos in vitro a partir de las cepas clínicas GPP y JW mostraron una clara disminución para los antibióticos ceftazidima, cefotaxima, piperacilina/tazobactam, aztreonam, imipenem y tobramicina, y un aumento para los antibióticos sustratos de MexCD-OprJ, ciprofloxacino y cefepima, tal y como ocurre en el mutante nulo *nfxB* de la PAO1. Así, la inactivación de *nfxB* en dos cepas clínicas (GPP y JW) reveló que el fenotipo observado en la PAONB no es un fenómeno dependiente o específico de la PAO1.

TABLA 18. Efecto de la inactivación de *nfxB* sobre el perfil de sensibilidad en cepas clínicas

Cepa	CMI (µg/mL)								
	CAZ	FEP	CTX	PTZ	ATM	IP	MER	CIP	TOB
PAO1	1,5	1,5	8	2	2	1,5	0,38	0,094	1
JW	1,5	3	16	4	4	1,5	0,25	0,125	1
JWNB	1	32	8	3	1,5	0,38	0,19	1,5	0,38
GPP	1	2	12	3	2	1	0,125	0,125	1
GPPNB	0,75	8	4	1,5	0,5	0,25	0,125	1,5	0,25

4.3. Interacción entre el sistema MexCD-OprJ y otros mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa*

4.3.1. Reversión de la resistencia de alto nivel a betalactámicos mediada por la mutación en *dacB* (PBP4)

La inactivación del gen *nfxB* en el mutante simple *dacB*, hiperproductor de AmpC ocasionó una reversión de la resistencia de alto nivel a betalactámicos y monobactámicos hasta alcanzar los niveles de la cepa salvaje PAO1 (ver TABLA 19). Como podemos observar, la CMI de ceftazidima del mutante PAODB se redujo drásticamente de 24 µg/mL a 1,5 µg/mL al inactivar conjuntamente el gen *nfxB* (PAONBDB). De forma análoga, la CMI de piperacilina/tazobactam disminuyó de 48 µg/mL a 3 µg/mL, la de aztreonam bajó de 12 µg/mL a 0,5 µg/mL, etc.

La complementación del mutante doble PAONBDB con el gen *nfxB* salvaje (vehiculizado en el plásmido pUCPNB) restauró por completo el perfil de resistencia a betalactámicos de alto nivel del mutante simple PAODB (ver TABLA 19).

De la misma forma que la inactivación de *mexD* en la PAONB restaura el fenotipo salvaje en el mutante *nfxB*, la inactivación de *mexD* en el mutante doble *nfxB-dacB* (PAONBDBMxD) restauró por completo el fenotipo hiperproductor de AmpC del mutante simple PAODB (véase TABLA 19).

TABLA 19. Efecto de la inactivación de *nfxB* sobre el perfil de resistencia del mutante *dacB* (PBP4)

Cepa	CMI (µg/mL)								
	CAZ	FEP	CTX	PTZ	ATM	IP	MER	CIP	TOB
PAO1	1,5	1,5	8	2	2	1,5	0,38	0,094	1
PAODB	24	12	>256	48	12	1,5	0,5	0,094	1
PAONBDB	1,5	6	24	3	0,5	0,125	0,19	1,5	0,25
PAONBDBMxD	24	12	>256	48	12	1,5	0,5	0,094	1
PAONBDB pUCPNB	24	12	>256	48	12	1,5	0,5	0,094	1

Como podemos observar, la hiperexpresión de MexCD-OprJ mediada por la inactivación de su gen represor *nfxB*, no solamente conduce a la hipersensibilidad a betalactámicos en la cepa silvestre, sino que es capaz de anular por completo el principal mecanismo de resistencia de alto nivel a betalactámicos en *P. aeruginosa*, como es la desrepresión total de la expresión de AmpC por mutación en la PBP no esencial DacB (Moyá B *et al*, 2009).

4.3.2. Efecto de la inactivación de *nfxB* sobre la expresión constitutiva de AmpC y su inducibilidad

Tras observar la sorprendente reducción en las CMI de betalactámicos en el mutante PAONBDB, resulta lógico relacionar este fenómeno con una disminución de la

expresión de *ampC* o *creD*. Tras la cuantificación por PCR a tiempo real de la expresión de sendos genes, se observó que ni el mutante simple PAONB ni el mutante doble PAONBDB mostraron cambios transcripcionales en esos genes respecto a sus cepas parentales tanto en condiciones basales como en condiciones de inducción con imipenem 0,015 µg/mL.

TABLA 20. Efecto de la inactivación de *nfxB* sobre la expresión basal e inducida de AmpC

Cepa	ARN _m <i>ampC</i>	
	Basal	Inducción
PAO1	1	19 ± 5,5
PAONB	1,2 ± 0,2	27 ± 6,5
PAONBMxD	0,8 ± 0,1	13 ± 2,0
PAODB	49 ± 9,5	72 ± 26
PAONBDB	25 ± 5,4	58 ± 6,3

Adicionalmente también se midió la expresión de *creD* y tampoco se observaron cambios transcripcionales (datos no mostrados). Así pues, los mutantes *nfxB* parecen seguir manteniendo la inducibilidad del sistema *ampC*, y este fenómeno se hace especialmente patente en el mutante doble PAONBDB, cuyos los niveles de expresión de *ampC* superan aproximadamente 25 veces los niveles de la PAO1, a pesar de exhibir un fenotipo hipersensible a betalactámicos. Por tanto, necesariamente debe estar involucrado un mecanismo postranscripcional que explique el fenotipo NfxB y su hipersensibilidad a betalactámicos y aminoglucósidos.

4.3.3. Alteración de la expulsión intrínseca mediada por bombas de expulsión activa en los fenotipos NfxB

4.3.3.1. Cuantificación de la expresión génica de los principales sistemas de expulsión activa en *P. aeruginosa*

Como se ha mencionado anteriormente, MexAB-OprM y MexXY-OprM son sistemas de expulsión activa intrínsecos y por tanto van a contribuir en el perfil de resistencia de *P. aeruginosa*. Así, ante la expresión desreprimida de *mexCD-oprJ*, una disminución de expresión génica de dichos sistemas como mecanismo compensatorio o una disminución en la posterior traducción proteica podría proporcionar una explicación plausible para la hipersensibilidad que experimenta el mutante PAONB, tal como sugieren varios trabajos previos (Gotoh N *et al*, 1998, Jeannot K *et al*, 2008).

Se procedió a cuantificar el ARNm de los genes *mexD*, *mexB*, *mexY*, *mexF* y *oprM* en el mutante PAONB y tal como se aprecia en la TABLA 21 no se apreciaron diferencias significativas (a excepción del gen *mexD*) en la expresión relativa de estos genes respecto a la PAO1.

Así pues, de haber alguna disminución de la actividad de MexAB-OprM o MexXY-OprM que pudiera explicar el fenotipo de la PAONB, ésta sería debida a mecanismos postranscripcionales.

Resultados y Discusión

TABLA 21. Efecto de la inactivación de *nfxB* sobre la expresión de otras bombas de expulsión en *P. aeruginosa*

Gen	Expresión génica relativa a PAO1
	PAONB
<i>mexD</i>	148,7 ± 21,60
<i>mexB</i>	1,03 ± 0,21
<i>mexY</i>	1,17 ± 0,19
<i>mexF</i>	1,48 ± 0,21
<i>oprM</i>	1,81 ± 0,29

4.3.3.2. Perfil de proteínas de membrana externa

Tras averiguar que la transcripción de los genes que codifican para los otros sistemas de expulsión activa en *P. aeruginosa* no se ve alterada en el mutante *nfxB*, se procedió a la determinación de su perfil de proteínas de membrana externa en busca de alteraciones postranscripcionales derivadas de la hiperexpresión de MexCD-OprJ.

Tal como se puede apreciar en el gel de poliacrilamida, existe una reducción en la cantidad total de OprM por parte del mutante PAONB respecto a la PAO1, lo cual podría explicar la hipersensibilidad a betalactámicos y aminoglucósidos observada (ver FIGURA 18).

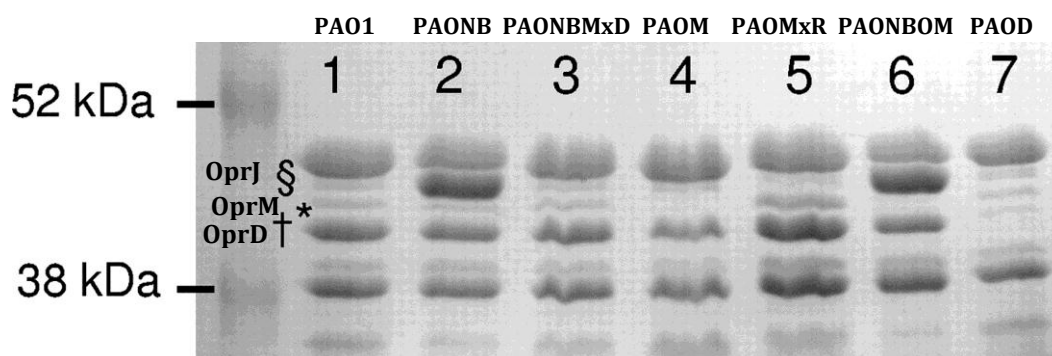


FIGURA 18. SDS-PAGE. Efecto de la inactivación de *nfxB* sobre el perfil de proteína de membrana externa.

No obstante, así como la inactivación de *oprM* en la PAO1 (PAOM) se tradujo en una bajada de las CMI de todos los antibióticos ensayados (a excepción del imipenem), la misma inactivación en el mutante PAONB (PAONBOM) no produjo ninguna alteración significativa en el perfil de resistencia, indicando así que la actividad OprM ya era prácticamente nula en el mutante simple PAONB (ver TABLA 22). De forma análoga, la inactivación de *oprM* en la cepa PAONBDB (PAONBDBOM) tampoco produjo cambio alguno en el perfil de sensibilidad del mutante doble, indicando nuevamente que la actividad de OprM ya era prácticamente nula en el mutante doble PAONBDB (véase TABLA 22).

La disminución de la producción de OprM en el mutante PAONB sí explica la hipersensibilidad a tobramicina (sustrato de MexXY-OprM) y podría proporcionar una explicación razonable a la hipersensibilidad a ceftazidima, cefotaxima, aztreonam, piperacilina/tazobactam y meropenem (todos ellos sustratos de MexAB-OprM) de acuerdo con previas aseveraciones (Gotoh N *et al*, 1998, Jeannot K *et al*, 2008). No obstante en ningún caso proporcionaría explicación a la hipersensibilidad a imipenem que experimenta cualquier mutante *nfxB* (CMI = 0,094 µg/mL), ya que la inactivación de OprM en la PAO1 prácticamente no afectó al nivel de resistencia a imipenem (CMI = 1 µg/mL en el mutante simple *oprM*, frente a 1,5 µg/mL en la PAO1). Dicha observación corrobora previos trabajos que concluyen que el imipenem no es sustrato ni de MexAB-OprM ni de MexXY-OprM (Nakae T *et al*, 1999).

