



**Universitat**  
de les Illes Balears

## **TESIS DOCTORAL**

**2021**

**Estudio de la interacción entre los marcadores de virulencia, perfil de resistencia y clones de alto riesgo en los modelos *Caenorhabditis elegans* y *Galleria mellonella*. Evaluación del valor predictivo como marcadores pronósticos en la bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa*.**

**Irina Alexis Sánchez Diener**





**Universitat**  
de les Illes Balears



## **TESIS DOCTORAL** **2021**

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

**Estudio de la interacción entre los marcadores de virulencia,  
perfil de resistencia y clones de alto riesgo en los modelos  
*Caenorhabditis elegans* y *Galleria mellonella*. Evaluación del  
valor predictivo como marcadores pronósticos en la  
bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa***

**IRINA ALEXIS SÁNCHEZ DIENER**

**Director: Dr. Antonio Oliver Palomo**

**Directora: Dra. Laura Zamorano Páez**

**Tutor: Dr. Sebastián Albertí Serrano**

**Doctora por la Universitat de les Illes Balears**



*A mis padres*  
*A Sergio*



## **AGRADECIMIENTOS**

Al empezar esta página y echar la vista atrás, uno se da cuenta de la gran cantidad de personas que de una manera u otra han participado en hacer posible este trabajo. Me gustaría dejar a todas ellas unas palabras de agradecimiento, pidiendo disculpas de antemano si me he dejado a alguien.

En primer lugar quiero darles las gracias a mis padres, por su amor y por su entrega siempre. Por sacrificarse y estar siempre dispuestos a darnos lo mejor a mí y a mi hermana. Por todo el tiempo que me han dedicado, consejos y apoyo incondicional en todas las decisiones que he tomado. Por enseñarme a mirar las cosas con perspectiva y a enfrentarme a la vida. Porque sin ellos esto no habría sido posible. Gracias por ser como sois, un ejemplo.

A Sergio, por compartir su vida conmigo, por ser mi pilar, mi compañero y mi amigo. Por estar siempre dispuesto a darme todo su apoyo sin importar cuánto. Por su infinita paciencia, porque ha vivido en primera persona todos mis años de investigación y los meses de redacción de la Tesis dándome fuerzas y sabiendo siempre cómo hacerme sentir mejor. Por estar siempre, sin necesidad de pedírselo. Gracias por haberme hecho todo más fácil.

A mi hermana, por ser hermana y amiga, porque no te han faltado palabras de apoyo y consejos. Por estar siempre dispuesta a escucharme y darme fuerzas en los momentos de flaqueza. Por tu manera de alentarme en este camino. Gracias por estar ahí y preocuparte siempre.

Al Dr. Antonio Oliver, director de esta Tesis, por haberme transmitido la pasión por la investigación y la microbiología. Por toda la confianza que ha depositado en mí y por haberme dejado formar parte, ya desde la carrera como alumno colaborador, en su grupo de investigación. Por toda la ayuda que me ha ofrecido, no solo en la realización de la tesis sino en hacer posible mi permanencia en su grupo. Gracias por todo.

A la Dra. Laura Zamorano, gran investigadora y profesional, no solo por la inestimable ayuda que me ha ofrecido como directora de esta Tesis y por las horas que ha dedicado a dirigir este trabajo; sino también por el apoyo emocional que me ha ofrecido, porque 5 años dan para mucho y siempre he tenido una mano incondicional con la que contar. Gracias por acogerme desde que empecé, por el tiempo dedicado, ideas y apropiados consejos. Por ser amiga, maestra y referente. Mil gracias por todo, de verdad.

Al Dr. José Luis Pérez, exjefe del servicio de microbiología, por su cercanía, porque aunque el tiempo compartido ha sido breve, desde el principio me ha acogido y hecho sentir como un miembro más del equipo.

Al Dr. Sebastián Albertí, por toda su ayuda con los trámites que implican el doctorado, por su practicidad y forma de hacer sencillas las cosas.

Al Dr. Gabriel Cabot, por su paciencia y disponibilidad, por sacar tiempo para explicarme lo que sé de secuenciación, un mundo aparte que no es fácil de entender. Por su gran contribución en el análisis genético de los clones de alto riesgo ST175, porque sin su trabajo, parte de este no podría haberse realizado. Gracias.

Al Dr. Alfonso Navas, por su gran aportación en el uso del modelo invertebrado *Caenorhabditis elegans*, por estar siempre dispuesto a ayudar y por su en este trabajo con análisis factorial realizado. Gracias

Al Instituto de Salud Carlos III por haberme otorgado el Contrato Predoctoral de Formación en Investigación en Salud, y haber permitido formarme y desarrollar este proyecto que tanto me apasiona.

A Rebe por su contagiosa energía y alegría, por su disponibilidad y por esos achuchones tan necesarios que levantan el ánimo en los momentos de alti-bajos. A Ester, por su sentido del humor que tanto ha alegrado las mañanas, por su empatía y por esos abrazos tan espontáneos y tan de corazón. A Sara, por las conversaciones en las que pasaba el tiempo volando, por su serenidad y enfoque ante los problemas. A Mónica, por esos ratitos compartidos para despejarnos y los planes que nos quedan pendientes. Gracias por todos los momentos compartidos dentro y fuera del trabajo, consejos y palabras de apoyo, que siempre han sido bienvenidas. Gracias por ser tan buenas compañeras y amigas.

A Pablo, Ricardo y Loreto, porque como quien dice empezamos a la par y nos hemos visto evolucionar, por los momentos compartidos de risas y agobios, por haber sido unos magníficos compañeros. Gracias.

A mis compañeros del grupo de investigación, Carlos, Tomeu y Biel Torrens, por abrirme las puertas desde el día que empecé, haber compartido sus conocimientos conmigo y haberme brindado su ayuda siempre que la he necesitado. También quiero agradecer al resto de mis compañeros del grupo de micro, tanto a los que han empezado antes, como a los que se han incorporado recientemente y con los que he trabajado a diario, el haber compartido momentos de estrés y alegría y por haber estado siempre dispuestos a ayudarme.

A mis compañeros del servicio de Microbiología, Estrella, Xavi, Carla, Aina, Mariló, María, Paula, junto con el resto de servicio, por lo bien que me han tratado y acogido. Porque por *“buena-mala suerte”* con esta pandemia hemos podido conocernos un poquito más de cerca y mejor. Gracias a todos por vuestra cercanía, sentido del humor y compañerismo.

Al grupo de lípidos, Joan, Albert y Karim, compañeros de despacho y laboratorio desde los inicios. Gracias por vuestra amabilidad y por ser siempre tan resueltos.

A mis compañeros del Idisba, por haber estado en cualquier momento dispuestos a ayudar. Especialmente a Aina Millán, por sus explicaciones y el tiempo que me ha dedicado con la estadística. Gracias.

A mi familia política, Leonor, Antonio, Marina, Esteban, por haberme acogido como un miembro más hace tiempo, por su ayuda y haberse preocupado porque todo me saliese bien.

A mis amigas, a todas ellas, desde las de la infancia, Cris y Debo, y a las que por suerte he ido incorporando en mi vida desde el instituto o la universidad: Marina, Raquel, Nicola, Mari, Eva, Cati y Lorena, porque son un imprescindible. Porque han hecho de mi carga la suya y porque siempre han estado para darme su fuerza, su cariño y sus consejos. Por preocuparos por mí y por no haber fallado nunca. Gracias





## **INDICE**

<b>I. RESUMEN.....</b>	<b>i</b>
<b>II. PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO.....</b>	<b>vii</b>
<b>III. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....</b>	<b>viii</b>
<b><u>1. INTRODUCCIÓN</u></b>	
<b>1.1 Características generales de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Mecanismos de resistencia antibiótica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 Resistencia intrínseca.....	5
1.2.2 Resistencia adquirida.....	8
<b>1.3 Epidemiología de la resistencia a antibióticos: Clones de alto riesgo.....</b>	<b>15</b>
<b>1.4 Importancia clínica.....</b>	<b>22</b>
<b>1.5 Factores involucrados en la virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</b>	<b>23</b>
1.5.1 Adhesinas: lipopolisacárido, flagelo y pili tipo IV.....	25
1.5.2 Exotoxinas liberadas a través de los sistemas de secreción.....	28
1.5.3 Pigmentos involucrados en la virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	35
1.5.4 Mecanismos extracelulares involucrados en la virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	39
1.5.5 <i>Quorum sensing</i> como sistema de detección celular.....	40
1.5.6 Biopelículas.....	41
1.5.7 AmpR como regulador transcripcional de la virulencia.....	41
1.5.8 Islas de genómicas (PAGI) e islas de patogenicidad (PAPI).....	44
<b>1.6 Modelos invertebrados de infección: <i>Caenorhabditis elegans</i> y <i>Galleria mellonella</i>.....</b>	<b>44</b>
<b>1.7 Interacción entre el perfil de resistencia y la virulencia.....</b>	<b>54</b>
<b><u>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u></b>	
<b>2.1 Hipótesis y objetivos.....</b>	<b>58</b>
<b><u>3. MATERIAL Y MÉTODOS</u></b>	
<b>3.1. Cebadores utilizados en este trabajo.....</b>	<b>60</b>
<b>3.2. Cepas, colecciones bacterianas y variables usadas en el estudio.....</b>	<b>60</b>
3.2.1. Colección de aislados destinados al estudio.....	61
3.2.2. Variables relevantes utilizadas en este trabajo.....	62

<b>3.3. Estudio de los factores involucrados en la virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	63
3.3.1. Detección de las toxinas efectoras del Sistema de Secreción Tipo III.....	63
3.3.2. Ensayos de motilidad.....	64
3.3.3. Producción de los pigmentos piocianina y pioverdina.....	65
<b>3.4. Modelos invertebrados de infección usados para los estudios de virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	65
3.4.1. Letalidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el modelo invertebrado <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	65
3.4.1.1. Factores relacionados con la virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el modelo <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	67
3.4.2. Ensayos de mortalidad en el modelo <i>Galleria mellonella</i> .....	69
3.4.2.1. Factores asociados con la virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el modelo <i>Galleria mellonella</i> .....	69
<b>3.5. Análisis de los cambios genéticos en el clon ST175 asociados con la virulencia en ambos modelos</b> .....	70

#### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **CAPITULO I. Virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* en el modelo de *Caenorhabditis elegans***

<b><u>Parte I. Relación entre la virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, resistencia y factores de virulencia</u></b> .....	74
<b>4.1. Distribución de los aislados según su fenotipo de virulencia en <i>Caenorhabditis elegans</i></b> .....	76
<b>4.2. Virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en función del perfil de resistencia y la procedencia de los aislados</b> .....	77
<b>4.3. Efecto de los determinantes de virulencia: SST3, motilidad y producción de pigmentos, en la letalidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	80
<b>4.4. Clones de alto riesgo ST111, ST175 y ST235. Análisis mutacional del clon ST175</b> .....	85

4.4.1. Impacto de la mutación específica G154R AmpR en la virulencia de los clones de alto riesgo ST175.....	87
4.4.2. Estudio de las mutaciones involucradas en la virulencia de los clones de alto riesgo ST175.....	89
<b>4.5. Análisis de los factores asociados a la virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</b>	<b>92</b>
4.5.1. Análisis factorial de las variables estudiadas en función del origen, secuenciotipo y los determinantes de resistencia y virulencia.....	93
<b><u>Parte II.</u> Impacto de la virulencia en <i>Caenorhabditis elegans</i> en las características y el desenlace de las bacteriemias por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</b>	<b>97</b>
4.6. Distribución de los aislados procedentes de la colección de bacteriemia en función de su virulencia.....	99
4.7. Letalidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en función de su perfil de resistencia y del genotipo del SST3.....	100
4.8. Clones de alto riesgo XDR: Impacto del fenotipo de virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el desenlace de las infecciones por bacteriemia.....	102
4.9. Efecto de la virulencia en <i>Caenorhabditis elegans</i> en las características de las infecciones por bacteriemia por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	103
4.10. Relación entre la virulencia en <i>Caenorhabditis elegans</i> y la mortalidad en pacientes por bacteriemia por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	107
<b>CAPITULO II. Estudio de la virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el modelo de <i>Galleria mellonella</i>.....</b>	<b>112</b>
4.11. Relación entre el origen, el perfil de resistencia y la virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en el modelo de <i>Galleria mellonella</i> .....	114
4.12. Repercusión de los determinantes de virulencia: producción de pigmentos, motilidad y SST3, en la letalidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	117
4.13. Letalidad de los clones de alto riesgo principales ST111, ST175 y ST235 en el modelo de <i>Galleria mellonella</i> .....	121
4.13.1. Análisis de la letalidad de los clones de alto riesgo ST175 portadores de la mutación específica G154R en AmpR.....	122

4.13.2. Estudio de las mutaciones involucradas en la virulencia de los clones de alto riesgo ST175.....	123
4.14. Análisis de los factores asociados a la virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	124
4.15. Análisis comparativo de la virulencia entre los modelos <i>Caenorhabditis elegans</i> y <i>Galleria mellonella</i> .....	125
<b><u>5.CONCLUSIONES</u></b> .....	130
<b><u>6.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b> .....	135
<b><u>ANEXO I. MEDIOS DE CULTIVO Y TAMPONES</u></b> .....	187
<b><u>ANEXO II. PUBLICACIONES DERIVADAS</u></b> .....	189



## I. RESUMEN

*Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno resistente a múltiples tipos de antibióticos. Esta cualidad ha favorecido en las últimas décadas el incremento de las infecciones nosocomiales provocadas por cepas MDR/XDR, siendo especialmente relevantes las causadas por los denominados clones de alto riesgo. Dichos clones se encuentran diseminados a nivel mundial y los más extendidos en el territorio nacional son los ST175, ST111 y ST235. Este patógeno posee además, múltiples factores de virulencia que contribuyen a la patogenia de las infecciones (motilidad, pigmentos, sistemas de secreción de toxinas, etc.). Se ha demostrado en estudios previos que la expresión de algunos de estos factores tales como la motilidad, producción de pigmentos y eficacia biológica, se halla disminuida en los clones de alto riesgo mencionados. Asimismo, se ha determinado una relación entre el perfil de resistencia, clones de alto riesgo y genotipo del SST3. En concreto, se ha propuesto el gen *exoU* del SST3 como factor relevante en la mortalidad en infecciones del torrente sanguíneo por *P. aeruginosa*. Además la presencia de este gen en el clon ST235, mostró una elevada patogenicidad en un modelo murino. Sin embargo, los modelos mamíferos no resultan útiles para el análisis de grandes colecciones. En este sentido, en las últimas décadas los modelos invertebrados han demostrado ser válidos para realizar este tipo de estudios, dada su simplicidad experimental, bajo coste y ausencia de limitaciones éticas.