TABLA 22. Inactivación de *oprM* en el mutante *nfxB* y su repercusión en el perfil de sensibilidad

Cepa	CMI (µg/mL)								
	CAZ	FEP	CTX	PTZ	AT	IP	MER	CIP	TOB
PAO1	1,5	1,5	8	2	2	1,5	0,38	0,094	1
PAONB	0,5	6	3	1,5	0,38	0,094	0,125	1,5	0,25
PAODB	24	12	>256	48	12	1,5	0,5	0,094	1
PAONBDB	1,5	6	24	3	0,5	0,125	0,19	1,5	0,25
PAOM	0,5	0,25	1	0,125	0,125	1	0,094	0,008	0,25
PAONBOM	0,5	6	3	2	0,125	0,094	0,125	1,5	0,19
PAODBOM	24	12	>256	24	8	1,5	0,25	0,008	0,25
PAONBDBOM	1,5	6	24	2	0,5	0,125	0,19	1,5	0,19

Por otro lado, la inactivación de *oprM* en el mutante simple *dacB* (PAODBOM) no consiguió restaurar la sensibilidad hasta los niveles wild type de la PAO1, tal como se observa en el mutante doble PAONBDB (véase TABLA 22). Así pues, el equilibrio entre los diferentes sistemas de expulsión activa no parece estar involucrado en la reversión de la resistencia de alto nivel a betalactámicos observada previamente en el mutante doble PAONBDB.

Adicionalmente, tal como muestra la FIGURA 18, la expresión y posterior traducción de OprD en el mutante *nfxB* no está alterada respecto a la PAO1, y por tanto tampoco se puede explicar la hipersensibilidad a imipenem en base a un aumento en la expresión de esta porina.

4.3.4. Expresión de Proteínas Fijadoras de Penicilina (PBP) en el mutante *nfxB*

Tal como se muestra en la FIGURA 19, el perfil de Proteínas Fijadoras de Penicilina (PBP) del mutante *nfxB* no reflejó diferencia alguna en relación a la PAO1.

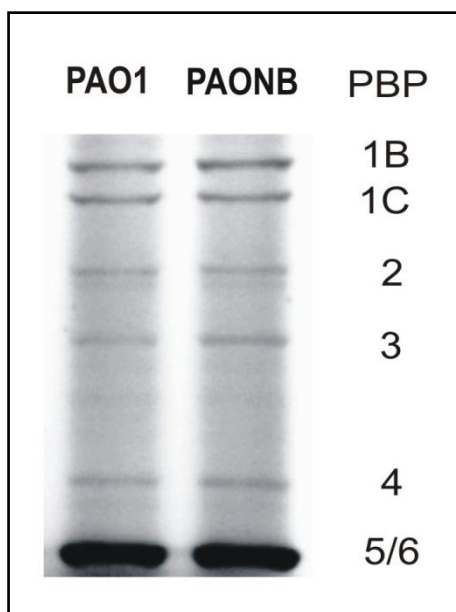


FIGURA 19. Perfil de proteínas fijadoras de penicilina (PBP) en el mutante *nfxB*

Por tanto, estos resultados en conjunción con los datos anteriores, indican que en el mecanismo de hipersensibilidad a imipenem en el mutante *nfxB* no se ven involucradas alteraciones cualitativas o cuantitativas de las bombas de expulsión activa, así como tampoco la alteración de OprD, o la modificación de las PBP.

4.3.5. Alteración de la fisiología de la betalactamasa de AmpC en los mutantes *nfxB*

La relación entre AmpC y los fenotipos *nfxB* ha sido controvertida durante años (Masuda N *et al*, 2001; Wolter DJ *et al*, 2005; Lister PD *et al*, 2009). Tal como se muestra en este trabajo, el mutante *nfxB* no ve reducida la expresión de *ampC* y además, ésta sigue siendo altamente inducible en presencia de imipenem a concentración 0,015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e hiperexpresable por mutación en *dacB*, en contraste con trabajos previos (Masuda N *et al*, 2001).

De forma análoga a la expresión de *ampC*, la actividad betalactamasa en el extracto crudo sonicado no se vio significativamente modificada en los mutantes *nfxB* respecto a su cepa parental. Al igual que la actividad basal, la actividad inducida tampoco experimentó variaciones significativas en dichos mutantes (ver TABLA 23). A priori, estos resultados parecen apoyar trabajos previos que concluyen que AmpC no está involucrado en la hipersensibilidad a betalactámicos observada en el mutante *nfxB* (Wolter DJ *et al*, 2005; Lister PD *et al*, 2009), no obstante nuestro análisis de la actividad betalactamasa en periplasma y en medio extracelular (sobrenadante) nos ha permitido llegar a conclusiones muy diferentes.

El mutante *nfxB* mostró una disminución significativa de la actividad betalactamasa periplasmática respecto a sus cepas parentales y dicha disminución se hizo extensiva tanto a la actividad de AmpC en estado basal (constitutiva), como en condiciones de inducción con imipenem (TABLA 23).

TABLA 23. Expresión de *ampC* y actividad β -lactamasa basales y en condiciones de inducción, en extracto crudo, sobrenadante y extracto periplasmático de los mutantes *nfxB*.

Cepa	ARNm <i>ampC</i>		Actividad β -lactamasa ^a					
	Basal	Inducción	Extracto crudo		Extracto periplásmico		Sobrenadante	
			Basal	Inducción	Basal	Inducción	Basal	Inducción
PAO1	1	19 ± 5,5	164 ± 36 (16 ± 5,9)	4714 ± 1473 (353 ± 247)	34 ± 5,1 (9,5 ± 2,6)	590 ± 231 (210 ± 76)	ND ^b	228 ± 135 (296 ± 176)
PAONB	1,2 ± 0,2	27 ± 6,5	148 ± 40 (13 ± 1,8)	7526 ± 1269 (625 ± 391)	13 ± 4,2 (4,5 ± 1,7)	102 ± 25 (33 ± 17)	ND	975 ± 345 (1365 ± 483)
PAONBMxD	0,8 ± 0,1	13 ± 2,0	227 ± 33 (28 ± 7,5)	4189 ± 346 (451 ± 279)	37 ± 8,6 (13 ± 7,3)	428 ± 85 (150 ± 49)	ND	326 ± 243 (359 ± 267)
PAOdB	49 ± 9,5	72 ± 26	8949 ± 2911 (875 ± 254)	13278 ± 3031 (1006 ± 477)	2087 ± 495 (532 ± 114)	3525 ± 442 (745 ± 364)	213 ± 77 (256 ± 92)	1124 ± 576 (1574 ± 806)
PAONBdB	25 ± 5,4	58 ± 6,3	6924 ± 2635 (878 ± 470)	15746 ± 5371 (1709 ± 437)	131 ± 20 (50 ± 19)	361 ± 67 (116 ± 68)	1210 ± 234 (1573 ± 304)	1850 ± 817 (2590 ± 1138)

^a Los resultados representan picomoles de nitrocefin hidrolizado por minuto y miligramo de (actividad betalactamasa cruda y en periplasma) o por mililitro (actividad betalactamasa en sobrenadante). Los niveles de actividad betalactamasa (expresada en picomoles de nitrocefin hidrolizado por minuto) por 10⁹ UFC se muestran entre paréntesis

Resultados y Discusión

Al comparar la actividad de AmpC periplasmática en condiciones de inducción con imipenem (FIGURA 20A, TABLA 23) y en condiciones de desrepresión constitutiva (FIGURA 20B) de los mutantes *nfxB* respecto a su cepa parental, se aprecia una disminución significativa de la actividad betalactamasa y dicha disminución solo se observa en fase exponencial tanto temprana como tardía, pero no en fase estacionaria.

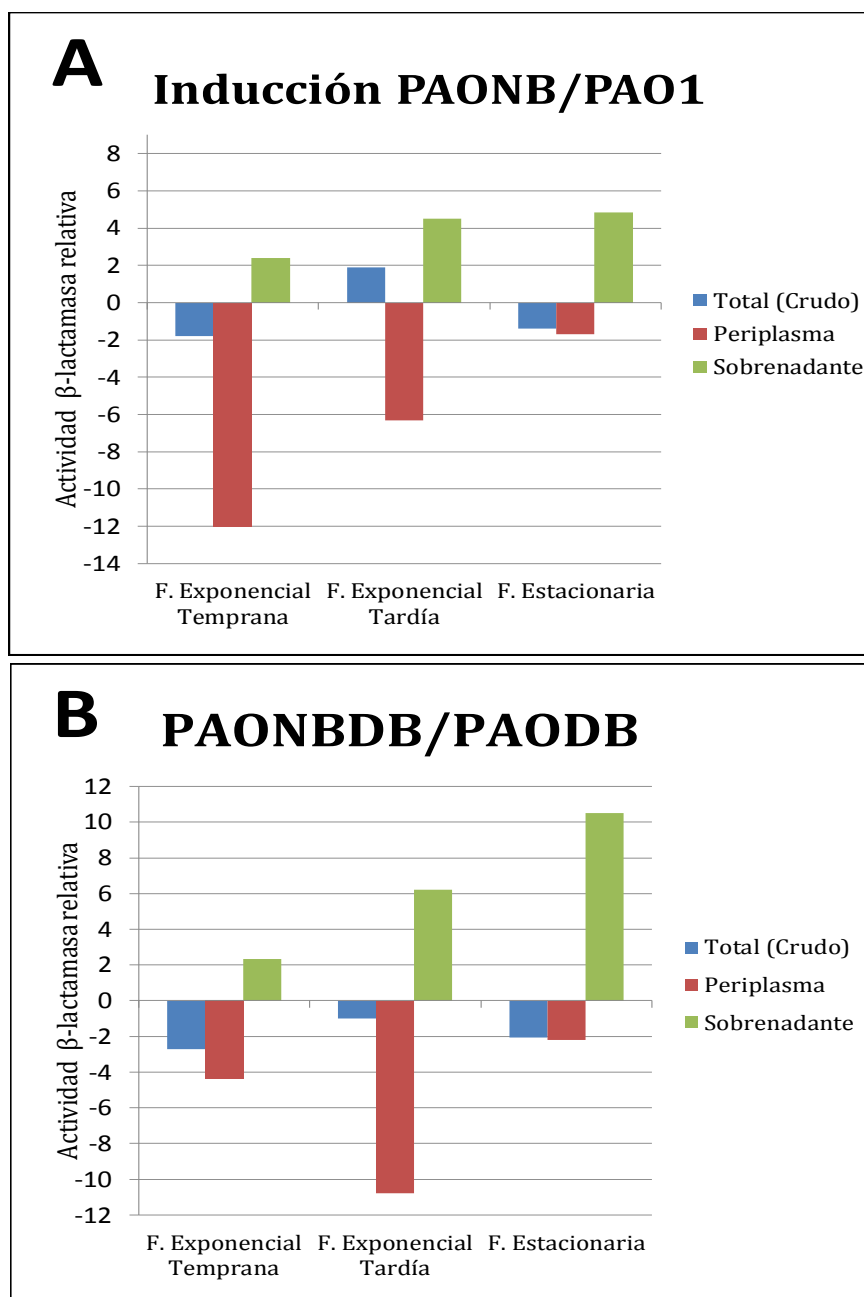


FIGURA 20. Efecto de la inactivación de *nfxB* sobre la actividad betalactamasa total, en periplasma y en sobrenadante, tanto en condiciones de inducción (A) como hiperproducción constitutiva (B).

El espacio periplásmico es el lugar donde se espera que AmpC se acumule para proteger la dianas terapéuticas de los antibióticos betalactámicos (las PBP esenciales) y precisamente la ausencia de AmpC en ese compartimento proporciona la explicación a la hipersensibilidad del mutante *nfxB*. Además la fase exponencial de crecimiento es el

momento en el que mayor división celular existe y por tanto, el momento dónde dichos antibióticos actúan ejerciendo su actividad sobre la pared celular.

Así pues, estos hallazgos finalmente proporcionan la explicación de la hipersensibilidad a imipenem en el mutante *nfxB* y la reversión de la resistencia debida a la mutación en *dacB* (PBP4) en el mutante doble *nfxB-dacB*.

TABLA 24. Efecto de la inactivación de *ampC* en el mutante *nfxB*

Cepa	CMI		
	CAZ	IP	CIP
PAO1	1,5	1,5	0,094
PAOAC	0,75	0,25	0,094
PAONB	0,5	0,094	1,5
PAONBAC	0,5	0,094	1,5

Además, los datos de sensibilidad (TABLA 24) del mutante simple *ampC* de la PAO1 y el mutante doble *nfxB-ampC* apoyan los resultados obtenidos, de los que se puede extraer que en el mutante *nfxB* AmpC no desempeña su función correctamente. Es más, el hecho de que no esté en el lugar adecuado a priori parece equivaler al efecto biológico de no producir AmpC. Así, el mutante *ampC* de la PAO1 muestra una dramática reducción de la CMI de imipenem (potente inductor de AmpC a pesar de sólo ser parcialmente hidrolizable dicha betalactamasa) y sin embargo no muestra una reducción en las CMI de los otros betalactámicos antipseudomónicos (débiles inductores de AmpC, a pesar de ser eficientemente hidrolizados). Por otro lado, la inactivación de *ampC* en el mutante *nfxB* no conllevó una disminución todavía más acusada de la CMI de imipenem, lo cual indica que en el mutante simple *nfxB* la actividad de AmpC ya se ve totalmente comprometida.

Subsiguientes análisis de los datos obtenidos revelan que tanto en el mutante simple *nfxB* en condiciones de inducción, como en el mutante doble *nfxB-dacB* (cuya producción de AmpC está desreprimida) muestran una actividad betalactamasa en sobrenadante significativamente mayor que sus cepas parentales (FIGURA 20A y 20B). Para el mutante simple *nfxB* este aumento observado es de 2 veces más que la cepa parental en fase exponencial temprana, aumentando hasta 5 veces más en fase estacionaria. Para el mutante doble *nfxB-dacB* el incremento de la actividad en sobrenadante aumenta desde 2 veces más que la cepa parental en fase exponencial temprana, 6 veces más en fase exponencial tardía, y hasta 10 veces más que la cepa parental en fase estacionaria. Estos datos sugieren que en el fenotipo *nfxB* no está involucrado ningún mecanismo de regulación postranscripcional relacionado con AmpC que implique un déficit en la exportación de dicha proteína al espacio periplásmico, sino más bien un aumento de la permeabilidad de la membrana externa debida a la hiperexpresión de MexCD-OprJ que permite que AmpC sufra una difusión hacia el exterior de la célula acumulándose al medio extracelular.

En conclusión, estos resultados indican que la hipersensibilidad a betalactámicos descrita en el mutante *nfxB* (Gotoh N *et al*, 1998; Jeannot K *et al*, 2008; Masuda N *et al*,

Resultados y Discusión

2001) ocurre exclusivamente a nivel postranscripcional y depende de la presencia física de la bomba de expulsión activa en la membrana y no de la inactivación de su regulador NfxB. Además, en contraste con trabajos previos (Masuda N *et al*, 2001; Wolter D J *et al*, 2005; Lister PD *et al*, 2009), en este patrón de hipersensibilidad sí se ve involucrado AmpC aunque no su inducibilidad, sino más bien su ubicación debido a la permeabilización de la propia betalactamasa hacia el exterior celular dejando desprotegidas las PBP.

4.3.6. Actividad de los antibióticos betalactámicos sobre los biofilms formados por el mutante *nfxB*

A priori parece razonable deducir que la permeabilización hacia el espacio extracelular que experimenta AmpC en el mutante *nfxB* es una desventaja ya que compromete seriamente la capacidad de dicha betalactamasa para proteger las PBPs. Pero probablemente al considerar un biofilm, dónde una comunidad bacteriana relativamente organizada está embebida en una matriz polimérica, dicha desventaja puede tornarse favorable si AmpC pudiera acumularse en dicha matriz ofreciendo protección comunitaria frente a los antibióticos betalactámicos.

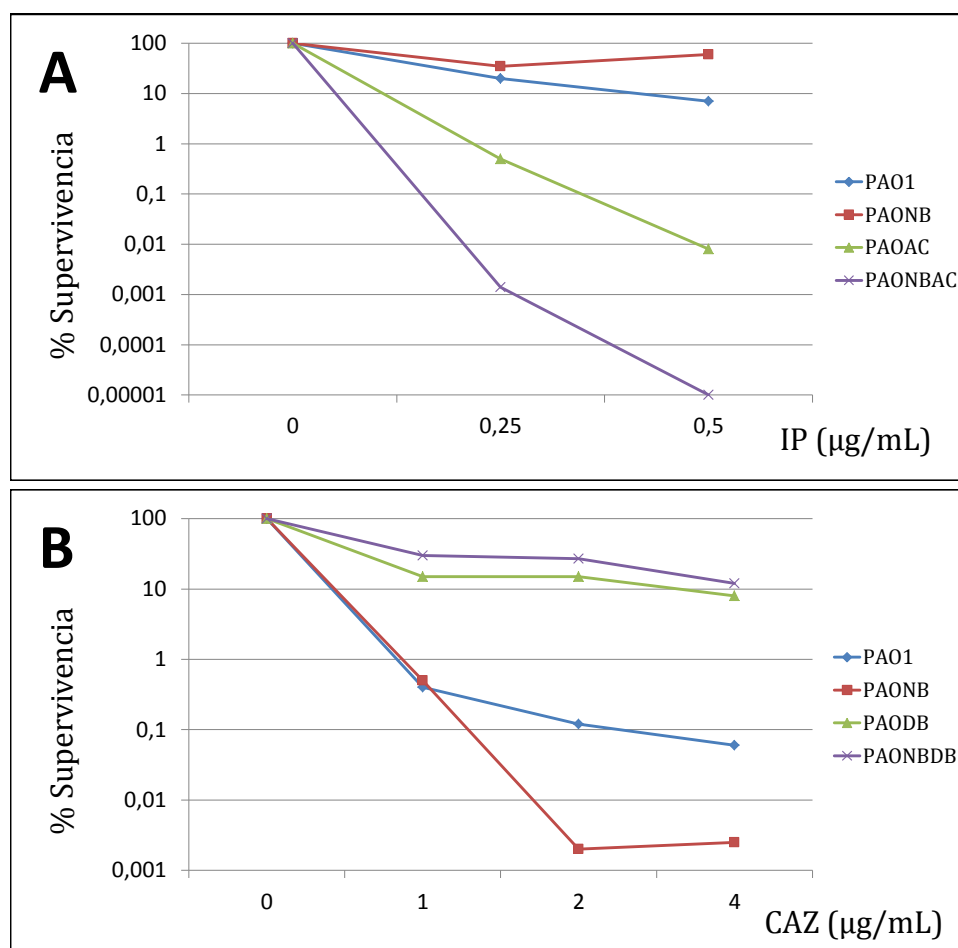


FIGURA 21. Actividad del imipenem sobre los biofilms de PAO1 y los mutantes *nfxB*, *ampC* y *nfxB-ampC* (A). Actividad de la ceftazidima sobre los biofilms de PAO1 y los mutantes *nfxB*, *dacB* y *nfxB-dacB* (B) después de 24 horas de incubación a diferentes concentraciones del antibiótico.

Efectivamente, los resultados obtenidos en los biofilms tratados con imipenem (FIGURA 21A) y con ceftazidima (FIGURA 21B) muestran dicho efecto protector en los mutantes *nfxB*. Los datos de supervivencia en biofilms tratados con imipenem (fuerte inductor de AmpC, pero relativamente estable a su hidrólisis) demuestran que la expresión inducible de AmpC ejerce un efecto protector en el mutante *nfxB*, ya que no se observa la hipersensibilidad a imipenem que caracteriza al mutante *nfxB* en cultivos planctónicos (FIGURA 21A). Además, la inactivación de *ampC* en el mutante *nfxB* (PAONBAC) ocasiona un aumento de la sensibilidad a imipenem respecto al mutante simple *nfxB*, indicando claramente que la acumulación de AmpC en la matriz extracelular desempeña una función crucial en el aumento de la supervivencia que experimenta el mutante PAONB en el biofilm.

La FIGURA 21B, de igual forma, muestra como una hiperexpresión constitutiva de AmpC es también beneficiosa para el mutante *nfxB* cuando éste crece en forma de biofilm, ya que la resistencia a ceftazidima mediada por mutación en *dacB* no se revierte con la inactivación de *nfxB*, como sucede en crecimiento planctónico. Además, al comparar el mutante simple *dacB* con la del mutante doble *nfxB-dacB*, observamos un mayor porcentaje de supervivencia para el mutante doble, indicando que la inactivación de *dacB* en el mutante *nfxB* aumenta la resistencia a ceftazidima, al contrario de lo observado en cultivo planctónico.

Por tanto, estos resultados indican que la resistencia debida a la inducción de AmpC o bien su hiperexpresión constitutiva, no se ve mermada cuando el mutante *nfxB* crece en forma de biofilm. La liberación de AmpC desde el interior celular hasta la matriz extracelular del biofilm parece proteger a la comunidad bacteriana incluida en ese biofilm frente a la acción de los betalactámicos. Así, nuestros resultados sugieren que la cefalosporinasa cromosómica AmpC extracelular tiene su función en la resistencia antibiótica de un biofilm, de acuerdo con observaciones de previos trabajos (Bagge N *et al*, 2004, dos publicaciones del mismo año). Por otro lado, juntamente con las implicaciones terapéuticas que este hallazgo pueda tener, este trabajo tiene importantes consecuencias diagnósticas ya que como se ha podido observar, la resistencia mediada por AmpC en muestras procedentes de pacientes con enfermedades crónicas respiratorias no será detectada por los métodos convencionales de trabajo en el laboratorio de microbiología clínica debido a que los datos de sensibilidad a betalactámicos obtenidos en cultivo planctónico no se correlacionan en absoluto con los obtenidos en biofilms.