De acuerdo con lo anterior, el primer objetivo de este trabajo fue examinar si dicha interacción se cumplía en los modelos invertebrados de infección *Caenorhabditis elegans* y *Galleria mellonella* evaluando la virulencia de una colección de 140 aislados, para posteriormente determinar el valor predictivo de la letalidad en *C. elegans* como marcador pronóstico en la bacteriemia causada por *P. aeruginosa*.

Los resultados obtenidos nos permitieron demostrar en el modelo de *C. elegans* una relación inversa y significativa entre la resistencia y virulencia de *P. aeruginosa*, mostrándose la virulencia más baja en los perfiles XDR. Sin embargo, la virulencia de los clones de alto riesgo MDR/XDR varió ampliamente, los ST111 y ST235 fueron virulentos, mientras que los ST175 mostraron una virulencia reducida. Aunque, la pérdida de virulencia no se pudo atribuir a ninguna mutación, la presencia de un polimorfismo en un gen se asoció con un aumento de esta. La elevada virulencia del ST235 se podría atribuir a la presencia de la toxina ExoU del SST3, también relacionada con una mayor virulencia en este modelo. Otros factores como la motilidad y la producción de pigmentos, no fueron esenciales para la virulencia en el modelo de

*C.elegans*. Por lo que respecta al modelo de *G. mellonella*, también se documentó una relación inversa entre la resistencia y la virulencia. Al igual que en *C. elegans*, el ST175 mostró una virulencia variable, mientras que los ST111 y ST235 fueron virulentos; sin embargo, la variación de la virulencia del ST175, no se pudo atribuir a ningún cambio genético. El único factor de virulencia asociado con la letalidad de *G. mellonella* fue la motilidad. Mientras que los que se asociaron de forma independiente con la virulencia de *P. aeruginosa* fueron los perfiles ModR y MultiS, y la procedencia epidémica de los aislados.

Como consecuencia de los resultados obtenidos en el modelo de *C. elegans*, y a fin de llevar a cabo el segundo objetivo basado en evaluar la virulencia en este modelo como indicador pronóstico; se amplió el estudio con 593 cepas de bacteriemia por *P. aeruginosa*. Los resultados indicaron que en *C. elegans* el fenotipo de virulencia se correlacionó con el perfil de resistencia, el genotipo del SST3 y con ciertas características clínicas de los pacientes; asociándose los fenotipos no virulentos con una mayor gravedad de la enfermedad. Sin embargo, no se observó una relación entre el fenotipo de virulencia y la mortalidad en pacientes, indicando que *C. elegans* no es un buen indicador pronóstico para este tipo de infecciones.



## I. RESUM

*Pseudomonas aeruginosa* és un patògen resistent a múltiples tipus d'antibiòtics. Aquesta qualitat ha afavorit a les darreres dècades l'increment de les infeccions nosocomials provocades per soques MDR/XDR, essent especialment rellevants les causades pels denominats clons d'alt risc. Aquests clons es troben disseminats a nivell mundial i els més estesos al territori nacional són els ST175, ST111 i ST235. Aquest patògen a més posseeix múltiples factors de virulència que contribueixen a la patogènia de les infeccions (motilitat, pigments, sistemes de secreció de toxines, etc.). S'ha demostrat en estudis previs que l'expressió d'alguns d'aquests factors com la motilitat, producció de pigments i l'eficàcia biològica, es troben disminuïdes als clons d'alt risc esmentats. També s'ha determinat una relació entre el perfil de resistència, clons d'alt risc i genotip del SST3. En particular, s'ha proposat el gen *exoU* del SST3 com a factor rellevant de mortalitat en infeccions del torrent sanguini per *P. aeruginosa*. A més la presència d'aquest gen al clon ST235, va mostrar una elevada patogenicitat a un model murí. No obstant això, els models mamífers no resulten útils per a l'anàlisi de grans col·leccions. En aquest sentit, durant les darreres dècades els models invertebrats han demostrat ser vàlids per a realitzar aquest tipus d'estudis, donada la seva simplicitat experimental, baix cost i absència de limitacions ètiques.

D'acord amb l'exposat, el primer objectiu d'aquest treball va ser examinar si aquesta interacció es complia als models invertebrats d'infecció *Caenorhabditis elegans* i *Galleria mellonella* avaluant la virulència d'una col·lecció de 140 aïllats, per a posteriorment determinar el valor predictiu de la letalitat a *C. elegans* com a marcador pronòstic de la bacterièmia causada per *P. aeruginosa*.

Els resultats obtinguts ens van permetre demostrar al model *C. elegans* una relació inversa i significativa entre la resistència i virulència de *P. aeruginosa*, mostrant-se la virulència més baixa als perfils XDR. No obstant això, la virulència dels clons d'alt risc MDR/XDR va variar àmpliament, els ST111 i ST235 van ser virulents, mentre que els ST175 van mostrar una virulència reduïda. Encara que la pèrdua de virulència no es va poder atribuir a cap mutació, la presència d'un polimorfisme a un gen es va associar amb un augment d'aquesta. L'elevada virulència del ST235 es podria atribuir a la presència de la toxina ExoU del SST3, també relacionada amb una major virulència en aquest model. Altres factors com la motilitat i la producció de pigments, no van ser essencials per a la virulència al model de *C. elegans*.

Pel que respecta al model de *G. mellonella*, també es va documentar una relació inversa entre la resistència i la virulència. De la mateixa manera que a *C. elegans*, l'ST175 va mostrar una virulència variable, mentre que els ST111 i ST235 van ser virulents; no obstant això, la variació de la virulència del ST175, no es va poder atribuir a cap canvi genètic. L'únic factor de virulència associat amb la letalitat de *G. mellonella* va ser la motilitat. Mentre que els que es van associar de manera independent amb la virulència de *P. aeruginosa* van ser els perfils ModR i MultiS, i la procedència epidèmica dels aïllats.

A conseqüència dels resultats obtinguts al model de *C. elegans*, i a fi de dur a terme el segon objectiu basat en avaluar la virulència en aquest model com a indicador pronòstic; es va ampliar l'estudi amb 593 soques de bacterièmia per *P. aeruginosa*. Els resultats van indicar que el fenotip de virulència a *C. elegans* es va correlacionar amb el perfil de resistència, el genotip del SST3 i amb certes característiques clíniques dels pacients; associant-se els fenotips no virulents amb una major gravetat de la malaltia. Tot i així, no es va observar una relació entre el fenotip de virulència i la mortalitat en pacients, indicant que *C. elegans* no és un bon indicador pronòstic per a aquesta mena d'infeccions.

## **I. SUMMARY**

*Pseudomonas aeruginosa* is a pathogen resistant to multiple types of antibiotics. Over the last decades this quality has led to an increase of nosocomial infections caused by MDR/XDR strains, being especially relevant those caused by so-called high-risk clones. These clones are spread worldwide, being ST175, ST111 and ST235 the most widespread nationally. This pathogen also has multiple virulence factors that contribute to the pathogenesis of infections (motility, pigments, toxin secretion systems, etc.). Previous studies have shown that high-risk clones mentioned above have been associated with a decrease of expression of motility, pigments, and fitness. In addition, a relationship between resistance profile, high-risk clones and T3SS genotype has been defined. Specifically, the T3SS *exoU* gene has been proposed as a relevant factor for mortality from *P. aeruginosa* bloodstream infections. Furthermore, in a murine model the presence of this gene in the ST235 clone was associated with high pathogenicity. However, mammalian models are not useful for the analysis of large collections. In this context, in recent decades, invertebrate models have proven to be valid for conducting these types of studies, given their experimental simplicity, low cost, and the absence of ethical issues.

Accordingly, the first objective of this work was to examine whether this interaction was fulfilled in invertebrate infection models *Caenorhabditis elegans* and *Galleria mellonella*, evaluating the virulence of a 140 isolates collection, to subsequently evaluate the predictive value of lethality in *C. elegans* as a prognostic marker of bacteraemia caused by *P. aeruginosa*

The results obtained allowed us to document in the *C. elegans* model a clear inverse relation between resistance and virulence of *P. aeruginosa*, showing the lowest virulence in the XDR profiles. However, virulence varied widely between high-risk clones MDR/XDR, as ST111 and ST235 were virulent, while ST175 were less so. Although, the loss of virulence could not be attributed to any mutation, the presence of a polymorphism in a gene was associated with increased virulence. The high virulence of ST235 could be attributed to the presence of the ExoU toxin in T3SS, related to the increased virulence in this model. Other factors, such as motility and pigment production, were not relevant for virulence in the *C. elegans* model. As regards the *G.mellonella* model, an inverse relationship between resistance and virulence was also documented. As in *C. elegans* model, ST175 showed variable virulence, while ST111 and ST235 clones were virulent; but, the variation in virulence of ST175 could not be

attributed to any genetic change. Motility was the only virulence factor associated with the lethality of *G. mellonella*. While those independently associated with the virulence of *P. aeruginosa* were the ModR and MultiS profiles, and the epidemic origin of the isolates.

As a consequence of the results obtained in *C. elegans* model, and in order to carry out the second objective which was to evaluate virulence in this model as a prognostic indicator, the study was extended with 593 *P. aeruginosa* bacteraemia strains. The results indicated that in *C. elegans*, the virulence phenotype was correlated with the resistance profile, the T3SS genotype and with certain clinical characteristics of the patients, with non-virulent phenotypes being associated with a greater severity of the disease. However, no relation was observed between virulence phenotype and patient's mortality, indicating that *C. elegans* is not a good prognostic indicator for this type of infection.

## **II. PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO**

**Sánchez-Diener I, Zamorano L, López-Causapé C, Cabot G, Mulet X, Peña C, del Campo R, Cantón R, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Arcos SC, Navas A, Oliver A (2017).** Interplay among resistance profiles, high-risk clones, and virulence in the *Caenorhabditis elegans Pseudomonas aeruginosa* infection model. *Antimicrob Agents Chemother*, 61(12), e01586-17.

**Sánchez-Diener I, Zamorano L, Peña C, Ocampo-Sosa A, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Almirante B, Aguilar M, Granados A, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Rodríguez-López F, Tubau F, Martínez-Martínez L, Navas A, Oliver A (2020).** Weighting the impact of virulence on the outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections *Clin Microbiol Infect*, 26(3), 351-357.

Véase artículos completos en el Anexo II

### **III. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

**ABC:** Bomba de eflujo *ATP-Binding Cassette*

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADP:** Adenosín difosfato

**ADPRT:** ADP-ribosiltransferasa C-terminal

**AMP:** Péptidos antimicrobianos

**AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNt:** Ácido ribonucleico de transferencia

**ATP:** Adenosín trifosfato

**BLEE:**  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido

**CEVS:** Puntuación de virulencia de *Caenorhabditis elegans*.

**CFTR:** Regulador de conductancia transmembranal de la fibrosis quística

**CLSI:** *Clinical and Laboratory Standards Institute*

**CMI:** Concentración mínima inhibitoria

**DL50:** Dosis letal del 50% de la población

**DOPA:** Dihidroxifenilalanina

**ECDC:** Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades

**ECF:** Factor sigma de la familia extracitoplasmática

**EDTA:** Ácido etileno-diamino-tetra-acético

**EPOC:** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

**EUCAST:** *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

**FQ:** Fibrosis Quística

**GAP:** GTPasa N-terminal

**GSH:** Glutación celular

**GSL:** Glicosfingolípidos

**IL:** Interleuquinas

**LB:** Luria Bertani

**LES:** *Liverpool epidemic strain*

**LPS:** Lipopolisacárido

**MATE:** Bomba de eflujo *Multiple Antibiotic and Toxin Extrusion*.

**MBL:** Metalo- $\beta$ -lactamasa.

**MDR:** Multirresistente (*multidrug-resistant*).

**MFS:** Bomba de eflujo *Major facilitator superfamily*.

**MLST:** Tipificación de Secuencias Multilocus.

**ModR:** Moderadamente resistente (*moderately resistant*)

**MultiS (S):** Sensible (*Susceptible*)

**NAG:** N-acetilglucosamina

**NAM:** Ácido N-acetilmurámico

**NAV:** Neumonía asociada a ventilación mecánica.

**NF- $\kappa$ B:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

**NGAL:** Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos

**OR:** Odds Ratio

**PAGI:** Isla genómica de *Pseudomonas aeruginosa*.

**PAPI:** Isla de patogenicidad de *P. aeruginosa*.

**PBS:** *Phosphate Buffered Saline*.

**PCN:** Piocianina

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PDA:** Patata dextrosa agar

**PDR:** Panresistente (*pandrug-resistant*)

**PG:** Peptidoglicano

**PO:** Fenoloxidasa

**PQS:** *Pseudomonas Quinolone signal*

**proPO:** Pro-fenoloxidasa

**PRRs:** Receptor de reconocimiento de patrones

**PVDI/II/III:** Pioverdina tipo I/II/III

**QRDR:** Región determinante de resistencia a quinolonas.

**QS:** *Quorum sensing*.

**RANTES:** *Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*.

**RND:** Bomba de eflujo *Resistance-nodulation-cell division*.

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno.

**rpm:** revoluciones por minuto.

**SCV:** *Small colony variant*.

**SDC:** Sistema de regulación de dos componentes.

**SDMO:** Síndrome de disfunción multiorgánica

**SENTRY:** Programa de Vigilancia antimicrobiana.

**SMR:** Bomba de eflujo *Small multidrug resistance*.

**SST3-6:** Sistema de secreción tipo 3-6

**ST:** Secuenciotipo.

**TLR:** Receptores de tipo Toll.

**UCI:** Unidad de cuidados intensivos.

**UFC:** Unidad formadora de colonias.

**XDR:** Extremadamente resistente (*Extensively drug resistant*)





# 1.INTRODUCCIÓN



## 1.1 Características generales de *Pseudomonas aeruginosa*

El género *Pseudomonas* descrito por Migula en 1894 (Migula, 1984), es uno de los géneros bacterianos más diversos y ubicuos, ya que las especies que lo conforman se han aislado por todo el mundo y en ambientes muy diversos (Peix *et al.*, 2009; Palleroni, 1992). Dentro del género *Pseudomonas*, el microorganismo que tiene especial interés es *Pseudomonas aeruginosa*, dada su capacidad de infectar humanos y producir enfermedades nosocomiales graves.