4.3.7. Efecto de la inactivación de *nfxB* en cepas clínicas sobre la actividad betalactamasa

Seguidamente se quiso comprobar si este fenómeno es específico de la PAO1, y se procedió a la medición de la actividad betalactamasa en el sobrenadante de las cepas clínicas GPP y JW, así como de sus respectivos mutantes *nfxB*, en condiciones de inducción con imipenem 0,015 µg/mL.

Tal como se aprecia en la FIGURA 22, en fase exponencial tardía (DO = 1) el mutante simple *nfxB* de la PAO1 muestra una actividad betalactamasa en sobrenadante aproximadamente 3-4 veces superior su cepa parental, y los mutantes *nfxB* de las cepas

Resultados y Discusión

cínicas JW y GPP muestran una actividad 5 y 4 veces superior a su cepa parental, respectivamente, demostrando así que esta permeabilidad observada en el mutante *nfxB* no se circunscribe a la PAO1.

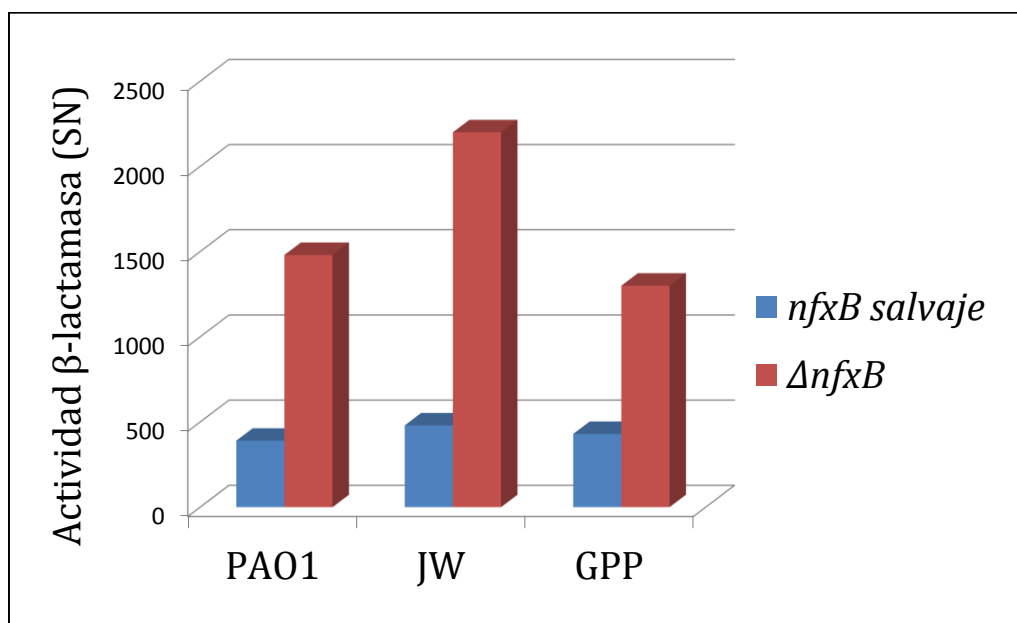


FIGURA 22. Efecto de la inactivación de *nfxB* sobre la actividad β-lactamasa en sobrenadante en condiciones de inducción con imipenem, en las cepas clínicas GPP y JW.

4.3.8. Consecuencias de la inactivación de *nfxB* sobre la resistencia mediada por betalactamasas transferibles

Tras comprobar que la permeabilización hacia el medio extracelular es la responsable de la hipersensibilidad del mutante *nfxB* a betalactámicos en cultivo planctónico, resulta razonable pensar que esta situación puede darse de forma análoga con betalactamasas transferibles.

Con la intención de comprobar tal efecto, se clonaron las betalactamasas VIM-2, OXA-161, BEL-3, SHV-12 y GES-5 en el pUCP24 y se electroporaron en el mutante *nfxB*. Además, para evitar el posible efecto sumatorio del propio *ampC* cromosómico a la betalactamasa clonada se han añadido al experimento los mutantes PAOAC y PAONBAC.

Así, aunque los datos presentados a continuación son preliminares, los perfiles de sensibilidad que mostraron los diferentes mutantes tras la clonación de cada betalactamasa transferible, revelan que la permeabilización que sufre AmpC en el mutante *nfxB* no es un proceso exclusivo de esta betalactamasa ni de las de la clase C, sino que se hace extensivo a otras clases de la clasificación de Ambler.

Si bien no se observan diferencias significativas en la clonación de betalactamasas de clase A en el mutante PAONB, sí se observan en la clonación de las betalactamasas pertenecientes a las clases B y D (TABLA 25). Así, la clonación de la VIM-2 en la PAONB ocasiona una disminución en la CMI de ceftazidima de más de dos diluciones y aproximadamente 3 diluciones en la CMI de imipenem respecto a su cepa parental. De

forma análoga, la clonación de la OXA-161 en el mutante PAONB se tradujo en una disminución de la CMI de ceftazidima de más de dos diluciones respecto a la PAO1.

TABLA 25. Efecto de la inactivación de *nfxB* sobre la resistencia conferida por β -lactamasas transferibles

Cepa	CMI		
	CAZ	IP	CIP
PAO1	1,5	1,5	0,094
PAOAC	0,75	0,25	0,094
PAONB	0,5	0,094	1,5
PAONBAC	0,5	0,094	1,5
PAO1 pUCPVIM2	48	>32	ND
PAOAC pUCPVIM2	48	>32	ND
PAONB pUCPVIM2	8	6	2
PAONBAC pUCPVIM2	8	6	2
PAO1 pUCPOXA161	96	2	ND
PAOAC pUCPOXA161	96	0,5	ND
PAONB pUCPOXA161	16	0,125	2
PAONBAC pUCPOXA161	16	0,125	2
PAO1 pUCPBEL3	>256	2	ND
PAOAC pUCPBEL3	>256	0,75	ND
PAONB pUCPBEL3	>256	0,38	2
PAONBAC pUCPBEL3	>256	0,25	2
PAO1 pUCPCSHV12	>256	2	ND
PAOAC pUCPCSHV12	>256	0,5	ND
PAONB pUCPCSHV12	128	0,19	2
PAONBAC pUCPCSHV12	128	0,094	2
PAO1 pUCPGES1	>256	2	ND
PAOAC pUCPGES1	>256	0,5	ND
PAONB pUCPGES1	>256	0,25	2
PAONBAC pUCPGES1	>256	0,19	2

Los datos de sensibilidad aquí presentados parecen indicar que la permeabilización de betalactamasas hacia el medio extracelular en el mutante *nfxB* afecta solamente a las pertenecientes a las clases B, C y D; no obstante hacen falta más estudios que evalúen el grado de permeabilización experimentado en cada caso.

Entender las interacciones que se dan entre diferentes mecanismos de resistencia resulta vital para poder establecer nuevas estrategias terapéuticas o incluso nuevas dianas que permitan un mejor manejo y control de la infección crónica por *P. aeruginosa*, así como la evasión de la aparición de resistencias durante el tratamiento. El trabajo aquí presentado muestra como las interacciones entre diferentes mecanismos de resistencia son a veces antagónicas dado un nicho ecológico concreto que determine un tipo de crecimiento, en este caso planctónico. No obstante lo que a priori podría resultar erróneo

Resultados y Discusión

desde el punto de vista evolutivo, puede resultar ventajoso cuando la comunidad bacteriana pasa a formar parte de un nuevo nicho ecológico en el que se dan las condiciones necesarias para un cambio en el patrón de crecimiento bacteriano, de planctónico a biofilm. Por tanto este trabajo también pone de manifiesto la falta de correlación entre las pruebas de sensibilidad realizadas en cultivo planctónico y una situación real, donde in vivo las bacterias tiendan a agruparse formando biofilms.

5. CONCLUSIONES

1. La azitromicina posee una buena actividad bactericida sobre los biofilms de *P. aeruginosa*. No obstante, al tratar los biofilms con azitromicina se seleccionan mutantes resistentes, particularmente en cepas hipermutadoras.
2. El mecanismo de resistencia a azitromicina en biofilms está mediado por la hiperexpresión de MexCD-OprJ a través de la inactivación de su regulador negativo *nfxB*, presentando así resistencia cruzada a otros antimicrobianos sustratos de este sistema de expulsión activa, como son ciprofloxacino y cefepima.
3. La hiperexpresión de MexCD-OprJ en el mutante *nfxB* se asocia a una reducción de la competitividad biológica (*fitness*) así como también a una reducción de la virulencia, ya que resulta significativamente más sensible al complemento del suero humano que su cepa parental.
4. En contraste con las conclusiones de trabajos previos con *E. coli*, ni la hiperexpresión ni la deficiencia de tanto la bomba MexCD-OprJ como de su regulador negativo *nfxB* alteran significativamente la tasa de mutación en *P. aeruginosa*.
5. La hiperproducción de MexCD-OprJ debida a la inactivación de NfxB además de producir hipersensibilidad a betalactámicos no sustratos, es capaz de revertir la resistencia a betalactámicos de alto nivel ocasionada por la hiperexpresión de AmpC a través de la mutación en *dacB* (PBP4).
6. La hiperexpresión de MexCD-OprJ reduce la expresión de OprM en la membrana externa, lo cual explica la hipersensibilidad moderada a ciertos betalactámicos y aminoglucósidos pero no la hipersensibilidad a imipenem.
7. El mutante *nfxB* experimenta una permeabilización de su cefalosporinasa cromosómica AmpC a través de su membrana externa que impide su acumulación en el espacio periplásmico, justificando así la hipersensibilidad a imipenem y la reversión de la resistencia mediada por la inactivación de la PBP4 observada en cultivo planctónico.
8. La permeabilización que experimenta AmpC en el mutante *nfxB* paradójicamente ejerce un efecto protector cuando las bacterias se agrupan en comunidades formando biofilms, donde AmpC queda atrapada en la matriz protegiendo a la comunidad bacteriana.
9. La hipersensibilidad ocasionada por la permeabilización de AmpC aparentemente no es un proceso exclusivo de las betalactamasas de clase C, y se hace extensivo a otras betalactamasas transferibles, particularmente las pertenecientes a las clases B y D.

Conclusiones

- 10.** En su conjunto, las conclusiones del presente trabajo justifican la alta prevalencia del mutante *nfxB* en infecciones respiratorias crónicas en contraste con las infecciones agudas.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelraouf K, Kabbara S, Ledesma KR, Poole K, Tam VH. Effect of multidrug resistance-conferring mutations on the *fitness* and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* **2011**; 66(6):1311-7.

Aendekerk S, Diggle SP, Song Z, Høiby N, Cornelis P, Williams P, Cámara M. The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. *Microbiology.* **2005**; 151:1113-25.

Aendekerk S, Ghysels B, Cornelis P, Baysse C. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology.* **2002**; 148:2371-81.

Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol.* **2010**; 8(4):260-71.

Andersson DI, Levin BR. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol.* **1999**; 2(5):489-93.

Armstrong DS, Hook SM, Jansen KM, Nixon GM, Carzino R, Carlin JB, Robertson CF, Grimwood K. Lower airway inflammation in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Pediatr Pulmonol.* **2005**; 40(6):500-10.

Bagge N, Ciofu O, Hentzer M, Campbell JI, Givskov M, Høiby N. Constitutive high expression of chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. *Antimicrob Agents Chemother.* **2002**; 46(11):3406-11

Bagge N, Hentzer M, Andersen JB, Ciofu O, Givskov M, Høiby N. Dynamics and spatial distribution of beta-lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* **2004**; 48(4):1168-74.

Bagge N, Schuster M, Hentzer M, Ciofu O, Givskov M, Greenberg EP, Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and beta-lactamase and alginate production. *Antimicrob Agents Chemother.* **2004**;48(4):1175-87.

Baum J, Barza M. *Pseudomonas* keratitis and extended-wear soft contact lenses. *Arch Ophthalmol.* **1990**; 108(5):663-4.

Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother.* **2002**; 50(1):11-8.

Referencias Bibliográficas

Bjarnsholt T, Jensen PØ, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB, Pressler T, Givskov M, Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol.* **2009**; 44(6):547-58.

Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jensen PØ, Madsen KG, Phipps R, Kroghfelt K, Høiby N, Givskov M. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen.* **2008**;16(1):2-10.

Blanc DS, Petignat C, Janin B, Bille J, Francioli P. Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study. *Clin Microbiol Infect.* **1998**; 4(5):242-247.

Blázquez J. Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. *Clin Infect Dis.* **2003**; 37(9):1201-9. Epub 2003 Sep 30.

Bonten MJ, Bergmans DC, Speijer H, Stobberingh EE. Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units. Implications for infection control. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160(4):1212-9.

Burkovski A, Krämer R. Bacterial amino acid transport proteins: occurrence, functions, and significance for biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2002**; 58(3):265-74.

Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, Rodríguez C, Moyà B, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver A; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother.* **2012**; 56(12):6349-57.

Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Tubau F, Macia MD, Rodríguez C, Moya B, Zamorano L, Suárez C, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver A; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.* **2011**;55(5):1906-11.

Caille O, Rossier C, Perron K. A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **2007**; 189(13):4561-8.

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**; 53(5):1423-36.

Castanheira M, Mendes RE, Walsh TR, Gales AC, Jones RN. Emergence of the extended-spectrum beta-lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report

from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother.* **2004**; 48(6):2344-5.

Cavallo JD, Hocquet D, Plesiat P, Fabre R, Roussel-Delvallez M; GERPA (Groupe d'Etude de la Résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques). Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials: a 2004 French multicentre hospital study. *J Antimicrob Chemother.* **2007**; 59(5):1021-4.

Chen H, Hu J, Chen PR, Lan L, Li Z, Hicks LM, Dinner AR, He C. The *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux regulator MexR uses an oxidation-sensing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2008**;105(36):13586-91.

Chen H, Yi C, Zhang J, Zhang W, Ge Z, Yang CG, He C. Structural insight into the oxidation-sensing mechanism of the antibiotic resistance of regulator MexR. *EMBO Rep.* **2010**; 11(9):685-90.

Chuanchuen R, Gaynor JB, Karkhoff-Schweizer R, Schweizer HP. Molecular characterization of MexL, the transcriptional repressor of the mexJK multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**; 49(5):1844-51.

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**; 49(5):2133-6.

Chuanchuen R, Narasaki CT, Schweizer HP. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *J Bacteriol.* **2002**; 184(18):5036-44.

Ciofu O, Mandsberg LF, Bjarnsholt T, Wassermann T, Høiby N. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in *mucA* and/or *lasR* mutants. *Microbiology.* **2010**; 156:1108-19

Ciofu O, Riis B, Pressler T, Poulsen HE, Høiby N. Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Jun;49(6):2276-82.

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* **1995**; 49:711-45

Dacheux D, Toussaint B, Richard M, Brochier G, Croize J, Attree I. *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun.* **2000**; 68(5):2916-24.

Referencias Bibliográficas

Daigle DM, Cao L, Fraud S, Wilke MS, Pacey A, Klinoski R, Strynadka NC, Dean CR, Poole K. Protein modulator of multidrug efflux gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **2007**; 189(15):5441-51.

Danel F, Hall LM, Gur D, Akalin HE, Livermore DM. Transferable production of PER-1 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* **1995**; 35(2):281-94.

De Astorza B, Cortés G, Crespí C, Saus C, Rojo JM, Albertí S. C3 promotes clearance of *Klebsiella pneumoniae* by A549 epithelial cells. *Infect Immun.* **2004**; 72(3):1767-74.

Del Pozo JL, Patel R. Clinical practice. Infection associated with prosthetic joints. *N Engl J Med.* **2009**; 361(8):787-94.

Denamur E, Matic I. Evolution of mutation rates in bacteria. *Mol Microbiol.* **2006**; 60(4):820-7.

Déziel E, Comeau Y, Villemur R. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol.* **2001**; 183(4):1195-204.

Diepinois G, Ducret V, Caille O, Perron K. The transcriptional regulator CzcR modulates antibiotic resistance and *quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One.* **2012**; 7(5):e38148.

Doggett RG, Harrison GM, Carter RE. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in patients with chronic illnesses. *Lancet.* **1971**; 1(7692):236-7.

Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis.* **2007**; 45(1):88-94.

Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev.* **1997**; 61(3):377-92.

Dubois V, Arpin C, Dupart V, Scavelli A, Coulange L, André C, Fischer I, Grobost F, Brochet JP, Lagrange I, Dutilh B, Jullin J, Noury P, Larrivet G, Quentin C. Beta-lactam and aminoglycoside resistance rates and mechanisms among *Pseudomonas aeruginosa* in French general practice (community and private healthcare centres). *J Antimicrob Chemother.* **2008**; 62(2):316-23.

Eifrig CW, Scott IU, Flynn HW Jr, Miller D. Endophthalmitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Ophthalmology.* **2003**; 110(9):1714-7.

El Amin N, Giske CG, Jalal S, Keijser B, Kronvall G, Wretling B. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *APMIS.* **2005**; 113(3):187-96.

Erol S, Altoparlak U, Akcay MN, Celebi F, Parlak M. Changes of microbial flora and wound colonization in burned patients. *Burns*. **2004**; 30(4):357-61.

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*. *J Bacteriol*. **1998**; 180(20):5443-7.

Evans K, Poole K. The MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa* is growth-phase regulated. *FEMS Microbiol Lett*. **1999**; 173(1):35-9.

Fetar H, Gilmour C, Klinoski R, Daigle DM, Dean CR, Poole K. *mexEF-oprN* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by the MexT activator in response to nitrosative stress and chloramphenicol. *Antimicrob Agents Chemother*. **2011**; 55(2):508-14

Filip C, Fletcher G, Wulff JL, Earhart CF. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. *J Bacteriol*. **1973**; 115(3):717-22.

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**; 52(12):4478-82.

Fukuda H, Hosaka M, Iyobe S, Gotoh N, Nishino T, Hirai K. *nfxC*-type quinolone resistance in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. **1995**; 39(3):790-2.

Gabrovsky V, Yamamoto ML, Miller JH. Mutator effects in *Escherichia coli* caused by the expression of specific foreign genes. *J Bacteriol*. **2005**; 187(14):5044-8.

Gillis RJ, White KG, Choi KH, Wagner VE, Schweizer HP, Iglewski BH. Molecular basis of azithromycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. **2005**; 49(9):3858-67.

Gotoh N, Tsujimoto H, Nomura A, Okamoto K, Tsuda M, Nishino T. Functional replacement of OprJ by OprM in the MexCD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*. **1998**; 165(1):21-7.

Gotoh N, Tsujimoto H, Tsuda M, Okamoto K, Nomura A, Wada T, Nakahashi M, Nishino T. Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in DeltamexA-mexB-*oprM* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. **1998**; 42(8):1938-43.

Referencias Bibliográficas

Gould CV, Sniegowski PD, Shchepetov M, Metlay JP, Weiser JN. Identifying mutator phenotypes among fluoroquinolone-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* using fluctuation analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* **2007**; 51(9):3225-9.

Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.* **1996**; 60(3):539-74.

Gristina AG, Oga M, Webb LX, Hobgood CD. Adherent bacterial colonization in the pathogenesis of osteomyelitis. *Science.* **1985**; 228(4702):990-3.

Guelfo JR, Rodríguez-Rojas A, Matic I, Blázquez J. A MATE-family efflux pump rescues the *Escherichia coli* 8-oxoguanine-repair-deficient mutator phenotype and protects against H₂O₂ killing. *PLoS Genet.* **2010**; 6(5):e1000931.

Guénard S, Muller C, Monlezun L, Benas P, Broutin I, Jeannot K, Plésiat P. Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2014**;58(1):221-8.

Gupta V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Expert Opin Investig Drugs.* **2008**; 17(2):131-43

Gutiérrez O, Juan C, Cercenado E, Navarro F, Bouza E, Coll P, Pérez JL, Oliver A. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* **2007**; 51(12):4329-35.

Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieseke A, Nistico L, Nguyen D, Hayes J, Forbes M, Greenberg DP, Dice B, Burrows A, Wackym PA, Stoodley P, Post JC, Ehrlich GD, Kerschner JE. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA.* **2006**; 296(2):202-11.

Hancock RE. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis.* **1998**; 27 Suppl 1:S93-9.

Hansen CR, Pressler T, Nielsen KG, Jensen PØ, Bjarnsholt T, Høiby N. Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* **2010**; 9(1):51-8.

Harmer C, Alnassafi K, Hu H, Elkins M, Bye P, Rose B, Cordwell S, Triccas JA, Harbour C, Manos J. Modulation of gene expression by *Pseudomonas aeruginosa* during chronic infection in the adult cystic fibrosis lung. *Microbiology.* **2013**; 159(Pt 11):2354-63.

Harris AA, Goodman L, Levin S. Community-acquired *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia associated with the use of a home humidifier. *West J Med.* **1984**; 141(4):521-3.

Hassan MT, van der Lelie D, Springael D, Römling U, Ahmed N, Mergeay M. Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*. **1999**; 238(2):417-25.