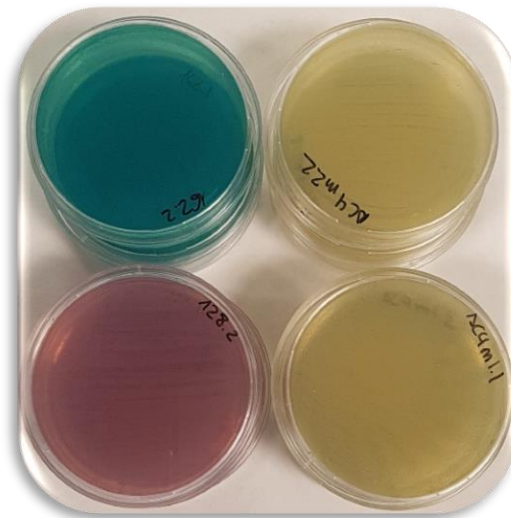


**Figura 1.1.** Tinción de Gram en *P. aeruginosa*  
(<https://www.immedicohospitalario.es/>)

Este patógeno es un bacilo gram negativo de 1.5-5  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.5-1  $\mu\text{m}$  de ancho, que pertenece a la clase de las Gammaproteobacterias (Smith & Iglewski, 2003). Está dotado de uno o varios flagelos polares que le confieren movilidad (Holt *et al.*, 1994) y su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C; aunque algunas cepas han mostrado cierto crecimiento a 4°C y a 42°C (Anuj & Whiley, 2010; Kiska & Gilligan, 2003). Es un microorganismo no fermentador y no formador de esporas (Holt *et al.*, 1994). Generalmente posee un metabolismo aerobio utilizando el oxígeno como aceptor final de electrones, aunque en condiciones de anaerobiosis es capaz de utilizar el nitrato como aceptor final (Robertson *et al.*, 1989). Responde de forma positiva a las pruebas bioquímicas de la oxidasa y catalasa, y de forma negativa al indol (Kiska & Gilligan, 2003). No obstante, a pesar de la gran diversidad genotípica, fenotípica, y metabólica de este género, se establecieron como características definitorias, la presencia del gen de la lipoproteína I de la membrana externa (*oprI*), y de ácidos grasos típicos del género (Stead, 1992).

Normalmente se muestra en forma de colonias anchas, aplanadas, con bordes serrados y un brillo verde metálico en su superficie. Dicha pigmentación se debe a la producción de pigmentos hidrosolubles como la piocianina (azul) y la pioverdina

(amarillo-verdoso fluorescente). Con menor frecuencia, también es capaz de sintetizar, piorrubina (rojo) y piomelanina (marrón); confiriéndole esta última a una mayor protección frente el estrés oxidativo y/o lumínico (UV), y persistencia en infecciones pulmonares crónicas (Rodríguez-Rojas *et al.*, 2009; Meyer, 2000). Asimismo, las colonias de *P. aeruginosa* se caracterizan por desprender un aroma dulzón producido por diferentes compuestos volátiles (Kiska & Gilligan, 2003), algunos de los cuales, como la 2-aminocetofenona (Scott-Thomas *et al.*, 2010) y la 2-octanona o el 3-metilheptano (Bean *et al.*, 2016) han sido propuestos como biomarcadores de infección.



**Figura 1.2.** Pigmentos secretados por *P.aeruginosa* en medio *Potato dextrose agar*(PDA) usado para la alimentación y reproducción de los nematodos, así como para los estudios de virulencia.

Es un microorganismo que tiene especial predilección por reservorios ambientales húmedos (Holt *et al.*, 1994), como la superficie de frutas, verduras, duchas, soluciones de lentes de contacto, etc., pudiendo ser una causa de infección comunitaria (Holland *et al.*, 1993; Pollack, 1984). Asimismo, debido a su capacidad de sobrevivir en multitud de nichos ecológicos (Palleroni, 1992), también es capaz de infectar a una multitud de organismos, incluida la levadura *Candida albicans* (Hogan & Kolter, 2002), el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Tan *et al.*, 1999), plantas como *Arabidopsis thaliana* (Walker *et al.*, 2004) e insectos como *Drosophila melanogaster* y *Galleria mellonella* (Jander *et al.*, 2000). En humanos, puede ser considerado miembro de la microbiota de individuos sanos, ya sea en zonas expuestas (mucosa nasal y axilas), como en el sistema digestivo. Sin embargo, en ciertas ocasiones puede llegar a causar infecciones graves (Pollack, 1984). De hecho, gracias a su capacidad de crecer en medios mínimos (antisépticos, jabones,

equipos de respiración asistida, etc.), los pacientes hospitalizados durante largos periodos de tiempo, inmunodeprimidos o tratados con antibióticos de amplio espectro, suelen presentar una tasa de colonización muy elevada. Situación que implica un mayor riesgo de derivar en una infección nosocomial, causando a menudo sepsis que pueden llegar a ser fatales (Takesue *et al.*, 2002; Pollack, 1984).

En ciertas infecciones pulmonares, como la fibrosis quística (FQ) o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), se ha observado que *P. aeruginosa* puede presentar fenotipos mucoides (debido a la producción masiva de alginato) o variantes de colonia pequeña (*small colony variants*, SCV). Ambos fenotipos le proporcionan una mayor capacidad para formar biopelículas y resistencia a los antimicrobianos, motivo por el cual se asocian a una peor condición clínica y a un aumento significativo de la mortalidad (Evans, 2015; Pritt *et al.*, 2007).

#### • Genoma de *Pseudomonas aeruginosa*

El desarrollo de métodos de análisis moleculares, como la comparación de secuencias del gen que codifica para el ARNr16S, han permitido definir la taxonomía de muchas especies bacterianas, entre ellas la del género *Pseudomonas*. Este género inicialmente se dividió en cinco grupos (Palleroni *et al.*, 1973), aunque después de diversas revisiones, aislados que se encontraban clasificados dentro del género *Pseudomonas*, fueron reagrupados en los géneros *Burkholderia*, *Acidivorax*, *Comamonas*, *Brevundimonas* y *Stenotrophomonas*; donde se encuentran las especies pertenecientes a los grupos II, III, IV y V, de acuerdo a la clasificación inicial (Kerstens *et al.*, 1996). Igualmente, otras cepas previamente clasificadas dentro de los géneros *Chryseomonas* y *Flavimonas* actualmente se incluyen dentro del género *Pseudomonas*. De modo que el género *Pseudomonas* lo conforman las especies incluidas en el grupo I: *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. stutzeri*, *P. veronii*, *P. fluorescens*, *P. alcaligenes*, *P. monteilii*, *P. luteola*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. oryzihabitans* y *P. mendocina* (Anzai *et al.*, 2000; Anzai *et al.* 1997; Kersters *et al.*, 1996).

En el año 2000, Stover y su equipo secuenciaron el genoma completo de la cepa de referencia de *P. aeruginosa* PAO1 (Stover *et al.*, 2000). Su cromosoma es circular con un tamaño de 6.3 millones de pares de bases (más grande que el de otros genomas bacterianos secuenciados), y posee un alto contenido de G+C (65–67%). Además, alberga 5.570 marcos abiertos de lectura (*Open Reading Frames*, ORFs), de los cuales se conoce la función de menos de la mitad. Dentro de la gran cantidad de genes que codifica,

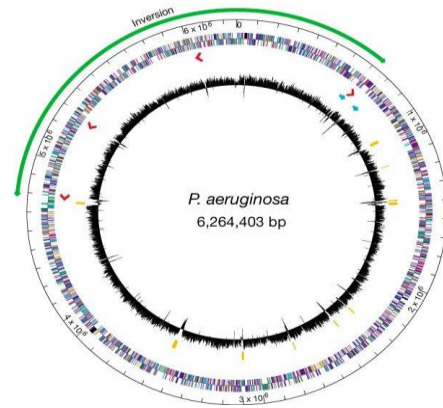
destacan aquellos implicados en la regulación metabólica (>9.4%), ya que le confieren una gran versatilidad y como consecuencia, adaptarse a entornos complejos, pudiendo utilizar más de ochenta compuestos orgánicos (Kiska & Gilligan, 2003); y resistir a una gran variedad de sustancias antimicrobianas, metabolizando y expulsando sustancias tóxicas (Anuj & Whiley, 2010; Stover *et al.*, 2000).

A la gran versatilidad cromosómica mencionada, se le añade la capacidad de acumular mutaciones en el genoma y/o adquirir genes por medio de transferencia horizontal que le permiten, hacerse resistente a múltiples familias de antibióticos y generar mutaciones compensatorias con el fin de mitigar la pérdida de eficacia biológica (*fitness*) adaptándose de forma eficaz al medio (Stover *et al.*, 2000). Curiosamente, y a diferencia de la mayoría de

los patógenos, los genes involucrados en la virulencia de *P. aeruginosa* se encuentran codificados en su genoma, por tanto están presentes en la mayoría de las cepas (Stover *et al.*, 2000). No obstante, algunas cepas presentan diferencias considerables en su virulencia, probablemente debido a la presencia de islas genómicas adicionales, denominadas PAPI (*Pseudomonas aeruginosa* Pathogenicity Islands) o PAGI (*Pseudomonas aeruginosa* Genomic Islands), las cuales contribuyen a la plasticidad del genoma bacteriano proporcionando generalmente una ganancia de función; y dado que promueven la transferencia de múltiples familias de genes, pueden producir modificaciones en el fenotipo bacteriano (Klockgether *et al.*, 2007; Cheetham & Katz, 1995).

## 1.2 Mecanismos de resistencia antibiótica de *Pseudomonas aeruginosa*

En las últimas décadas el uso erróneo y excesivo de los antibióticos, ha provocado que el tratamiento en pacientes hospitalizados y con infecciones crónicas muchas veces sea ineficaz. Esto se debe a la extraordinaria capacidad que posee *P. aeruginosa* para adquirir resistencia a casi cualquier antibiótico, ya sea de forma intrínseca o adquirida.



**Figura 1.3.** Genoma de *P. aeruginosa* PAO1 (Stover *et al.*, 2000)

### 1.2.1 Resistencia intrínseca

La resistencia intrínseca se define como la capacidad innata que posee la bacteria para hacerse resistente a los antibióticos a través de características funcionales y/o estructurales propias. En *P. aeruginosa* destacan la  $\beta$ -lactamasa cromosómica AmpC, las bombas de eflujo y las porinas.

#### 1.2.1.1 Resistencia mediada por la $\beta$ -lactamasa cromosómica AmpC.

*P. aeruginosa* presenta dos tipos de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas: la cefalosporinasa AmpC (Lodge *et al.*, 1990) y la oxacilinasasa, PoxB (Kong *et al.*, 2005). Sin embargo, AmpC es la que tiene mayor relevancia clínica, ya que es el mecanismo principal de resistencia de *P. aeruginosa* frente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Lodge *et al.*, 1990). Fue descrita por primera vez en la familia *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter cloacae* y *Citrobacter freundii*) (Lodge *et al.*, 1993). Es una serin- $\beta$ -lactamasa que pertenece al grupo 1 de la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros (Bush *et al.*, 1995) y a la clase C, de la clasificación de Ambler (Ambler, 1980).

Esta enzima, en condiciones normales se expresa de forma basal, pero su actividad puede verse incrementada por la exposición a antibióticos inductores, como ciertos carbapenémicos (imipenem, meropenem), penicilinas (ampicilina) y cefalosporinas (cefotaxima y cefalotina). A diferencia del resto, los inductores carbapenémicos, no son hidrolizados por AmpC, de forma que mantienen su actividad frente a *P. aeruginosa* (Livermore, 1995). Además, los considerados inhibidores clásicos de  $\beta$ -lactamasas, como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, no afectan a dicha enzima y por tanto, tampoco inhiben su actividad (Lodge *et al.*, 1990).

Dado que la función de los  $\beta$ -lactámicos radica en inhibir la síntesis de la pared celular (Lodge *et al.*, 1990), la inducción de AmpC es un proceso íntimamente ligado al reciclaje del peptidoglicano (PG). En su regulación intervienen diversos genes, entre los que cabe destacar: *ampR*, *ampD*, *ampDh2*, *ampDh3* y *dacB*:

- **AmpR**, es un regulador transcripcional global que juega un papel esencial en la virulencia (véase apartado 1.5.6 de la Introducción) y en la resistencia de *P. aeruginosa*. Por lo que respecta a su papel en la resistencia, puede actuar como activador y como represor de la  $\beta$ -lactamasa. Normalmente se encuentra en su conformación de represor,

sin embargo, en presencia de  $\beta$ -lactámicos, pasa a su forma activa induciendo la producción de AmpC (Mark *et al.*, 2011), cuyo mecanismo será explicado más adelante.

- **AmpD** es una amidasa (*N*-acetil-anhidromuramil-L-alanina) citosólica que hidroliza los 1,6-anhidromurapéptidos (moléculas señal involucradas en la inducción de *ampC*) procedentes del reciclaje del PG. *P. aeruginosa* codifica tres genes *ampD*: *ampD*, *ampDh2* y *ampDh3* que trabajan conjuntamente para reprimir la inducción de AmpC (Juan *et al.*, 2006). Mientras que la localización de AmpD es citosólica y la de AmpDh2 es periplásmica, la localización de AmpDh3 es todavía desconocida (Zhang *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la inactivación gradual de estos tres genes resulta en una activación progresiva de la expresión de *ampC*, permitiendo a *P. aeruginosa* mantener el equilibrio entre la eficacia biológica y la virulencia asociadas con la hiperproducción constitutiva de alto nivel de AmpC (Moya *et al.*, 2008). Sin embargo, la inactivación de las tres amidasas conlleva a una pérdida importante de la eficacia biológica y la virulencia tanto en un modelo murino (Moya *et al.*, 2008) como en el modelo de *G. mellonella*, comprometiendo severamente la tasa de crecimiento, motilidad y citotoxicidad de *P.aeruginosa* (Pérez-Gallego *et al.*, 2016).

- ***dacB*** es un gen que codifica para la proteína de unión a la penicilina no esencial PBP4, la cual tiene actividad DD-carboxipeptidasa y DD-endopeptidasa y desempeña un papel auxiliar en la polimerización, reticulación y modificación del peptidoglicano bacteriano (Sauvage *et al.*, 2008). Dicha proteína actúa como falsa diana de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, de modo que al ser bloqueada por uno de estos antimicrobianos promueve la transcripción AmpC (Moya *et al.*, 2009).