Hatfield GW, Hung SP, Baldi P. Differential analysis of DNA microarray gene expression data. *Mol Microbiol*. **2003**; 47(4):871-7.

Häussler S, Ziegler I, Löttel A, von Götz F, Rohde M, Wehmhöner D, Saravanamuthu S, Tümmler B, Steinmetz I. Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *J Med Microbiol*. **2003**; 52(Pt 4):295-301.

Hay T, Fraud S, Lau CH, Gilmour C, Poole K. Antibiotic inducibility of the *mexXY* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the MexZ anti-repressor ArmZ. *PLoS One*. **2013**; 8(2):e56858.

Helling RB, Janes BK, Kimball H, Tran T, Bundesmann M, Check P, Phelan D, Miller C. Toxic waste disposal in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. **2002**; 184(13):3699-703.

Higgins PG, Fluit AC, Milatovic D, Verhoef J, Schmitz FJ. Mutations in GyrA, ParC, MexR and NfxB in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*. **2003**; 21(5):409-13.

Hill AT, Campbell EJ, Hill SL, Bayley DL, Stockley RA. Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *Am J Med*. **2000**; 109(4):288-95.

Hirai K, Suzue S, Irikura T, Iyobe S, Mitsuhashi S. Mutations producing resistance to norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. **1987**; 31(4):582-6.

Hirakata Y, Srikumar R, Poole K, Gotoh N, Suematsu T, Kohno S, Kamihira S, Hancock RE, Speert DP. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Exp Med*. **2002**; 196(1):109-18.

Hocquet D, Nordmann P, El Garch F, Cabanne L, Plésiat P. Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. **2006**; 50(4):1347-51.

Hoffmann N, Lee B, Hentzer M, Rasmussen TB, Song Z, Johansen HK, Givskov M, Høiby N. Azithromycin blocks *quorum sensing* and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in Cfr(-/-) mice. *Antimicrob Agents Chemother*. **2007**; 51(10):3677-87.

Hogg JC. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. **2004**; 364(9435):709-21

Referencias Bibliográficas

Høiby N, Döring G, Schiøtz PO. The role of immune complexes in the pathogenesis of bacterial infections. *Annu Rev Microbiol.* **1986**; 40:29-53.

Høiby N, Frederiksen B, Pressler T. Eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Cyst Fibros.* **2005**; 4 Suppl 2:49-54.

Høiby N, Krogh Johansen H, Moser C, Song Z, Ciofu O, Kharazmi A. *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes Infect.* **2001**; 3(1):23-35.

Homøe P, Bjarnsholt T, Wessman M, Sørensen HC, Johansen HK. Morphological evidence of biofilm formation in Greenlanders with chronic suppurative otitis media. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* **2009**; 266(10):1533-8.

Honoré N, Nicolas MH, Cole ST. Regulation of enterobacterial cephalosporinase production: the role of a membrane-bound sensory transducer. *Mol Microbiol.* **1989**; 3(8):1121-30.

Imperi F, Tiburzi F, Visca P. Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2009**; 106(48):20440-5.

Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* **2003**; 4(2):249-64.

Islam S, Jalal S, Wretlind B. Expression of the MexXY efflux pump in amikacin-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect.* **2004**; 10(10):877-83.

Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* **2009**; 22(1):161-82

Jakics EB, Iyobe S, Hirai K, Fukuda H, Hashimoto H. Occurrence of the *nfxB* type mutation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **1992**; 36(11):2562-5.

Jalal S, Ciofu O, Hoiby N, Gotoh N, Wretlind B. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* **2000**; 44(3):710-2.

Jalal S, Wretlind B. Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist.* **1998**; 4(4):257-61.

Jeannot K, Elsen S, Köhler T, Attree I, van Delden C, Plésiat P. Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother.* **2008**; 52(7):2455-62.

- Jin Y, Yang H, Qiao M, Jin S.** MexT regulates the type III secretion system through MexS and PtrC in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **2011**; 193(2):399-410.
- Jovcic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, Topisirovic L, Kojic M.** Emergence of NDM-1 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother.* **2011**; 55(8):3929-31
- Jovcic B, Vasiljevic Z, Djukic S, Topisirovic L, Kojic M.** Emergence of VIM-2 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a paediatric hospital in Serbia. *J Med Microbiol.* **2011**; 60(Pt 6):868-9.
- Juan C, Maciá MD, Gutiérrez O, Vidal C, Pérez JL, Oliver A.** Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**; 49(11):4733-8.
- Juan C, Moyá B, Pérez JL, Oliver A.** Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level beta-lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrob Agents Chemother.* **2006**; 50(5):1780-7.
- Juan C, Zamorano L, Pérez JL, Ge Y, Oliver A; Spanish Group for the Study of Pseudomonas; Spanish Network for Research in Infectious Diseases.** Activity of a new antipseudomonal cephalosporin, CXA-101 (FR264205), against carbapenem-resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother.* **2010**; 54(2):846-51.
- Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J.** Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect.* **2006**; 36(2):78-91.
- Kirketerp-Møller K, Jensen PØ, Fazli M, Madsen KG, Pedersen J, Moser C, Tolker-Nielsen T, Høiby N, Givskov M, Bjarnsholt T.** Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(8):2717-22.
- Köhler T, Epp SF, Curty LK, Pechère JC.** Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **1999**; 181(20):6300-5.
- Köhler T, Kok M, Michea-Hamzehpour M, Plesiat P, Gotoh N, Nishino T, Curty LK, Pechere JC.** Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **1996**; 40(10):2288-90.
- Köhler T, Michéa-Hamzehpour M, Henze U, Gotoh N, Curty LK, Pechère JC.** Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* **1997**; 23(2):345-54.

Referencias Bibliográficas

Köhler T, van Delden C, Curty LK, Hamzehpour MM, Pechere JC. Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. **2001**;183(18):5213-22.

Kollef MH, Shorr A, Tabak YP, Gupta V, Liu LZ, Johannes RS. Epidemiology and outcomes of health-care-associated pneumonia: results from a large US database of culture-positive pneumonia. Chest. **2005**; 128(6):3854-62.

Komshian SV, Tablan OC, Palutke W, Reyes MP. Characteristics of left-sided endocarditis due to *Pseudomonas aeruginosa* in the Detroit Medical Center. Rev Infect Dis. **1990**; 12(4):693-702.

Kronborg G, Fomsgaard A, Galanos C, Freudenberg MA, Høiby N. Antibody responses to lipid A, core, and O sugars of the *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in chronically infected cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 1992; 30(7):1848-55.

Li XZ, Barré N, Poole K. Influence of the MexA-MexB-*oprM* multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-*oprJ* and MexE-MexF-*oprN* multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. **2000**; 46(6):885-93.

Li XZ, Nikaido H, Poole K. Role of mexA-mexB-*oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. **1995**; 39(9):1948-53.

Li XZ, Poole K, Nikaido H. Contributions of MexAB-OprM and an EmrE homolog to intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides and dyes. Antimicrob Agents Chemother. **2003**; 47(1):27-33.

Li XZ, Zhang L, Srikumar R, Poole K. Beta-lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. **1998**;42(2):399-403.

Li Y, Mima T, Komori Y, Morita Y, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother. **2003**; 52(4):572-5.

Liang H, Deng X, Li X, Ye Y, Wu M. Molecular mechanisms of master regulator VqsM mediating quorum-sensing and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Nucleic Acids Res. **2014**; 42(16):10307-20.

Linares JF, López JA, Camafeita E, Albar JP, Rojo F, Martínez J.L. Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2005 Feb;187(4):1384-91.

Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin Microbiol Rev. **2009**; 22(4):582-610.

- Livermore DM, Woodford N.** The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. Trends Microbiol. **2006**; 14(9):413-20.
- Livermore DM.** Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? Clin Infect Dis. **2002**; 34(5):634-40.
- Livermore DM.** Of Pseudomonas, porins, pumps and carbapenems. J Antimicrob Chemother. **2001**; 47(3):247-50.
- Lynch JP 3rd.** Hospital-acquired pneumonia: risk factors, microbiology, and treatment. Chest. 2001; 119(2 Suppl):373S-384S.
- Maciá 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**; 49(8):3382-6.
- Mahenthiralingam E, Campbell ME, Speert DP.** Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. Infect Immun. **1994**; 62(2):596-605.
- Mark BL, Voadlo DJ, Oliver A.** Providing betalactams a helping hand: targeting the AmpC betalactamase induction pathway. Future Microbiol. **2011**; 6(12):1415-27.
- Martinez JL, Baquero F.** Mutation frequencies and antibiotic resistance. Antimicrob Agents Chemother. **2000**; 44(7):1771-7
- Maseda H, Saito K, Nakajima A, Nakae T.** Variation of the mexT gene, a regulator of the MexEF-oprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett. **2000**; 192(1):107-12
- 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**; 48(4):1320-8
- Masuda N, Gotoh N, Ishii C, Sakagawa E, Ohya S, Nishino T.** Interplay between chromosomal beta-lactamase and the MexAB-OprM efflux system in intrinsic resistance to beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. **1999**; 43(2):400-2.
- Masuda N, Gotoh N, Ohya S, Nishino T.** Quantitative correlation between susceptibility and OprJ production in NfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. **1996**; 40(4):909-13.

Referencias Bibliográficas

- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Nishino T.** Hypersusceptibility of the *Pseudomonas aeruginosa nfxB* mutant to beta-lactams due to reduced expression of the *ampC* beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* **2001**; 45(4):1284-6.
- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T.** Contribution of the MexX-MexY-*oprM* efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2000**; 44(9):2242-6.
- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S.** Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **1995**; 39(3):645-9.
- Matsukawa M, Greenberg EP.** Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol.* **2004**; 186(14):4449-56.
- Mena A, Smith EE, Burns JL, Speert DP, Moskowitz SM, Perez JL, Oliver A.** Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. *J Bacteriol.* **2008**; 190(24):7910-7.
- Miller GH, Sabatelli FJ, Hare RS, Glupczynski Y, Mackey P, Shlaes D, Shimizu K, Shaw KJ.** The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms--changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups. *Clin Infect Dis.* **1997**; 24 Suppl 1:S46-62.
- 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**; 189(21):7600-9.
- Mima T, Kohira N, Li Y, Sekiya H, Ogawa W, Kuroda T, Tsuchiya T.** Gene cloning and characteristics of the RND-type multidrug efflux pump MuxABC-OpmB possessing two RND components in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* **2009**; 155(Pt 11):3509-17
- 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.
- Minagawa S, Inami H, Kato T, Sawada S, Yasuki T, Miyairi S, Horikawa M, Okuda J, Gotoh N.** RND type efflux pump system MexAB-OprM of *Pseudomonas aeruginosa* selects bacterial languages, 3-oxo-acyl-homoserine lactones, for cell-to-cell communication. *BMC Microbiol.* **2012**; 12:70.
- Moreau-Marquis S, Stanton BA, O'Toole GA.** *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. *Pulm Pharmacol Ther.* **2008**; 21(4):595-9.
- Morita Y, Murata T, Mima T, Shiota S, Kuroda T, Mizushima T, Gotoh N, Nishino T, Tsuchiya T.** Induction of *mexCD-oprJ* operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Antimicrob Chemother.* **2003**; 51(4):991-4.