Como veremos en el siguiente apartado, durante el tratamiento con  $\beta$ -lactámicos, *P. aeruginosa* puede adquirir mutaciones en los genes implicados en la regulación de AmpC, dando lugar a la hiperexpresión de esta  $\beta$ -lactamasa que, pese a ser un proceso reversible, este hecho conlleva muchas veces al fracaso terapéutico (Mark *et al.*, 2011)

### **1.2.1.2 Bombas de eflujo.**

Las bombas de eflujo son un conjunto de proteínas transportadoras involucradas en la expulsión de multitud de sustratos tóxicos, así como en la captación de iones y nutrientes esenciales. La presencia de las mismas, contribuye de forma importante a la resistencia de *P. aeruginosa* a los antibióticos (Evans *et al.*, 1998). En función de la especificidad que presentan por sus sustratos, de la similitud en la secuencia de aminoácidos y del tipo de fuente de energía requerida para su funcionamiento, se han



agrupado en 5 superfamilias: *ATP-binding cassette* (ABC), *multiple antibiotic and toxin extrusion* (MATE), *major facilitator superfamily* (MFS), *resistance-nodulation-cell division* (RND) y *small multidrug resistance* (SMR).

La superfamilia mejor estudiada es la RND, la cual consiste en un transportador situado en membrana interna, una proteína de fusión de membrana y una proteína de membrana externa o porina (Li & Nikaido, 2004). Esta conformación tripartita le permite expulsar varios tipos de sustratos, otorgando a *P. aeruginosa* resistencia frente una gran cantidad de antimicrobianos no relacionados estructuralmente entre sí. Además, se ha demostrado que desempeñan un papel en la patogenicidad de las bacterias, afectando principalmente a la colonización, la infección y a la persistencia de microorganismos en el huésped (Piddock, 2006).

En *P. aeruginosa* destacan cuatro bombas de flujo RND que pueden expresarse a niveles bajos, de forma constitutiva, o sobreexpresarse debido a mutaciones en el represor: MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprN. Entre un 10% y un 30% de las cepas clínicas hiperexpresan las bombas MexAB-OprM y MexXY-OprM, mientras que la prevalencia general de hiperexpresión de MexCD-OprJ y MexEF-OprN es mucho menor (<5%) y afecta principalmente a las fluoroquinolonas (Riera *et al.*, 2011).

**MexAB-OprM:** es capaz de expulsar antibióticos de diferentes grupos, incluyendo fluoroquinolonas,  $\beta$ -lactámicos (excepto imipenem), inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, tetraciclinas, macrólidos, cloranfenicol, sulfonamidas, novobiocina y trimetoprim (Li *et al.*, 2015; Livermore, 2002). Es la bomba que más  $\beta$ -lactámicos utiliza como sustrato. La expresión constitutiva de este operón se encuentra regulada por los genes *mexR* (*nalB*), *nalC* y *nalD*, que actúan como reguladores negativos (Morita *et al.*, 2006; Sobel *et al.*, 2005; Adewoye *et al.*, 2002; Poole, 2001), y por la detección de QS, pues a medida que aumenta la densidad poblacional aumenta la expresión de dicha bomba, hasta llegar a su máximo en la fase exponencial (Maseda *et al.*, 2004).

**MexXY-OprM:** utiliza como sustratos las fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos, quinolonas, cloranfenicol y  $\beta$ -lactámicos [penicilinas (excepto carbenicilina y sulbenicilina), cefalosporinas (excepto ceftazidima y cefsulodina) y carbapenémicos (Hocquet *et al.*, 2003; Masuda *et al.*, 2000). Su regulación esta mediada por el gen *mexZ* (Llanes *et al.*, 2004) y por tanto, su hiperexpresión se debe a mutaciones en este gen (Poole, 2011).

**MexCD-OprJ:** presenta una expresión basal reducida, regulada por el gen *nfxB* (Mulet *et al.*, 2009; Poole *et al.*, 1996). Tiene la capacidad de expulsar al medio extracelular, tetraciclinas, fluoroquinolonas, macrólidos, cloranfenicol, novobiocina, trimetoprim y ciertos  $\beta$ -lactámicos, como penicilinas (a excepción de carbenicilina y sulbenicilina), cefalosporinas de cuarta generación y meropenem (Gotoh *et al.*, 1998; Srikumar *et al.*, 1998).

**MexEF-OprN:** regulada por los genes *mexT* y *mexS*, presenta una expresión basal muy reducida y una relación inversa con la expresión del sistema MexAB (Mulet *et al.*, 2009; Köhler *et al.*, 2007; Sobel *et al.*, 2005). Su hiperexpresión se debe a mutaciones en estos genes y en *nfxC*. (Mulet *et al.*, 2009; Sobel *et al.*, 2005). A diferencia del resto de bombas, no presenta afinidad por los  $\beta$ -lactámicos. Sin embargo, sí que tiene afinidad por las fluoroquinolonas, el trimetoprim y el cloranfenicol (Köhler *et al.*, 1999).

### **1.2.1.3 Disminución de la permeabilidad.**

En la membrana externa de las bacterias se encuentran unos canales proteicos denominados porinas, a través de los cuales las bacterias expulsan y captan sustancias del medio (Delcour, 2009). La porina predominante en *P. aeruginosa* es OprF, responsable de la absorción lenta e inespecífica de iones y sacáridos (Bellido *et al.*, 1992). Esta puede aparecer en las conformaciones, abierta y cerrada; y a excepción del menos del 5% de las porinas OprF, la gran mayoría se presenta en su conformación cerrada (Sugawara *et al.*, 2006). Motivo que podría explicar por qué la membrana de *P. aeruginosa* muestra una permeabilidad menor que la de otras bacterias, dado que se ha demostrado que es de 12 a 100 veces inferior que la de *Escherichia coli* (Bellido *et al.*, 1992). Esta propiedad es un factor importante que mejora otros mecanismos de resistencia, y a menudo, proporciona resistencias a múltiples fármacos en este patógeno nosocomial (Sugawara *et al.*, 2012).

### **1.2.2 Resistencia adquirida:**

*P. aeruginosa* además de su resistencia intrínseca, puede adquirir resistencias a múltiples fármacos mediante la selección de mutaciones en genes cromosómicos implicados en la regulación de la expresión de *ampC*, bombas de eflujo, topoisomerasas, etc., y/o a la adquisición de genes de resistencia por transferencia horizontal, como aquellos que codifican para Metallo- $\beta$ -lactamasas (Gupta, 2008) y  $\beta$  -lactamasas de

espectro extendido que a menudo se transfieren junto con genes que codifican enzimas modificantes de aminoglucósidos (Lister *et al.*, 2009; Poole, 2005).

### **1.2.2.1 Mutaciones en genes cromosómicos**

#### **A) Mutaciones en los sistemas de regulación de AmpC:**

Tal y como se ha mencionado en el apartado previo, la hiperexpresión de AmpC está intrínsecamente ligada al reciclaje del PG, cuya estructura se encuentra formada por una secuencia alternante de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y N-acetilmurámico (MurNAc) unidos mediante enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 (Boneca, 2005). Las mutaciones implicadas en el sistema de regulación de AmpC o del reciclaje del PG probablemente sean el mecanismo más importante de resistencia a  $\beta$ -lactámicos en *P. aeruginosa*. Estos cambios pueden desencadenar la hiperexpresión de esta enzima de forma irreversible y sin necesidad de la presencia de un inductor, reduciendo su sensibilidad a casi todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Lister *et al.*, 2009), como las cefalosporinas de amplio espectro (Moya *et al.*, 2009; Juan *et al.*, 2006) y las penicilinas antipseudomónicas (Dubois *et al.*, 2008; Cavallo *et al.*, 2007). Las principales mutaciones que conducen a la desrepresión de esta  $\beta$ -lactamasa tienen lugar en los genes *ampR*, *ampD* y *dacB*.

A pesar de que en enterobacterias son comunes las mutaciones que conllevan a que *ampR* adopte su conformación de activador de la expresión de *ampC*, en *P. aeruginosa* es un mecanismo poco frecuente (Cabot *et al.*, 2012; Juan *et al.*, 2005; Bagge *et al.*, 2002). En este patógeno la causa principal de desrepresión de *ampC* se debe a la inactivación de *dacB* y/o la amidasa AmpD (Moya *et al.*, 2009; Juan *et al.*, 2006). De modo que las mutaciones que producen la inactivación de *dacB*, que codifica para la PBP4, conllevan a la activación de la transcripción de AmpC (Moya *et al.*, 2009). De la misma manera que las mutaciones que producen la inactivación de *ampD* o de *ampD* más alguno de sus homólogos (*ampDh2* y/o *ampDh3*) implican el cese de su función de represor, ocasionando la expresión de *ampC* (Juan *et al.*, 2006).

Pese a que las mutaciones en *ampD* se encuentran con frecuencia entre los aislados clínicos, la desrepresión completa de *ampC* no se debe a la inactivación adicional de *ampDh2* y *ampDh3* (Mark *et al.*, 2011). En ausencia de  $\beta$ -lactámicos, AmpD controla la concentración citosólica del péptido 1,6-anhidro-MurNAc procedente del reciclaje del PG, eliminando su parte peptídica (D-ala-D-ala). El UDP-MurNAc generado por AmpD interactúa con AmpR favoreciendo su conformación de represor de la transcripción de

*ampC*. No obstante, la pérdida de función (producida por mutaciones) o la saturación de AmpD debida al incremento de los fragmentos del PG causado por la presencia de  $\beta$ -lactámicos, hace que aumente drásticamente la concentración de péptidos 1,6-anhidro-MurNAc en el citoplasma desplazando a los UDP-MurNAc que actuaban reprimiendo a AmpR, provocando un cambio conformacional en este regulador, el cual adopta su conformación de activador promoviendo la transcripción *ampC* (Mark *et al.*, 2011).

### **B) Mutaciones que afectan a las topoisomerasas II y IV:**

Las topoisomerasas son las enzimas responsables del superenrollamiento del ADN, por lo que juegan un papel esencial en la transcripción, replicación, recombinación y reparación del ADN (Drlica & Zhao, 1997). Mutaciones en los genes *gyrA/gyrB* de las ADN girasas (topoisomerasa II) y *parC/parE* en las topoisomerasas de tipo IV, confieren resistencia a las fluoroquinolonas (Bruchmann *et al.*, 2013). Dicha resistencia se genera más fácilmente en *P. aeruginosa* que en enterobacterias, ya que *P. aeruginosa* necesita una única mutación para poder adquirir resistencia a esta familia de antimicrobianos, mientras que las enterobacterias necesitan dos o más mutaciones (Jalal *et al.*, 2000). En infecciones por *P. aeruginosa* en heridas y del tracto urinario predomina la adquisición de resistencia a través de mutaciones en las topoisomerasas II y IV, no obstante, en aislados resistentes procedentes de FQ cobran mayor protagonismo las bombas de expulsión activa (Jalal *et al.*, 2000). Por lo que respecta a los clones de alto riesgo diseminados a nivel mundial (ST111, ST175 y ST235), tratados en el apartado 1.3 de la Introducción, la resistencia de alto nivel a fluoroquinolonas es casi universal, y normalmente se debe a la combinación de mutaciones en GyrA-T83 y ParC-S87 (López-Causapé *et al.*, 2018; del Barrio-Tofiño *et al.*, 2017).

### **C) Mutaciones implicadas en la hiperexpresión de las bombas:**

Como se ha mencionado previamente, las bombas de expulsión activa forman parte de la resistencia intrínseca de este patógeno nosocomial, no obstante, mutaciones en sus reguladores inducen una hiperexpresión de las mismas confiriendo una mayor resistencia a *P. aeruginosa*.

La hiperexpresión de **MexAB-OprM** debida a mutaciones en sus reguladores transcripcionales *mexR*, *nalB*, *nalC* o *nalD*, aumentan la resistencia de *P. aeruginosa* a  $\beta$ -lactámicos, fluoroquinolonas, tetraciclina, macrólidos, cloranfenicol, novobiocina,

trimetoprim y sulfonamidas (Braz *et al.*, 2016; Pan *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2003; Srikumar *et al.*, 2000; Saito *et al.*, 1999).

Los mutantes que sobreexpresan **MexXY-OprM** debido a la mutación en el gen *mexZ* presentan una mayor resistencia a aminoglucósidos,  $\beta$ -lactámicos y fluoroquinolonas en cepas clínicas de *P. aeruginosa* (Pang *et al.*, 2019; Baum *et al.*, 2009; Hocquet *et al.*, 2006).

Los aislados con mutaciones que conllevan a la inactivación del regulador transcripcional negativo *nfxB*, aumentan la expresión de la bomba **MexCD-OprJ** presentando una sensibilidad reducida a macrólidos, meropenem, fluoroquinolonas, tetraciclina, cloranfenicol, novobiocina, trimetoprim, triclosán, y cefalosporinas de cuarta generación. Por el contrario, dicha sensibilidad se ve aumentada para carbenicilina, cefpodoxima, ceftriaxona, imipenem, aztreonam y aminoglucósidos (Poole *et al.*, 1996). Asimismo, este tipo de mutantes en el entorno clínico son poco frecuentes (Kiser *et al.*, 2010).

La sobreexpresión de **MexEF-OprN** debida a mutaciones en *mexT*, *mexS* y *nfxC*, permiten a *P. aeruginosa* tener una mayor resistencia a fluoroquinolonas, cloranfenicol, trimetoprim, triclosán e imipenem (Köhler *et al.*, 1997). Al igual que los mutantes *nfxB*, presentan hipersensibilidad frente betalactámicos y los aminoglucósidos (Poole, 2001; Fukuda *et al.*, 1995). Se ha determinado que los mutantes que hiperexpresan esta bomba muestran también una disminución de la porina OprD, lo que explicaría la pérdida de sensibilidad de estas cepas al imipenem (Ochs *et al.*, 1999; Masuda *et al.*, 1995).

La mutación en *mexL* conduce a una hiperexpresión de la bomba **MexJK-OprM**, aumentando la resistencia a tetraciclina y eritromicina (Chuanchuen *et al.*, 2002).

#### **D) Mutaciones en la porina OprD:**

OprD es una porina permeable a través de la cual se absorben péptidos básicos y aminoácidos cargados positivamente. Los antibióticos carbapenémicos tienen una cierta similitud estructural con estos compuestos por lo que, a diferencia del resto de  $\beta$ -lactámicos, pueden penetrar en la célula a través de la membrana (Trias & Nikaido, 1990). La inactivación mutacional o la regulación a la baja de esta porina produce resistencia a imipenem y sensibilidad reducida a meropenem (Cabot *et al.*, 2011; García-Castillo *et al.*, 2011; Driscoll *et al.*, 2007).

La resistencia a meropenem viene dada por la combinación de la pérdida de OprD junto con otros mecanismos, tales como la hiperproducción de AmpC o de la bomba MexAB-OprM (Giske *et al.*, 2008; Gutiérrez *et al.*, 2007). Así lo demuestra el estudio realizado por Riera y colaboradores, en el que determinaron que una de las principales causas de la resistencia a meropenem en cepas clínicas era la sobreexpresión de MexAB-OprM y la inactivación de OprD (Riera *et al.*, 2011). Asimismo, según Zamorano para que la resistencia a imipenem se deba a una disminución de la permeabilidad de la membrana, es imprescindible que la célula disponga de un AmpC plenamente funcional y una concentración aceptable de ésta en el espacio periplásmico (Zamorano *et al.*, 2011). Sin embargo, al contrario de lo expuesto, un estudio reveló que la resistencia a dichos antimicrobianos no siempre estaba producida por la inactivación de *oprD*, ya que detectaron aislados clínicos sensibles a imipenem y meropenem con mutaciones que provocaban la inactivación de dicha porina (Ocampo-Sosa *et al.*, 2012).

Un estudio realizado a nivel nacional con la finalidad de proporcionar información epidemiológica sobre estos mecanismos de resistencia, estudió la prevalencia de la hiperexpresión de AmpC, las cuatro bombas de eflujo (*mexB*, *mexY*, *mexD*, *mexF*), y la resistencia causada por mutaciones en OprD en una colección de 190 aislados de *P. aeruginosa* recogidos de infecciones del torrente sanguíneo. Los datos obtenidos relevaron que la hiperexpresión de *ampC* fue el mecanismo más prevalente, seguido de la hiperexpresión de las bombas *mexY*, *mexB*, *mexF* y finalmente de *mexD*. Los aislados resistentes a imipenem fueron deficientes en la porina carbapenémica OprD, debido principalmente a la presencia de mutaciones que inactivaron dicho gen; y aquellos que además fueron resistentes a meropenem, mostraron además un vínculo con la hiperexpresión de AmpC y MexAB-OprM (Cabot *et al.*, 2011).

### **1.2.2.2 Adquisición de determinantes de resistencia por transferencia horizontal**

La transferencia horizontal de genes desempeña un papel importante en la propagación de la resistencia antibiótica, por lo que en el ámbito hospitalario este tipo de elementos son especialmente preocupantes (Millan *et al.*, 2015). En *P. aeruginosa* se encuentran ubicados en integrones adquiridos través de plásmidos y/o transposones, y se pueden transmitir tanto entre cepas de *P. aeruginosa*, como entre otras especies bacterianas.

**A)  $\beta$ -lactamasas adquiridas horizontalmente:**

Son enzimas capaces de degradar el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico de los antibióticos, haciendo que éste pierda su efectividad frente a los microorganismos. Su clasificación puede ser: **I**) Molecular (Ambler, 1980), en la que se distinguen las clases A, C, D (serín-blactamasas) y B (metaloenzimas inhibibles por EDTA), en base a mecanismos de interacción enzima-sustrato y la secuencia aminoacídica de las  $\beta$ -lactamasas; o **II**) Funcional (Bush & Jacoby, 2010), basada en el perfil del sustrato, la localización de los genes codificantes (cromosómica y/o plasmídica), la inducibilidad de su expresión y la sensibilidad a inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. La más utilizada es la clasificación de Ambler.

En *P. aeruginosa* algunas de estas enzimas destacan por su impacto clínico. Un ejemplo de ello son las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), la prevalencia de las cuales ha ido incrementándose de forma alarmante en los últimos años. Se pueden clasificar en las clases A (PER, CTX-M, TEM, SHV, GES, VEB y BEL) (Weldhagen *et al.*, 2003) y D (OXA) (Poole, 2011). Las más relevantes son las de tipo *Guiana Extended-Spectrum* (GES), dado que son las causantes de brotes epidémicos como el ocurrido en el Hospital 12 de Octubre de Madrid en 2009, donde una cepa de *P. aeruginosa* productora de GES-1 y -5 resistente a todos los antibióticos (excepto a colistina), se diseminó en 24 pacientes durante el periodo 2007-2008 (Viedma *et al.*, 2009). Además de estas  $\beta$ -lactamasas, las GES-2, -4, -5, -6, -11 y -18 también poseen actividad carbapenemasa (Bebrone *et al.*, 2013; Poole, 2011; Poirel *et al.*, 2001). Otras BLEE importantes son las de tipo PER-1, debido a su asociación a un elevado fracaso terapéutico (Vahaboglu *et al.*, 2001); y las de tipo oxacilinasas (OXA), ya que poseen 50 variantes aminoacídicas, de las cuales, la OXA-40 se ha hallado en dos aislados clínicos en España (Sevillano *et al.*, 2009) y la OXA198 en Bélgica (El Garch *et al.*, 2011). Recientemente, se ha descrito una variante de OXA-2, la OXA-539, la cual presentaba una duplicación del aminoácido D149, que proporcionaba a *P. aeruginosa* una resistencia adicional a ceftazidima, tanto en monoterapia como en terapia combinada junto a los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas avibactam o tazobactam (Fraile-Ribot *et al.*, 2017).

También son importantes las carbapenemasas de tipo A como la *Klebsiella pneumoniae Carbapenemase* (KPC), que de las 10 variantes existentes, 2 se han encontrado en *P. aeruginosa*: la KPC-2 en una cepa clínica en Colombia, y la KPC-5, en Puerto Rico (Juan & Oliver, 2010; Wolter *et al.*, 2009; Villegas *et al.*, 2007). Cabe destacar que



recientemente en Alemania se ha detectado en *P. aeruginosa* una nueva carbapenemasa de clase A, denominada GPC-1 (*German Pseudomonas Carbapenemase*). Sin embargo, dado el bajo espectro de hidrólisis frente a ertapenem y meropenem, podrían no ser reconocidas en los diagnósticos de rutina (Schauer *et al.*, 2020).

Dentro de las carbapenemasas de clase B, conocidas como metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL), destacan las *Verona Integron-encoded Metallo- $\beta$ -lactamase* (VIM) y las imipenemasas (IMP) como la más extendidas y habitualmente detectadas, relacionándose con brotes causados por *P. aeruginosa*. Las VIM, con 46 variantes descubiertas, son las que se detectan de forma más habitual en Europa, siendo la VIM-2 probablemente la carbapenemasa más extendida en todo el mundo (Walsh *et al.*, 2005). En España ocasionó un brote importante en un hospital universitario, causando infecciones clínicas severas en el 32% de los pacientes, de los cuales fallecieron el 27%. Este hecho provocó que la identificación de MBL en *P. aeruginosa* se considerase técnica obligatoria en el diagnóstico de resistencias (Peña *et al.*, 2007). Las VIM-13 y su variante VIM-47 (Zamorano *et al.*, 2016) son autóctonas de las Islas Baleares y se asocian a los clones de alto riesgo ST235 y ST175 (Zamorano *et al.*, 2016). Además de las citadas IMP y VIM, se encuentra la *New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase* (NDM), detectada en un aislado de *K. pneumoniae* procedente de India (Yong *et al.*, 2009) y recientemente en aislados de *P. aeruginosa* en los continentes Europeo, Asiático y Africano (Paul *et al.*, 2016; Jovčić *et al.*, 2014; Zafer *et al.*, 2014).

Según el estudio multicéntrico realizado a escala nacional por del Barrio-Tofiño con una colección de 1445 aislados clínicos de *P. aeruginosa*, el 3.1% produjeron BLEE/carbapenemasas. Las carbapenemasas MBL más frecuentes fueron las de tipo VIM (-1,-2,-20), seguido de las IMP (-1,-8,-33). Mientras que las BLEE más frecuentes fueron las GES (GES-1,-5), seguido de las PER-1 y la OXA-15 (del Barrio-Tofiño *et al.*, 2019).

## **B) Resistencia debida a enzimas modificantes de aminoglucósidos:**

Los aminoglucósidos son agentes bactericidas que exhiben sinergia con otros antimicrobianos, especialmente con los  $\beta$ -lactámicos. La resistencia a estos compuestos se conoce desde la década de 1960, y se basa en la unión de las enzimas a los grupos amino o hidroxilo de los aminoglucósidos, generando complejos inactivos incapaces de afectar al ribosoma, diana de esta familia de antimicrobianos. En función de la modificación que causan en los aminoglucósidos, los enzimas pueden ser:



fosforiltransferasas (APH), acetiltransferasas (AAC) o nucleotidiltransferasas (ANT). Dichos genes se encuentran en integrones junto con otros genes de resistencia, y dado que *P. aeruginosa* puede portar múltiples enzimas modificadoras (de dos a cinco), presenta una resistencia a aminoglucósidos de amplio espectro (Poole, 2005).

Las enzimas modificantes de aminoglucósidos más frecuentes en *P. aeruginosa* son AAC(6')-II y ANT(2'')-I; y con menor frecuencia presenta AAC(3)-II y APH(3'). Su distribución es ampliamente variable en función del área geográfica y de los patrones de administración de aminoglucósidos (Miller *et al.*, 1997). En particular, en un estudio multicéntrico reciente llevado a cabo a nivel nacional, se determinó que el 56% de las cepas de *P. aeruginosa* extremadamente resistentes presentaron enzimas modificantes de aminoglucósidos, confiriéndoles resistencia este grupo de fármacos, especialmente a la tobramicina (del Barrio-Tofiño *et al.*, 2019).

Asimismo, *P. aeruginosa* puede adquirir otro tipo de enzimas modificadoras, denominadas metilasas ribosomales 16S (Doi & Arakawa, 2007) descritas en otras bacterias, como en miembros de la familia Enterobacteriaceae, así como, en no fermentadores. Estas enzimas confieren niveles elevados de resistencia a la gran mayoría de los aminoglucósidos clínicamente útiles, gracias a la alteración de la unión del antibiótico a la molécula diana. Los organismos que producen este tipo de enzimas suelen ser multirresistentes, ya que además pueden producir BLEE o MBL (Van Hoek *et al.*, 2011; Doi & Arakawa, 2007).

### **1.3 Epidemiología de la resistencia a antibióticos: Clones de alto riesgo.**

#### **A) Epidemiología de la resistencia a antibióticos:**

La definición de multirresistencia más utilizada en la actualidad es la propuesta por Magiorakos y colaboradores (Magiorakos *et al.*, 2012). En ella se define multirresistencia (*multidrug-resistant*, MDR) como resistencia a 3 o más categorías de antibióticos antipseudomónicos; extremadamente resistente (*extensively drug-resistant*, XDR) como resistencia a todas las categorías de antibióticos antipseudomónicos excepto a 1 o 2; y, panresistencia (*pandrug-resistant*, PDR) como resistencia a todos los antibióticos de todas las categorías.

La epidemiología de la resistencia a antibióticos determina que la presencia de *P.aeruginosa* MDR/XDR complica el tratamiento de las infecciones, por lo que las

implicaciones en la salud pública deben tenerse en cuenta, ya que este patógeno sigue siendo una de las principales causas de infección asociada a la asistencia sanitaria en Europa (ECDC, 2020).

De acuerdo con el informe del Programa de Control Antimicrobiano SENTRY (1997-2016), desarrollado por JMI Laboratories (North Liberty; Iowa, EE.UU.) en el que se incluyeron 52.022 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes de más de 200 hospitales procedentes de Asia-Pacífico (excluyendo China e India), Europa (incluidos Turquía e Israel) y América; *P. aeruginosa* fue el patógeno más frecuentemente aislado en neumonías (44,6%) e infecciones del torrente sanguíneo (27,9%). Por lo que respecta a los porcentajes de resistencia, la tasa de cepas multirresistentes ha mostrado una disminución durante periodo 2013-2016, situándose en el 22,6%; siendo el periodo 2005-2008 el que presentó un mayor porcentaje de aislados resistentes, con un 27,5%. Aunque las tasas de resistencia a lo largo del tiempo han mostrado variaciones, la cepas de *P.aeruginosa* multirresistentes siguen siendo una causa de infecciones graves (Shortridge *et al.*, 2019).

Según el último Informe Anual (2019) de la Red Europea de Control de la Resistencia Antimicrobiana (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*, EARS-Net) publicado por el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (*European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) (<http://ecdc.europa.eu>), que incluye los datos de los países de la Unión Europea (UE) y el Espacio Económico Europeo (EEE), los porcentajes de resistencia en el periodo 2015-2019 se mantuvieron en niveles elevados respecto los informes previos. Concretamente, el 31,8% de las cepas de *P. aeruginosa* fueron resistentes a al menos uno de los grupos de antibióticos sometidos a estudio (piperacilina-tazobactam, carbapenémicos, ceftazidima, fluoroquinolonas y aminoglucósidos). En aspectos generales, se observó una tendencia significativa de reducción de la resistencia para todos los grupos de antimicrobianos bajo estudio, disminuyendo la resistencia combinada del 14,6% al 12,1%; no obstante, los porcentajes de resistencia y resistencia combinada persistieron en muchos países, especialmente en las partes oriental y sudoriental de Europa. En particular, los países del norte de Europa mostraron porcentajes de resistencia bajos, situándose por debajo del 10%; sin embargo, los países del sur y este de Europa informaron de porcentajes más altos, situándose entre el 10% y el 53% (en España entre el 10 y el 25 %) para todos los grupos de antibióticos sometidos a estudio. Hecho que pone de manifiesto la gravedad

que supone la resistencia a los antibióticos de *P. aeruginosa* a nivel epidemiológico (ECDC, 2020).

Más concretamente a nivel nacional, un estudio multicéntrico realizado en 2015 con 593 aislados de *P. aeruginosa*, reveló que el 28% de los aislados presentó un perfil MDR, de los cuales el 52% cumplieron los criterios XDR (15% del total), siendo la mayoría sensibles únicamente a las polimixinas y a la amikacina (Peña *et al.*, 2015; Peña *et al.*, 2012). Asimismo, otro estudio multicéntrico realizado recientemente en el que se examinaron 1445 aislados, determinó que el 26.2% de los aislados fueron resistentes, de los cuales el 8.8% mostró un perfil MDR, el 17.3% cumplieron los criterios XDR y el 0.1% presentaron un perfil PDR, mostrando una elevada sensibilidad a la colistina y al ceftolozano/tazobactam (del Barrio-Tofiño *et al.*, 2019). Dichos resultados evidencian que la resistencia de *P. aeruginosa* en España sigue jugando un papel fundamental.