- Morrison AJ Jr, Wenzel RP.** Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis. **1984**; 6 Suppl 3:S627-42.
- Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J, Burns JL.** Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2004 May;42(5):1915-22.
- Moya B, Dötsch A, Juan C, Blázquez J, Zamorano L, Haussler S, Oliver A.** Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. PLoS Pathog. **2009**; 5(3):e1000353.
- Moya B, Juan C, Albertí S, Pérez JL, Oliver A.** Benefit of having multiple ampD genes for acquiring beta-lactam resistance without losing *fitness* and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. **2008**; 52(10):3694-700.
- Moya B, Zamorano L, Juan C, Pérez JL, Ge Y, Oliver A.** Activity of a new cephalosporin, CXA-101 (FR264205), against beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants selected in vitro and after antipseudomonal treatment of intensive care unit patients. Antimicrob Agents Chemother. **2010**; 54(3):1213-7.
- Mulcahy LR, Burns JL, Lory S, Lewis K.** Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. J Bacteriol. **2010**; 192(23):6191-9.
- 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**; 217(1):57-63.
- Nakae T, Nakajima A, Ono T, Saito K, Yoneyama H.** Resistance to beta-lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the MexAB-OprM efflux pump and beta-lactamase. Antimicrob Agents Chemother. **1999**; 43(5):1301-3.
- Nordmann P, Naas T.** Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. **1994**; 38(1):104-14.
- Nordmann P, Poirel L.** Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect. **2002**;8(6):321-31.
- Normark BH, Normark S.** Evolution and spread of antibiotic resistance. J Intern Med. **2002**; 252(2):91-106.
- Nowroozi J, Akhavan Sepahi A, Rashnonejad A.** Pyocyanine Biosynthetic Genes in Clinical and Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and Detection of Pyocyanine's Antimicrobial Effects with or without Colloidal Silver Nanoparticles. Cell J. **2012**; 14(1):7-18.

Referencias Bibliográficas

Ochs MM, McCusker MP, Bains M, Hancock RE. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob Agents Chemother.* **1999**;43(5):1085-90.

Oh H, Stenhoff J, Jalal S, Wretling B. Role of efflux pumps and mutations in genes for topoisomerases II and IV in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Microb Drug Resist.* **2003**; 9(4):323-8.

Ohara T, Itoh K. Significance of *Pseudomonas aeruginosa* colonization of the gastrointestinal tract. *Intern Med.* **2003**; 42(11):1072-6.

Olivares J, Alvarez-Ortega C, Linares JF, Rojo F, Köhler T, Martínez JL. Overproduction of the multidrug efflux pump MexEF-OprN does not impair *Pseudomonas aeruginosa* fitness in competition tests, but produces specific changes in bacterial regulatory networks. *Environ Microbiol.* **2012**; 14(8):1968-81.

Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science.* **2000**; 288(5469):1251-4.

Oliver A, Pérez-Vázquez M, Martínez-Ferrer M, Baquero F, De Rafael L, Cantón R. Ampicillin-sulbactam and amoxicillin-clavulanate susceptibility testing of *Escherichia coli* isolates with different beta-lactam resistance phenotypes. *Antimicrob Agents Chemother.* **1999**; 43(4):862-7.

Pai H, Kim J, Kim J, Lee JH, Choe KW, Gotoh N. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* **2001**; 45(2):480-4.

Palma M, Zurita J, Ferreras JA, Worgall S, Larone DH, Shi L, Campagne F, Quadri LE. *Pseudomonas aeruginosa* SoxR does not conform to the archetypal paradigm for SoxR-dependent regulation of the bacterial oxidative stress adaptive response. *Infect Immun.* **2005**; 73(5):2958-66.

Palmer RJ Jr. Supragingival and subgingival plaque: paradigm of biofilms. *Compend Contin Educ Dent.* **2010**; 31(2):104-6, 108, 110 passim; quiz 124, 138.

Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG, Miles RS, Amyes SG. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents.* **1993**; 2(2):81-7.

Pearson JP, Van Delden C, Iglewski BH. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol.* **1999**; 181(4):1203-10.

Pedersen SS, Høiby N, Espersen F, Koch C. Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax*. **1992**; 47(1):6-13.

Pedersen SS, Kharazmi A, Espersen F, Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* alginate in cystic fibrosis sputum and the inflammatory response. *Infect Immun*. **1990**; 58(10):3363-8.

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*. *J Biol Chem*. **2004**; 279(10):8761-8.

Philippon LN, Naas T, Bouthors AT, Barakett V, Nordmann P. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. **1997**; 41(10):2188-95.

Picão RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P. Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. **2009**; 53(5):2225-6.

Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol*. **2006**; 4(8):629-36.

Pirnay JP, De Vos D, Mossialos D, Vanderkelen A, Cornelis P, Zizi M. Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa oprD* gene from clinical and environmental isolates. *Environ Microbiol*. **2002**; 4(12):872-82.

Pitt TL, Kaufmann ME, Patel PS, Bengel LC, Gaskin S, Livermore DM. Type characterisation and antibiotic susceptibility of Burkholderia (*Pseudomonas*) cepacia isolates from patients with cystic fibrosis in the United Kingdom and the Republic of Ireland. *J Med Microbiol*. **1996**; 44(3):203-10.

Poirel L, Rotimi VO, Mokaddas EM, Karim A, Nordmann P. VEB-1-like extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*, Kuwait. *Emerg Infect Dis*. **2001**; 7(3):468-70.

Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*. **1995**; p 1820-2003. In GL Mandell, R Dolan and JE Bennet. Principles and practices of infectious diseases. Churchill Livingstone. New York, NY.

Pollini S, Maradei S, Pecile P, Olivo G, Luzzaro F, Docquier JD, Rossolini GM. FIM-1, a new acquired metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. *Antimicrob Agents Chemother*. **2013**; 57(1):410-6.

Poole K, Gotoh N, Tsujimoto H, Zhao Q, Wada A, Yamasaki T, Neshat S, Yamagishi J, Li XZ, Nishino T. Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type

Referencias Bibliográficas

multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol. **1996**; 21(4):713-24.

Poole K, Tetro K, Zhao Q, Neshat S, Heinrichs DE, Bianco N. Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. Antimicrob Agents Chemother. **1996**; 40(9):2021-8.

Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. **2005**; 49(2):479-87.

Poole K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother. **2000**; 44(9):2233-41.

Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. J Mol Microbiol Biotechnol. **2001**; 3(2):255-64.

Poole K. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. Curr Pharm Biotechnol. **2002**; 3(2):77-98.

Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. Front Microbiol. **2011**; 2:65.

Powell EO. Growth rate and generation time of bacteria, with special reference to continuous culture. J Gen Microbiol. **1956**; 15(3):492-511.

Pressler T, Frederiksen B, Skov M, Garred P, Koch C, Høiby N. Early rise of anti-pseudomonas antibodies and a mucoid phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* are risk factors for development of chronic lung infection--a case control study. J Cyst Fibros. **2006**; 5(1):9-15.

Proctor RA, Kriegeskorte A, Kahl BC, Becker K, Löffler B, Peters G. *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): a road map for the metabolic pathways involved in persistent infections. Front Cell Infect Microbiol. **2014**; Jul 28;4:99.

Pumbwe L, Piddock LJ. Two efflux systems expressed simultaneously in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. **2000**; 44(10):2861-4.

Pursell A, Fruci M, Mikalauskas A, Gilmour C, Poole K. EsrC, an envelope stress-regulated repressor of the *mexCD-oprJ* multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*. Environ Microbiol. **2014** Aug 20. doi: 10.1111/1462-2920.12602.

Pursell A, Poole K. Functional characterization of the NfxB repressor of the *mexCD-oprJ* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology. **2013** ;159(Pt 10):2058-73.

- Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D.** Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* **2006**; 50(5):1633-41.
- Queenan AM, Shang W, Bush K, Flamm RK.** Differential selection of single-step AmpC or efflux mutants of *Pseudomonas aeruginosa* by using cefepime, ceftazidime, or ceftobiprole. *Antimicrob Agents Chemother.* **2010**; 54(10):4092-7.
- Quénée L, Lamotte D, Polack B.** Combined *sacB*-based negative selection and *cre-lox* antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechniques.* **2005**; 38(1):63-7.
- Ramírez MS, Tolmasky ME.** Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat.* **2010**; 13(6):151-7
- Rampioni G, Schuster M, Greenberg EP, Bertani I, Grasso M, Venturi V, Zennaro E, Leoni L.** RsaL provides *quorum sensing* homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* **2007**; 66(6):1557-65.
- Rampioni G1, Schuster M, Greenberg EP, Zennaro E, Leoni L.** Contribution of the RsaL global regulator to *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett.* **2009**; 301(2):210-7.
- Rensing C, Pribyl T, Nies DH.** New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *J Bacteriol.* **1997**; 179(22):6871-9.
- Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP.** Nosocomial infections in pediatric intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Pediatrics.* **1999**; 103(4):e39.
- Rodríguez-Rojas A, Mena A, Martín S, Borrell N, Oliver A, Blázquez J.** Inactivation of the *hmgA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* leads to pyomelanin hyperproduction, stress resistance and increased persistence in chronic lung infection. *Microbiology.* **2009**; 155:1050-7.
- Sambrook J. et al.** *Molecular Cloning.* P 1.14. **1989**
- Sánchez P, Linares JF, Ruiz-Díez B, Campanario E, Navas A, Baquero F, Martínez JL.** Fitness of in vitro selected *Pseudomonas aeruginosa* *nalB* and *nfxB* multidrug resistant mutants. *J Antimicrob Chemother.* **2002**; 50(5):657-64.
- Sanderson AR, Leid JG, Hunsaker D.** Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope.* **2006**; 116(7):1121-6.

Referencias Bibliográficas

Schaber JA, Carty NL, McDonald NA, Graham ED, Cheluvappa R, Griswold JA, Hamood AN. Analysis of *quorum sensing*-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol. **2004**; 53(Pt 9):841-53.

Schiøtz PO, Hoiby N, Juhl F, Permin H, Nielsen H, Svehag SE. Immune complexes in cystic fibrosis. Acta Pathol Microbiol Scand C. **1977** ; 85(1):57-64.

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.

Shiba T, Ishiguro K, Takemoto N, Koibuchi H, Sugimoto K. Purification and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* NfxB protein, the negative regulator of the *nfxB* gene. J Bacteriol. 1995; 177(20):5872-7.

Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson MV. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. Proc Natl Acad Sci U S A. **2006**; 103(22):8487-92.