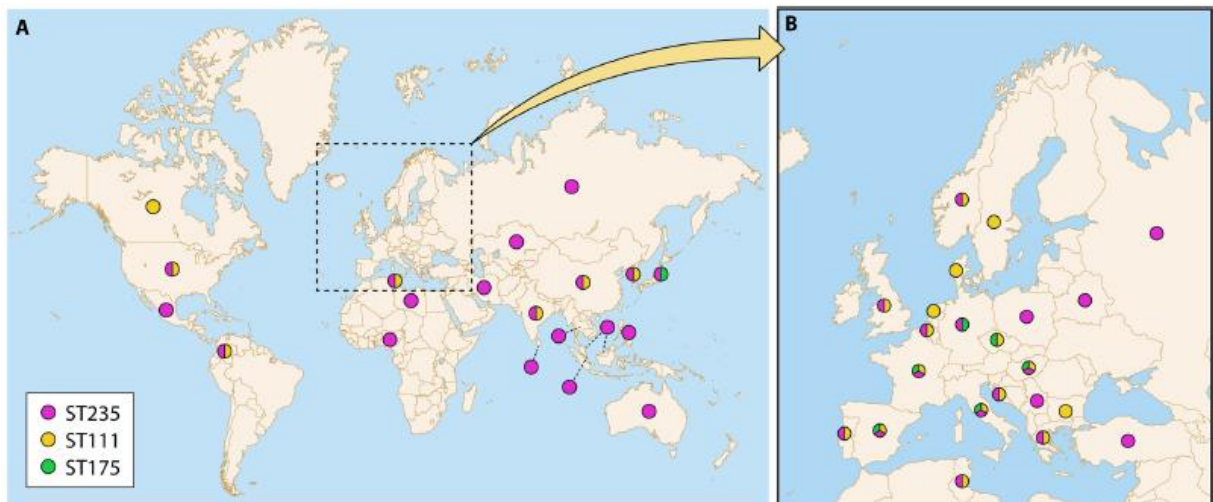
## **B) Clones de alto riesgo (*High Risk Clones*).**

A pesar de que en estudios previos no se hallase una asociación entre un clon dado y un hábitat específico (Pirnay *et al.*, 2009), en los últimos años, se ha constatado que la transmisión hospitalaria puede aumentar la prevalencia de ciertos aislados resistentes particularmente adaptados, denominados clones de alto riesgo. La importancia de estos clones reside en el éxito que presentan en ese tipo de ambientes (en el contexto de infección oportunista) y la capacidad que poseen para causar brotes epidémicos a nivel mundial (Oliver *et al.*, 2015; Woodford *et al.*, 2011). Esto sugiere que la detección de los mismos es de suma importancia para el control epidemiológico de las infecciones y de la salud pública (Oliver *et al.*, 2015). Actualmente, la técnica estándar más aceptada para determinar la clonalidad de la población bacteriana es el esquema de tipificación multilocus de secuencias (*multilocus sequence typing*, MLST), publicado por Curran y colaboradores (Curran *et al.*, 2004). Dicho método se basa en la amplificación por PCR y secuenciación de siete genes *housekeeping* (por tanto, no sometidos a selección) de *P. aeruginosa*: *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* y *trpE*.

El análisis eBURST realizado a partir de la base de datos MLST, demostró que la mayoría de los ST se asociaron con aislados únicos, pero hasta 18 ST fueron representados por más de 10 aislados procedentes de al menos tres países diferentes, indicando que probablemente se trata de clones exitosos. Entre ellos se encuentran los clones de amplia distribución, C (ST17) y PA14 (ST253), epidémicos de FQ como el ST146 (*Liverpool Epidemic Strain*, LES), o clones MDR/XDR de alto riesgo asociados a

infecciones nosocomiales (entre los que destacan los ST111, ST175 y ST235) (Oliver *et al.*, 2015). Los estudios epidemiológicos y moleculares han revelado que la clonalidad de *P. aeruginosa* se encuentra asociada con el perfil de resistencia. Un ejemplo de ello lo demuestra un estudio multicéntrico español realizado con aislados de *P. aeruginosa* procedentes de infecciones del torrente sanguíneo, en cual se determinó que las cepas sensibles estaban representadas por genotipos únicos, mientras que los perfiles MDR se asociaban a una clonalidad menor, especialmente los XDR (Mulet *et al.*, 2013; Cabot *et al.*, 2012). De hecho el 90% de los aislados XDR (73 de 81) pertenecieron únicamente a tres clones, que se correspondieron a los tres principales clones de alto riesgo internacional ST111 (9), ST175 (62) y ST235 (2) (Peña *et al.*, 2012). De éstos, el ST175 es el clon fundador de un complejo clonal que contiene 12 ST; el ST111 es el fundador de un subgrupo del que deriva un número importante de ST y el ST235, es el precursor del complejo clonal más grande albergando 43 ST (Oliver *et al.*, 2015).

La distribución de los 3 principales clones de alto riesgo se puede observar en la figura 1.4. El ST235 es sin duda el que tiene la distribución más amplia, hallándose en muchos países de los cinco continentes, del mismo modo, el ST111 se ha detectado hasta ahora en todos los continentes, excepto en Oceanía; y finalmente, el ST175 se ha localizado en varios países de Europa y en Japón, siendo el clon más prevalente en España y Francia, seguido de los ST111 y ST235 (Oliver *et al.*, 2015).



**Figura 1.4.** Distribución de los tres principales clones de alto riesgo (ST111, ST175 y ST235) a nivel mundial (A) y europeo (B) (Oliver *et al.*, 2015)

Estos clones se han asociado de forma importante a elementos de resistencia transferibles. Situación que podría explicarse en parte, por la teoría del capitalismo genético, en la que un clon ampliamente diseminado debería presentar una mayor

probabilidad de adquirir nuevos genes de resistencia y ser seleccionado y amplificado, debido a la alta presión antibiótica del ambiente hospitalario (Baquero, 2004). En este sentido, los ST111 y ST235 se han vinculado fuertemente a la producción  $\beta$ -lactamasas adquiridas, aunque su resistencia también puede estar causada por mutaciones en la región determinante de resistencia a quinolonas, QRDR (GyrA T83I, D87Y y ParC S80L, S87L) y secuencias truncadas en el gen *oprD* (Treepong *et al.*, 2018; Oliver *et al.*, 2015; Cabot *et al.*, 2012). No obstante, la resistencia adquirida del clon ST235 toma especial importancia, dado que en este clon se han llegado a reportar casi 100 elementos de resistencia transferibles (Treepong *et al.*, 2018), entre los que encuentran las  $\beta$ -lactamasas VIM, PER y OXA (Empel *et al.*, 2007), así como, la coexistencia de las carbapenemasas OXA-48 y NDM-1 en aislados resistentes a colistina en un hospital de Estambul (Vatansever *et al.*, 2020). Esta característica le confiere una gran capacidad de resistencia y diseminación. Un ejemplo de ello, es el brote causado en un hospital de Madrid por un clon ST235 productor de GES-1 y GES-5 (Viedma *et al.*, 2009) el cual albergaba además, la carbapenemasa de clase B, VIM-13, autóctona de las Islas Baleares (Juan *et al.*, 2010).

A diferencia de los ST111 y ST235, el fenotipo MDR/XDR del clon ST175 suele asociarse más frecuentemente a mecanismos mutacionales, tales como; la mutación G154R en AmpR que conlleva a la sobreexpresión de AmpC; la mutación G195E en MexZ que produce una hiperexpresión de MexXY; mutaciones inactivadoras en OprD (Q142X, Gln142X y Trp138X) que producen una disminución de la permeabilidad; y una combinación específica de 3 mutaciones en QRDR (GyrA, T83I-D87N, ParC S87W) que le confieren alta resistencia a las fluoroquinolonas. Aunque también se han detectado clones ST175 productores de VIM-2 en Alemania y España, y de IMP-22 y VIM-20 en España (Oliver *et al.*, 2015; Viedma *et al.*, 2012; Cabot *et al.*, 2012; Riera *et al.*, 2011). En 2019, se identificaron las  $\beta$ -lactamasas OXA-681 y VIM-20 en un clon ST175, provocando una situación preocupante en un hospital del territorio nacional debido a su capacidad de hidrolizar cefalosporinas, e inducir resistencia cruzada a ceftolozano/tazobactam y ceftazidima/avibactam, causando graves problemas clínicos, dado que estas nuevas combinaciones con inhibidores son las opciones más efectivas y recomendadas para el tratamiento de este tipo de infecciones (Arca-Suárez *et al.*, 2019). La distribución global que presentan estos clones y la diversidad de elementos de resistencia que expresan, sugiere que su propagación es global, mientras que la

adquisición de genes de resistencia es principalmente local (Oliver *et al.*, 2015; Turton *et al.*, 2015).

Determinar los factores que impulsan el éxito de los clones de alto riesgo, es un tema importante a tener en cuenta. Recientemente se ha demostrado que los clones, ST111, ST175 y ST235, se asocian a un conjunto definido de 8 parámetros biológicos que podrían estar involucrados en dicho éxito. Sorprendentemente, mostraron un aumento significativo en las frecuencias de mutación y en la formación de biopelículas, mientras que las motilidades tipo *swimming*, *swarming* y *twitching*, la producción de pigmentos (pioverdina y piocianina) y la eficacia biológica (*fitness*) se redujeron de manera significativa. Al contrario de lo que se esperaba inicialmente, expresaron fenotipos similares a los producidos en las infecciones crónicas. Por lo que respecta a los aislados con perfiles ModR y MultiS, cuya diversidad clonal fue mucho mayor, no presentaron diferencias significativas en los parámetros mencionados (Mulet *et al.*, 2013). Asimismo, según el estudio realizado por Fischer y su equipo, el clon ST235 mostró un déficit en la producción de motilidad (exceptuando la de tipo *swimming*) y pigmentos, secreción de proteasas, y la detección de QS; incluso fue capaz de adaptar su crecimiento a un ambiente microaerófilo (Fischer *et al.*, 2020).

Aunque los clones de alto riesgo se encuentran asociados a perfiles de resistencia elevados y a una disminución de los factores de virulencia; la interacción entre la virulencia y resistencia es un punto importante que considerar, debido a que los mecanismos de resistencia podrían determinar un coste biológico y comprometer la virulencia bacteriana (estableciendo una relación inversa entre ambos) (Beceiro *et al.*, 2013); o incluso, estar asociado a ciertos rasgos de virulencia (Juan *et al.*, 2017). A pesar de que la resistencia por sí misma pudiese ser el factor principal del éxito de estos clones, deberían existir factores adicionales que explicasen porque no todos los aislados MDR derivan en clones de alto riesgo. Es posible que éstos alcancen un equilibrio entre la resistencia y la virulencia, para llegar a ser exitosos en el ambiente hospitalario (Oliver *et al.*, 2015). En este sentido, la presencia de la toxina ExoU del SST3 (determinante de virulencia de *P. aeruginosa*, descrito en apartados posteriores), ha demostrado ser un factor de riesgo independiente para la mortalidad en pacientes con bacteriemia por *P.aeruginosa*. Además, se asoció de forma positiva con el perfil de resistencia ModR y de forma negativa con el perfil XDR; sin embargo, la relación negativa con el perfil XDR pudo ser consecuencia de la ausencia de esta toxina en los clones de alto riesgo ST175 y ST111 y de la escasa presencia del ST235 en dicha colección (Peña *et al.*, 2015). Por el



contrario, otros estudios si han relacionado el perfil de resistencia MDR con la presencia de ExoU y una elevada virulencia, tanto *in vivo* como *in vitro* (Takata *et al.*, 2018; Agnello & Wong-Beringer, 2012; Garey *et al.*, 2008). En particular, en un estudio reciente basado en sepsis producidas en un modelo murino, observaron que los clones ST111 y ST175 con presencia de *exoS* fueron menos virulentos que el clon ST235 con presencia del gen *exoU* (Gómez-Zorrilla *et al.*, 2016). De hecho, este clon, también se ha asociado con peores desenlaces clínicos en pacientes con neumonía aguda y bacteriemia (Recio *et al.*, 2018; Treepong *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2014; El-Solh *et al.*, 2012). Es posible que en el éxito del ST235 confluyan su elevada virulencia y su capacidad de adquirir determinantes de resistencia antibiótica (Fischer *et al.*, 2020). No obstante, se necesitan realizar más estudios para determinar la virulencia producida por este tipo de clones.

La propagación evidente de dichos clones resistentes y productores de carbapenemasas se encuentra en aumento, generando un desafío epidemiológico y terapéutico importante (Oliver *et al.*, 2015; Potron *et al.*, 2015). De hecho, en los últimos años se ha notificado un aumento considerable de otros clones alto riesgo emergentes (del Barrio-Tofiño *et al.*, 2020), entre los que se encuentra el ST277 dada su amplia difusión en Brasil (Silva *et al.*, 2011); y el ST244, detectado con frecuencia en varios países pero no siempre está vinculado a perfiles MDR/XDR (Chen *et al.*, 2014).

Por lo que respecta a los clones asociados a FQ, es importante mencionar que a diferencia de los clones de alto riesgo internacionales, mostraron una diversidad clonal muy elevada, a pesar de que el 66% presentó un perfil de resistencia MDR/XDR. En concreto, se obtuvieron 72 secuenciotipos de 75 aislados diferentes y ninguno de ellos se asoció a clones de alto riesgo propios de este tipo de infección. Este hecho podría deberse a que las cepas aisladas de FQ generalmente se adquieren en la comunidad y no en el ambiente hospitalario (López-Causapé *et al.*, 2017). Probablemente el clon de alto riesgo más importante detectado en pacientes con FQ sea el clon epidémico ST146 (LES). Desde su descubrimiento en Liverpool (Cheng *et al.*, 1996) se ha ido expandiendo por todo el mundo, incluido en España (López-Causapé *et al.*, 2013; Edenborough *et al.*, 2004; Scott & Pitt, 2004). Es una cepa que presenta una resistencia a los antibióticos mayor que el resto (Tomás *et al.*, 2010), y que además, hiperexpresa factores de virulencia como la piocianina y la elastasa, favoreciendo la morbilidad y mortalidad de los pacientes (Fothergill *et al.*, 2007). La clave de la expansión de estas cepas es la coexistencia con distintas líneas LES (que poseen características fenotípicas y genotípicas altamente variables), potenciado por la frecuente aparición de fenotipos hipermutadores (Williams

*et al.*, 2015). Otro clon ampliamente distribuido en pacientes con FQ e importante a destacar es el ST274 (perteneciente al complejo clonal, CC274); detectado en 29 aislados en España y Australia durante los años 1995-2012 (López-Causapé *et al.*, 2017).

## 1.4 Importancia clínica

Pese a que la distribución de *P. aeruginosa* fuera del hospital es relativamente baja (Wu & Li, 2014) puede encontrarse formando parte de la microbiota de los individuos sanos y causar infecciones en momentos determinados (Rosado *et al.*, 2010).

Las infecciones causadas por este patógeno y el desenlace de las mismas pueden ser muy variadas, ya que de una simple infección en la piel, pueden llegar a causar sepsis muy graves. Normalmente las infecciones adquiridas en la comunidad son menos agresivas que las intrahospitalarias y suelen asociarse a la exposición a entornos húmedos. Entre las infecciones comunitarias podemos destacar aquellas provocadas por el uso prolongado de lentes de contacto presentándose en forma de queratitis ulcerosa, siendo la forma más graves la endoftalmítis (Rosado *et al.*, 2010). Otra afección común es la otitis producida como consecuencia de los baños en piscinas, que puede presentarse como: otitis externa del nadador, otitis externa maligna, e incluso, llegar a causar mastoiditis (Rubin & Yu, 1988). También, puede producir infecciones cutáneas relacionadas con el uso de baños calientes; osteomielitis, o infecciones del tracto urinario, las cuales derivan frecuentemente en bacteriemias por infección ascendente (McManus *et al.*, 1985).

En el ambiente hospitalario, es la causa principal de infecciones agudas graves, produciendo el 10-15% de las infecciones nosocomiales mundiales (Juan *et al.*, 2017). Esta característica junto a la facilidad que presenta para desarrollar resistencias durante la terapia antimicrobiana (Juan *et al.*, 2005) hace que *P. aeruginosa* se sitúe como uno de los seis patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K.pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter* spp), caracterizados por ser la causa principal de infecciones nosocomiales; como "Prioridad 1: Crítico" en la lista de la Organización Mundial de la Salud (OMS); y clasificado como "máxima prioridad" en la vigilancia e investigación epidemiológica (Tümmler, 2019). Generalmente se encuentra afectando a pacientes inmunocomprometidos, con heridas de quemaduras o aquellos de la unidad de cuidados intensivos (UCI) (Vincent, 2003; Lynch, 2001). Infecciones que a menudo derivan en bacteriemias, las cuales se asocian a una tasa de mortalidad superior al 30% (Juan *et al.*, 2017). Este hecho es de especial relevancia ya que, según datos



reportados por el ECDC, la incidencia de las infecciones del torrente sanguíneo ha mostrado un aumento importante en los últimos años en España, que va desde el 46.2% en 2015 al 67.6% en 2019 (ECDC, 2020). Además, un estudio basado en datos de EARS-Net señaló que los países con proporciones elevadas de este tipo de infecciones provocadas por *P. aeruginosa* y *Acinetobacter*, también fueron aquellos con un porcentaje mayor de microorganismos gram negativos con resistencia adquirida (Jarlier *et al.*, 2019).

Este patógeno causa además diversos cuadros clínicos, entre los que destacan, las infecciones respiratorias crónicas, ya sea en pacientes con FQ o EPOC y NAV (Lyczak *et al.*, 2000; Govan & Deretic, 1996). De hecho, es la segunda causa principal de NAV y cuando ésta se produce en pacientes ingresados en UCI, la mortalidad puede llegar a alcanzar el 50% (Kollef *et al.*, 2005; Lynch, 2001). En la enfermedad FQ, puede infectar hasta más de un 90% de pacientes adultos, elevando el deterioro pulmonar y la mortalidad (Tramper-Stranders *et al.*, 2005). En este tipo de pacientes *P. aeruginosa* puede permanecer de forma crónica en los pulmones, o invadir los distintos tejidos causando neumonía o bacteriemia, con el consecuente shock séptico y muerte (Rosado *et al.*, 2010).

### **1.5 Factores involucrados en la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*.**

La patogenicidad es la capacidad que posee un microorganismo para causar enfermedad en un huésped (Beceiro *et al.*, 2013); y los rasgos bacterianos que contribuyen a su desarrollo se denominan factores de virulencia (Granato *et al.*, 2016). Estos factores son los que permiten a las bacterias replicarse y diseminarse dentro del huésped, en parte alterando o eludiendo el sistema inmune del mismo (Cross, 2008). Su expresión está controlada por múltiples sistemas de señalización de comunicación célula a célula (Jimenez *et al.*, 2012), así como por múltiples reguladores de respuesta de dos componentes que frecuentemente interconectan la resistencia a los antibióticos y la virulencia (Gooderham & Hancock, 2009). Los sistemas de dos componentes (SDC) GacA-GacS y PhoPQ, son fundamentales para la expresión de metabolitos secundarios, formación de biopelículas, QS, motilidad (Balasubramanian *et al.*, 2013; Pessi *et al.*, 2001; Kitten *et al.*, 1998) y regulación inversa de los factores asociados a la infección aguda [sistema de secreción tipo III (SST3) y Pili tipo IV] y crónica [exopolisacáridos y sistema de secreción tipo VI (SST6)] (Wu & Li, 2014; Parkins *et al.*, 2001). También, cuenta con reguladores globales como AmpR, que además de intervenir en la expresión

de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica AmpC, parece estar involucrado en la producción de alginato (AlgT/U) y de algunos factores de virulencia regulados por QS (Balasubramanian *et al.*, 2015; Beceiro *et al.*, 2013).

Como veremos a continuación *P. aeruginosa* posee una gran cantidad de factores intrínsecos de virulencia necesarios para establecer infecciones:

Factores de virulencia		Función y efectos en el hospedador
<b>Adhesinas</b>		
Tipo pili	Pili tipo IV	Adhesión de la bacteria a las células epiteliales Motilidad tipo <i>twitching</i> y <i>swarming</i>
Tipo no pili	LPS	Adhesión de la bacteria a superficies mucosas
	Flagelo	Adhesión de la bacteria a las mucinas de las células eucariotas Motilidad tipo <i>swimming</i> y <i>swarming</i>
<b>Toxinas</b>		
SST3	ExoU	Actividad fosfolipasa, lisa las membranas de los macrófagos, provocando su necrosis.
	ExoS/ExoT	Reorganización del citoesqueleto en fagocitos polimorfonucleares, inhibición de la explosión ROS en neutrófilos y bloqueo de la transducción de señal, provocando hiperproducción de citoquinas
	ExoY	Reorganización del citoesqueleto de actina y aumento del AMPc en las células del hospedador
SST2	Exotoxina A	Bloqueo de la síntesis proteica (factor de elongación 2), causando daño tisular y muerte de las células huésped.
	LasA y LasB	Importantes en la infección pulmonar por su actividad elastolítica.
SST5a	EstA	Producción de ramnolípido, involucrada en la motilidad y formación de biopelículas.
SST5b	LepA	Actividad proteasa implicada en la activación de NF-kB
SST6 (HSI-I)	Hcp-1	Formación de nanotubos. Involucrado en infecciones crónicas (FQ)
<b>Pigmentos</b>		
Toxina	Piocianina	Toxina fenazina con actividad redox, involucrada en el establecimiento de la FQ.
Sideróforo	Pioverdina	Quelante de Fe <sup>3+</sup> de alta afinidad. Interviene en la producción de exotoxina A y de biopelículas maduros.
<b>Factores extracelulares</b>		
Ramnolípido y Foscolipasa C		Hidrolisis del surfactante alveolar, produciendo reducción de la función pulmonar en FQ
Alginato		Barrera física que inhibe la entrada de antibióticos y células del sistema inmune. Participa en la formación de biopelículas y en el establecimiento de la infección en FQ

**Tabla 1.1.** Principales factores de virulencia de *P. aeruginosa*.

### **1.5.1 Adhesinas: lipopolisacárido, flagelo y pili tipo IV.**

La motilidad es una propiedad clave en la virulencia de *P. aeruginosa*, ya que juega un papel importante en la invasión de fluidos y superficies, por tanto, en el establecimiento inicial de la infección (Feinbaum *et al.*, 2012; Jarrell & McBride, 2008; Feldman *et al.*, 1998). En este proceso juegan un papel esencial las adhesinas, componentes de la superficie celular involucrados principalmente en la colonización del epitelio respiratorio. Se diferencian en dos grupos, las adhesinas de tipo pili (pili tipo IV) y las de tipo no pili [flagelo y lipopolisacárido (LPS)] (Wu *et al.*, 2015). Como veremos a continuación, a excepción del LPS, cada adhesina se asocia a un tipo distinto de motilidad.

El LPS, a pesar de no estar involucrado en la motilidad, es una estructura celular importante que consta de tres partes: el antígeno O, el lípido A y un núcleo externo e interno unidos por un enlace covalente. Entre sus funciones se encuentra el aporte de la integridad estructural y la protección de la membrana frente a diferentes sustancias químicas (King *et al.*, 2009). Además, está asociado a la adhesión y posterior infección del epitelio pulmonar en FQ, a través de su unión a una proteína que actúa como canal de cloro (CFTR). Dicha unión podría deberse a que el LPS de *P. aeruginosa* es menos tóxico que el de otras gram negativas, produciendo una menor respuesta del sistema inmune y provocando la posterior infección del tejido (Cigana *et al.*, 2009; Lyczak *et al.*, 2000). Dada su ubicación, no es sorprendente que el LPS se modifique en aislados colonizadores de FQ (Hauser *et al.*, 2011), mostrando un fenotipo fino (cadenas largas del antígeno O) en infecciones agudas, a fin de proteger a la bacteria frente al sistema de complemento; y un fenotipo rugoso y resistente, en infecciones crónicas (Maldonado *et al.*, 2016). También, es capaz de activar las respuestas inmunes innatas y adaptativas, por lo que eventualmente, puede provocar respuestas inflamatorias desmesuradas que contribuyen a la morbilidad y mortalidad del huésped (Rocha *et al.*, 2019; Mandell *et al.*, 2009).

La asociación entre la motilidad, la regulación positiva de la virulencia y la inducción de los mecanismos de defensa del huésped, subyace en las contribuciones de los flagelos y los pili durante el proceso de infección (Kazmierczak *et al.*, 2015), en el cual se produce una transición de crecimiento planctónico a sésil, provocando cambios en la función flagelar (Caiazza *et al.*, 2005) y en la producción de pili tipo IV (Cowles & Gitai, 2010). En *P. aeruginosa* destacan tres tipos de motilidad relacionadas con la virulencia: *swimming*, *swarming* y *twitching* (Josenhans & Suerbaum, 2002).

La motilidad tipo *swimming* es aquella que se produce en ambientes acuosos mediante el uso del flagelo (Rashid & Kornberg, 2000; Feldman *et al.*, 1998). Este componente es uno de los determinantes de virulencia más importantes en *P. aeruginosa*. Consiste en un motor y un cuerpo basal integrados en la envoltura celular, y un filamento que se extiende normalmente desde la célula (Jarrell & McBride, 2008). El ensamblaje del filamento, ocurre a través del SST3 (Jarrell & McBride, 2008). Está formado por diversas proteínas Fli, entre las cuales FliD confiere a *P. aeruginosa* la capacidad de adherirse a la mucosa de las vías respiratorias, mediante la interacción con la superficie celular uniéndose a los glicosfingolípidos (GSL) asialo-GM1 y a las mucinas secretadas en la superficie de las mucosas (Zarza *et al.*, 2019; Mesquita *et al.*, 2013; Hayashi *et al.*, 2001; Arora *et al.*, 1998); y FliC, reconocida por los TLR tipo 5, desencadena la expresión de las citoquinas interleucinas (IL) y factor de necrosis tumoral (TNF), ocasionando la muerte celular (Cendra *et al.*, 2017; Veessenmeyer *et al.*, 2009b; Kipnis *et al.*, 2006). Finalmente las proteínas FliG, FliM y FliN, son las encargadas de controlar la rotación y dirección del flagelo (Jarrell & McBride, 2008). En condiciones de infección, a fin de evadir el sistema inmune, *P. aeruginosa* suprime la síntesis de flagelina cambiando su fenotipo flagelado a mucoide, induciendo la producción de alginato (Rada, 2017; Chotirmall *et al.*, 2012).

La motilidad tipo *twitching* acontece en superficies sólidas mediante la extensión, anclaje y retracción de los pili tipo IV (Balasubramanian *et al.*, 2012; Tremblay & Déziel, 2008; Mattick, 2002; Kohler *et al.*, 2000). Alrededor del 90% de la capacidad de adhesión de *P. aeruginosa* depende de este mecanismo. Están formados por homopolímeros de pilina, retráctiles y flexibles (Wu *et al.*, 2015) y se sitúan en el polo de la bacteria uniéndose a los GSL de las superficies de las células hospedadoras (Bucior *et al.*, 2012). En su regulación intervienen las proteínas PilA, PilB, PilT y PilU (Zarza *et al.*, 2019). Existen 2 subfamilias de pili tipo IV (a y b), dependiendo del sistema de anclaje que utilizan, siendo la subfamilia “a” la dominante en la adherencia de la superficie epitelial (Wu *et al.*, 2015). Kus y su equipo (Kus *et al.*, 2004), clasificaron las cepas piliadas en cinco grupos filogenéticos (I al V), en función de los alelos presentes en el gen *pilA*, y por los genes accesorios en el genoma de *P. aeruginosa*, observando una asociación entre los aislados pertenecientes al grupo I y la FQ. Este tipo de adhesinas tienen un papel importante en la señalización celular, adhesión, evasión del sistema inmune, formación de biopelículas (O’Toole & Kolter, 1998; Hahn, 1997) y en la motilidad tipo *swarming* y *twitching* (Balasubramanian *et al.*, 2012; Kohler *et al.*, 2000).

Finalmente, la motilidad más compleja, tipo *swarming*, tiene lugar en superficies semisólidas. Para poder llevarla a cabo es necesaria la participación del flagelo, del pili tipo IV, y además requiere la producción de biosurfactantes para poder realizar el movimiento (Feinbaum *et al.*, 2012; Rashid & Kornberg, 2000).

Estudios relacionados con la virulencia de *P. aeruginosa* y su motilidad, demostraron que la motilidad tipo *swarming* producía cambios importantes en los patrones de expresión génica de la bacteria, entre ellos, la sobreexpresión de genes relacionados con la virulencia como el SST3 y las proteasas (Overhage *et al.*, 2008). De hecho, en el estudio realizado por Murray y su equipo se corroboró la asociación de este tipo de motilidad con el SST3 y la secreción de proteasas en aislados clínicos; mientras que se asoció de forma negativa con la formación de biopelículas (Murray *et al.*, 2010). Sin embargo, al contrario de lo expuesto previamente, en el reciente estudio realizado por Medina-Rojas, no observaron esta asociación entre el *swarming* y el SST3 (Medina-Rojas *et al.*, 2020). Según Murray, la motilidad de las cepas varía en función de su origen, siendo las cepas aisladas de heridas significativamente más móviles que las aisladas de orina/catéteres, torrente sanguíneo o esputo/lavado bronquial (Murray *et al.*, 2010). Posiblemente, se deba a que una vez se ha producido el anclaje a la célula por medio de la adhesión, se generen señales que indiquen al patógeno que debe iniciar la infección en el huésped (Overhage *et al.*, 2008). En este sentido, el estudio del análisis funcional de la expresión genética en bacterias patógenas, puso de manifiesto que la regulación del flagelo y de otros sistemas asociados a la virulencia, como el SST3, no se expresan a la vez (Josenhans & Suerbaum, 2002). Ello sugiere que una vez se ha producido la adhesión, se producen cambios que conllevan a la activación de otros factores de virulencia.