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**; 187(4):1246-53.

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**; 42(1):65-71.

Srikumar R, Li XZ, Poole K. Inner membrane efflux components are responsible for beta-lactam specificity of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. **1997**; 179(24):7875-81.

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*. J Bacteriol. **2000**; 182(5):1410-4.

Starr LM, Fruci M, Poole K. Pentachlorophenol induction of the *Pseudomonas aeruginosa* *mexAB-oprM* efflux operon: involvement of repressors NalC and MexR and the antirepressor ArmR. PLoS One. **2012**; 7(2):e32684.

Stickland HG, Davenport PW, Lilley KS, Griffin JL, Welch M. Mutation of *nfxB* causes global changes in the physiology and metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. J Proteome Res. **2010**; 9(6):2957-67.

Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-

Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. **2000**; 406(6799):959-64.

Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol*. **2009**; 58(Pt 9):1133-48

Sun Z, Jiao X, Peng Q, Jiang F, Huang Y, Zhang J, Yao F. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is associated with decreased *fitness*. *Cell Physiol Biochem*. **2013**; 31(2-3):347-54.

Tacconelli E1, De Angelis G, Cataldo MA, Mantengoli E, Spanu T, Pan A, Corti G, Radice A, Stolzuoli L, Antinori S, Paradisi F, Carosi G, Bernabei R, Antonelli M, Fadda G, Rossolini GM, Cauda R. Antibiotic usage and risk of colonization and infection with antibiotic-resistant bacteria: a hospital population-based study. *Antimicrob Agents Chemother*. **2009**; 53(10):4264-9.

Takesue Y, Yokoyama T, Akagi S, Ohge H, Imamura Y, Murakami Y, Sueda T. Changes in the intestinal flora after the administration of prophylactic antibiotics to patients undergoing a gastrectomy. *Surg Today*. **2002**; 32(7):581-6.

Thomas SR, Ray A, Hodson ME, Pitt TL. Increased sputum amino acid concentrations and auxotrophy of *Pseudomonas aeruginosa* in severe cystic fibrosis lung disease. *Thorax*. **2000**; 55(9):795-7.

Thuong M, Arvaniti K, Ruimy R, de la Salmonière P, Scanvic-Hameg A, Lucet JC, Régnier B. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and risk factors for carriage acquisition in an intensive care unit. *J Hosp Infect*. **2003**; 53(4):274-82.

Trampuz A, Zimmerli W. New strategies for the treatment of infections associated with prosthetic joints. *Curr Opin Investig Drugs*. **2005**; 6(2):185-90.

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**; 34(1):52-7.

Valderrey AD, Pozuelo MJ, Jiménez PA, Maciá MD, Oliver A, Rotger R. Chronic colonization by *Pseudomonas aeruginosa* of patients with obstructive lung diseases: cystic fibrosis, bronchiectasis, and chronic obstructive pulmonary disease. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **2010**; 68(1):20-7.

Vallés J, Mariscal D, Cortés P, Coll P, Villagrà A, Díaz E, Artigas A, Rello J. Patterns of colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in intubated patients: a 3-year prospective study of 1,607 isolates using pulsed-field gel electrophoresis with implications for prevention of

Referencias Bibliográficas

ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med.* **2004**; 30(9):1768-75. Epub 2004 Jul 9.

Van Alst NE, Picardo KF, Iglewski BH, Haidaris CG. Nitrate sensing and metabolism modulate motility, biofilm formation, and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* **2007**; 75(8):3780-90. Epub 2007 May 25.

Van Dyk TK, Templeton LJ, Cantera KA, Sharpe PL, Sariaslani FS. Characterization of the *Escherichia coli* AaeAB efflux pump: a metabolic relief valve? *J Bacteriol.* **2004**; 186(21):7196-204.

van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJ. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol.* **2011**; 2:203.

Viedma E, Juan C, Acosta J, Zamorano L, Otero JR, Sanz F, Chaves F, Oliver A. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* **2009**; 53(11):4930-3.

Vincent JL. Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet.* **2003**; 361(9374):2068-77.

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**; 48(5):1676-80.

Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* **2005**; 18(2):306-25.

Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **1991**; 35(1):147-51.

Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(8):2385-92.

West SE, Schweizer HP, Dall C, Sample AK, Runyen-Janecky LJ. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene.* **1994**; 148(1):81-6.

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; 255(2):247-54.

- Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS.** Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. **2002**; 295(5559):1487.
- Wilke MS, Heller M, Creagh AL, Haynes CA, McIntosh LP, Poole K, Strynadka NC.** The crystal structure of MexR from *Pseudomonas aeruginosa* in complex with its antirepressor ArmR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 30;105(39):14832-7.
- Wolter DJ, Hanson ND, Lister PD.** AmpC and OprD are not involved in the mechanism of imipenem hypersusceptibility among *Pseudomonas aeruginosa* isolates overexpressing the *mexCD-oprJ* efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother*. **2005**; 49(11):4763-6.
- Wolter DJ, Hanson ND, Lister PD.** Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiol Lett*. **2004** ; 236(1):137-43.
- Woodford N, Zhang J, Kaufmann ME, Yarde S, Tomas Mdel M, Faris C, Vardhan MS, Dawson S, Cotterill SL, Livermore DM.** Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB-type extended-spectrum beta-lactamases in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother*. **2008**; 62(6):1265-8.
- Woods DE.** Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Trends Microbiol*. **2004**; 12(10):437-9.
- Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellon G, Berger J, Weiss T, Botzenhart K, Yankaskas JR, Randell S, Boucher RC, Döring G.** Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest*. **2002**; 109(3):317-25
- Yang H, Wolff E, Kim M, Diep A, Miller JH.** Identification of mutator genes and mutational pathways in *Escherichia coli* using a multicopy cloning approach. *Mol Microbiol*. **2004**; 53(1):283-95.
- 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. *J Microbiol*. **2011**; 49(1):107-14.
- Yong D, Toleman MA, Bell J, Ritchie B, Pratt R, Ryley H, Walsh TR.** Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo-beta-lactamase gene, blaAIM-1, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. *Antimicrob Agents Chemother*. **2012**; 56(12):6154-9.
- Yousef AA, Jaffe A.** The role of azithromycin in patients with cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. **2010**; 11(2):108-14.

Referencias Bibliográficas

Zamorano L, Moyá B, Juan C, Oliver A. Differential beta-lactam resistance response driven by *ampD* or *dacB* (PBP4) inactivation in genetically diverse *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Antimicrob Chemother.* **2010**; 65(7):1540-2.

Zamorano L, Reeve TM, Juan C, Moyá B, Cabot G, Vocadlo DJ, Mark BL, Oliver A. AmpG inactivation restores susceptibility of pan-beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother.* **2011**; 55(5):1990-6.

Zhang W, Lee M, Heseck D, Lastochkin E, Boggess B, Mobashery S. Reactions of the three AmpD enzymes of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Chem Soc.* **2013**; 135(13):4950-3.

Zhao G, Meier TI, Kahl SD, Gee KR, Blaszczyk LC. BOCILLIN FL, a sensitive and commercially available reagent for detection of penicillin-binding proteins. *Antimicrob Agents Chemother.* **1999**; 43(5):1124-8.

Zhao Q, Li XZ, Srikumar R, Poole K. Contribution of outer membrane efflux protein OprM to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* independent of MexAB. *Antimicrob Agents Chemother.* **1998**; 42(7):1682-8.

Zhao WH, Hu ZQ. Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Rev Microbiol.* **2010**; 36(3):245-58.

7. ANEXO 1: medios de cultivo y reactivos de laboratorio

7.1. Medios de cultivo

LB (Luria Bertani): 5 g NaCl, 5 g de extracto de levadura, 10 g de tristona por litro de agua destilada.

LB agar: se añadieron 15 g de agar bacteriológico nº 1 por cada litro de caldo LB.

MH (Mueller Hinton): Se añadieron 38 g por litro de agua destilada.

MH agar: Se añadieron 38 g por litro de caldo MH

Mc Conkey agar: Se añadieron 52 g por litro de agua destilada.

7.2. Reactivos de laboratorio

SMEB: 1mM MgCl₂, 1mM tampón HEPES (pH7), 0,3 M sacarosa.

SOC: 2 % triptona, 0,5 % extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosa.

PBS 0,1 M (pH 7): para obtener 1 litro, se añadieron 57,7 ml de Na₂HPO₄ 1 M y 42,3 ml de NaH₂PO₄ 1 M a 900 ml de agua destilada.

TBE 5x: 54 g de TRIS, 27,5 g de ácido bórico y 20 ml de EDTA 0,5 M (pH 7,6), agua destilada hasta obtener 1 litro.

SDS-PAGE utilizado en la extracción de proteína de membrana externa:

Running Gel (7 mL)	Volumen (µL)	Stacking Gel (3 mL)	Volumen (µL)
TRIS 1M (pH 8,8)	1175	TRIS 1M (pH 6,9)	375
APS 10%	70	APS 10%	30
SDS 10%	70	SDS 10%	30
TEMED	3	TEMED	3
Acrilamida/BIS 40% (29:1)	1750	Acrilamida/BIS 40% (29:1)	375
Agua destilada	3360	Agua destilada	2200

7.3. Mezclas para PCR

- PCR convencional, volumen final de 100 μL por reacción:

Reactivos	Volumen (μL) por reacción
Buffer II (10x)	10
MgCl ₂ 25 mM	6
dNTPs (10 mM cada uno)	2
DMSO	10
Taq polimerasa (5U/ μL)	1
Cebador F (100 μM)	1
Cebador R (100 μM)	1
Agua destilada	69
ADN molde	1

- PCR a tiempo real, volumen final de 25,25 μL por reacción:

Reactivos	Volumen (μL) por reacción
2x RT-PCR master mix	12,5
Quantitec RT mix	0,25
Cebador F (100 μM)	0,1
Cebador R (100 μM)	0,1
Agua destilada (RNase <i>free</i>)	11,3
RNA molde (50 ng/ μl)	1

8. ANEXO 2: Artículos publicados

Mulet X, Maciá MD, Mena A, Juan C, Pérez JL, Oliver A. Azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: bactericidal activity and selection of *nfxB* mutants. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(4):1552-60.

Enlace: <http://aac.asm.org/content/53/4/1552.long>

Mulet X, Moyá B, Juan C, Maciá MD, Pérez JL, Blázquez J, Oliver A. Antagonistic interactions of *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance mechanisms in planktonic but not biofilm growth. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(10):4560-8.

Enlace: <http://aac.asm.org/content/55/10/4560.long>

Martínez-Ramos I, Mulet X, Moyá B, Barbier M, Oliver A, Albertí S. Overexpression of MexCD-OprJ reduces *Pseudomonas aeruginosa* virulence by increasing its susceptibility to complement-mediated killing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(4):2426-9.

Enlace: <http://aac.asm.org/content/58/4/2426.long>