La motilidad tipo *swimming* como factor de virulencia en sepsis producidas por *P.aeruginosa* en heridas de quemaduras en un modelo murino, demostró que los mutantes flagelares (deficientes en la motilidad) proliferaron en la herida de manera similar a las cepas control. Sin embargo, no produjeron una invasión sistémica, reduciendo la virulencia del patógeno y evitando la mortalidad del modelo (Drake & Montie, 1988). Del mismo modo, la pérdida de la motilidad en mutantes de *A. baumannii* produjo una atenuación de la virulencia en los modelos de *G. mellonella* (Skiebe *et al.*, 2012) y *C. elegans* (Pérez-Varela *et al.*, 2017), probablemente como consecuencia de la incapacidad de iniciar el contacto con las células del huésped para el posterior desarrollo de la infección. De forma similar, se observó que la disminución de la motilidad tipo *twitching* producida por mutaciones en *pilU* o *pilT*, redujo considerablemente la virulencia en un modelo murino

respecto la cepa control (Zolfaghar *et al.*, 2003). Este tipo de regulación, activando la motilidad en la fase aguda de la infección e inhibiéndola en la fase crónica, confiere a *P. aeruginosa* la capacidad de persistir en las infecciones. Corroborando esta hipótesis, un estudio previo asoció la pérdida de motilidad, producida por mutaciones en los genes *pilB* (involucrado en la síntesis del pili) (Abby *et al.*, 2016) y *pilQ* (codifica para una proteína transmembrana esencial en la extensión del pili) (Chang *et al.*, 2007), con la infección crónica en FQ (Smith *et al.*, 2006).

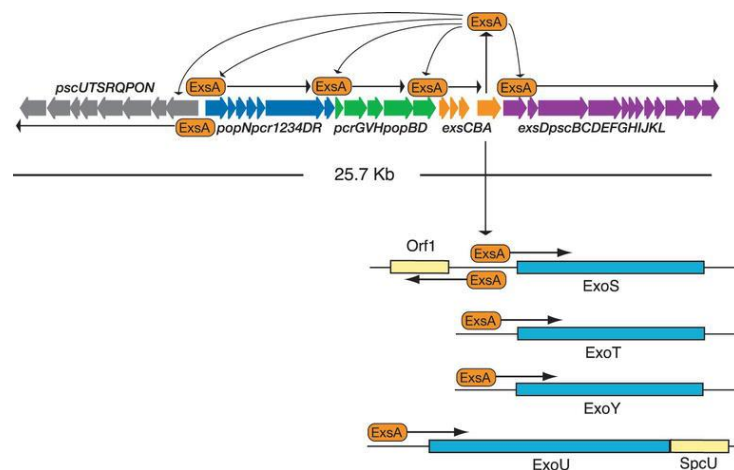
### **1.5.2 Exotoxinas liberadas a través de los sistemas de secreción.**

*P. aeruginosa* posee diversos sistemas de secreción de toxinas; de los nueve tipos existentes, este microorganismo dispone de cinco de ellos: I, II, III, V y VI (Balasubramanian *et al.*, 2013). El más estudiado es el SST3 debido a su relación con peores pronósticos clínicos (El-Solh *et al.*, 2012; Sawa *et al.*, 2014).

El SST3 de *P. aeruginosa* pertenece a la familia de Ysc, que incluye los sistemas Yop de *Yersinia spp.*, Asc de *Aeromonas salmonicida*, Lsc de *Photorhabdus luminescens*, Vcr de *Vibrio parahaemolyticus*, Bsc de *Bordetella spp.* y el sistema Dsc de *Desulfovibrio vulgaris* (Hauser, 2009). Aunque los mecanismos de secreción y translocación están altamente conservados entre diferentes especies, cada patógeno transloca un conjunto único de efectores (Yahr & Wolfgang, 2006).

El SST3 está constituido por cinco partes funcionales que trabajan de forma conjunta y altamente regulada: el sistema de secreción, los translocadores y las proteínas reguladoras (ubicadas de manera contigua en el cromosoma); y las proteínas efectoras y las chaperonas (ubicadas en zonas distintas) (Hauser, 2009; Yahr & Wolfgang, 2006). Su función reside en inyectar potentes citotoxinas en el interior de las células eucariotas a través de una estructura denominada inyectisoma (Hauser, 2009). Las señales inductoras más potentes para que tenga lugar su expresión son el contacto con las células huésped y concentraciones bajas de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) extracelular (Vallis *et al.*, 1999; Frank, 1997); estos factores probablemente contribuyan a la supervivencia ambiental y a la patogenicidad del organismo en las infecciones agudas (Yahr & Wolfgang, 2006). Por otro lado, las señales que inducen a la represión de este sistema incluyen, el estrés metabólico, el daño en el ADN, concentraciones altas de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) extracelular y la osmolaridad baja; contribuyendo a la persistencia de *P. aeruginosa* en las infecciones crónicas (Yahr & Wolfgang, 2006).

En su regulación interviene un conjunto de vías de señalización, algunas de las cuales se dedican únicamente a regular el SST3 y otras, regulan de manera coordinada la expresión del SST3 y múltiples factores de virulencia. La principal vía de expresión viene determinada por los genes *exs*, *pcr*, *psc* y *pop*, codificados en el regulón exoenzima S compuesto por 5 operones y 36 genes. Los genes *psc* y *pcr* codifican para los componentes de la maquinaria, mientras que los genes *exs* se encargan de regular el sistema (Frank, 1997). De entre los genes *exs*, el más importante es *exsA*, un miembro de la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS que se encuentra codificado en el operón *exsCEBA* de la exoenzima S. Actúa como regulador central de la transcripción del SST3 mediante la unión a su propio promotor y a los distintos promotores de este sistema (Hauser, 2009; Dasgupta *et al.*, 2004; Hovey & Frank, 1995); mientras que la función de las proteínas adicionales: ExsC, ExsD y ExsE, reside en la activación o represión de ExsA. Dado que la transcripción de genes está íntimamente ligada a la actividad secretora de tipo III, para que se inicie la transcripción tiene que darse en primer lugar la activación del proceso de secreción (McCaw *et al.*, 2002; Yahr *et al.*, 1996). Este modo de actuación permite que los componentes del SST3 se sinteticen a niveles elevados cuando más se necesitan, es decir, después del contacto del patógeno con la célula huésped.



**Figura 1.5.** Regulación de SST3 en *P. aeruginosa* mediante el activador transcripcional ExsA. Se aprecian los 5 operones (flechas de colores) y las proteínas efectoras (Naito *et al.*, 2017)

En condiciones de represión de la secreción, ExsD con actividad anti-activador se encuentra unido a ExsA, inhibiendo la transcripción dependiente de este regulador. ExsC, debido a su función anti-(anti-activador), tiene la capacidad de interrumpir la interacción ExsD-ExsA al unirse directamente a ExsD, dejando libre a ExsA (Dasgupta *et al.*, 2004). En condiciones de represión, ExsC tiene mayor afinidad por ExsE, lo que



evita su unión a ExsD (Rietsch *et al.*, 2005; Urbanowski *et al.*, 2005). No obstante, en condiciones de activación de la secreción, ExsE es exportado al medio extracelular o al citosol de las células huésped (Urbanowski *et al.*, 2007), provocando un agotamiento de la misma en el citosol bacteriano, dejando libre a ExsC que posteriormente se unirá a ExsD, liberando a ExsA y permitiendo la activación transcripcional de los genes de SST3 por dicho regulador produciendo la activación de la secreción y por tanto el aumento de la expresión de los genes (Hauser, 2009).

Existen cuatro exoenzimas cuya expresión varía entre las diferentes cepas, puesto que raramente se presentan las 4 a la vez. Si bien es cierto, que la mayoría de las cepas poseen los genes *exoT* y *exoY* (89% y 92-100%, respectivamente), *exoS* y *exoU* se detectan en una frecuencia inferior (58-72% y 28-42%, respectivamente) y además, son mutuamente excluyentes en la gran mayoría de los aislados (Hauser, 2009); aunque en algunos estudios han demostrado la presencia de ambas exoproteínas en aislados clínicos (Morales-Espinosa *et al.*, 2017; Peña *et al.*, 2015), y en cepas resistentes pertenecientes a los clones de alto riesgo (Horna *et al.*, 2019). ExoU se encuentra relacionado a fenotipos citotóxicos, como los observados en las cepas PA14 o PA103, y se asocia a infecciones agudas tales como la lesión pulmonar o la sepsis. En cambio ExoS, se asocia con un fenotipo invasivo como el producido por PAO1 o PAK (Foulkes *et al.*, 2019; Hauser, 2009), y se relaciona con enfermedades crónicas. En consonancia con ello, un estudio determinó que la presencia de ExoS fue mayor que la de ExoU en pacientes con FQ (Feltman *et al.*, 2001).

La presencia de cada una de estas toxinas proporciona mecanismos distintos de propagación y patogénesis bacteriana (Borkar *et al.*, 2013). Además ayuda a perpetuar la lesión en el tejido infectado, mediante la inhibición de la respuesta del sistema inmune y la reparación de las lesiones. La producción de al menos uno de ellos se asocia con un peor desenlace clínico (Sullivan *et al.*, 2014; Hauser *et al.*, 2002; Roy - Burman *et al.*, 2001).

ExoU es una proteína soluble de 74 kDa que posee un dominio de interacción N-terminal seguido de un dominio fosfolipasa y un C-terminal, el cual contiene un haz de 4 hélices para su inserción en la célula huésped (Rabin & Hauser, 2005; Sato & Frank, 2004; Sato *et al.*, 2003). A diferencia del resto de toxinas que se encuentran dispersas por el genoma, *exoU* se localiza en la isla de patogenicidad PAPI-2 junto con la chaperona *spcU* (Sawa *et al.*, 2014; Kulasekara *et al.*, 2006). Esta chaperona, además de mantener en un estado inactivo a *exoU*, guía a la maquinaria del SST3 en su función de secreción,



permitiendo el despliegue de esta toxina para que pueda atravesar la luz del inyectisoma (Parsot, 2003). Después de la inyección, para que ExoU pueda iniciar su actividad en el interior celular requiere una modificación eucariota específica o un cofactor que la active, como la ubiquitina (Halavaty *et al.*, 2012; Phillips *et al.*, 2003). Una vez activada, posee una fuerte actividad fosfolipasa A<sub>2</sub> que destruye la membrana plasmática de la célula huésped mediante la escisión de los fosfolípidos, provocando una necrosis celular rápida, en las células epiteliales, en macrófagos y neutrófilos (El Solh *et al.*, 2008; Sato & Frank, 2004). Además de sus efectos citotóxicos, es capaz de provocar la muerte celular por apoptosis, modulando la expresión génica de las células infectadas. En este sentido se ha demostrado que ExoU desencadena una cascada inflamatoria dependiente del ácido araquidónico e induce la expresión de genes inflamatorios (Cuzick *et al.*, 2006; Saliba *et al.*, 2005; McMorran *et al.*, 2003).

De las cuatro exoproteínas secretadas, es la que tiene un mayor impacto en la virulencia bacteriana (Hauser, 2009). En células HeLa, se relacionó con la interrupción entre las adherencias focales y las integrinas, así como entre el citoesqueleto de actina y la membrana celular, dando lugar al colapso del citoesqueleto, el redondeo celular y el desprendimiento de las células (Sato & Frank, 2014). También se ha observado que juega un papel importante en la virulencia de *G. mellonella* (Miyata *et al.*, 2003) y en modelos murinos de neumonía aguda, peritonitis, quemaduras y bacteriemia en los que causó una diseminación sistémica y un aumento notable de la virulencia (Howell *et al.*, 2013; Hauser, 2009; Hauser & Rello, 2003; Allewelt *et al.*, 2000). Lo mismo se observó durante la infección en conejos, en los que se requerían dosis muy bajas de esta toxina para causar importantes efectos perjudiciales (Kudoh *et al.*, 1994).

Es especialmente importante destacar su gran relevancia clínica, ya que diversos estudios han demostrado que la presencia de *exoU* se relaciona en el 90% de los casos con pronósticos más graves (Foulkes *et al.*, 2019; Peña *et al.*, 2015; Howell *et al.*, 2013; Hauser & Rello, 2003; Hauser *et al.*, 2002). De hecho, el riesgo relativo de mortalidad en pacientes infectados con cepas que expresan la toxina ExoU, aumenta 2-3 veces respecto aquellos que no la presentan (Roy-Burman *et al.*, 2001). En consonancia, Sullivan y su equipo informaron que las cepas con presencia de ExoU y resistentes a fluoroquinolonas, mostraron una mayor probabilidad de causar neumonías, promoviendo estos factores como predictores destacados (Sullivan *et al.*, 2014). Asimismo, según El-Solh, los aislados con presencia del SST3 procedentes de bacteriemias causadas por *P. aeruginosa*, desarrollaron shock séptico en los pacientes ocasionando una elevada probabilidad de

fallecimiento. Además, ninguno de los pacientes que sobrevivió a los 30 primeros días de la infección exhibió la presencia de ExoU (El-Solh *et al.*, 2012). Así lo demuestra un estudio multicéntrico nacional con cepas de *P. aeruginosa* procedentes de bacteriemia, en el que ExoU se asoció de manera independiente con la mortalidad temprana de los pacientes, clasificando esta toxina como factor de riesgo independiente para la mortalidad y como marcador clave en la virulencia de *P. aeruginosa* (Peña *et al.*, 2015). En consonancia, en un estudio posterior, además de corroborar la presencia de ExoU como factor predictivo de la mortalidad temprana, demostraron que también estaba asociado a la mortalidad tardía y a cepas MDR de *P. aeruginosa*, en particular, al clon de alto riesgo ST235 relacionado con una elevada virulencia (Recio *et al.*, 2020). La conjunción de estos factores (alta resistencia y virulencia) hace que las infecciones por esta bacteria sean difíciles de tratar, provocando finalmente una elevada mortalidad en los pacientes infectados.

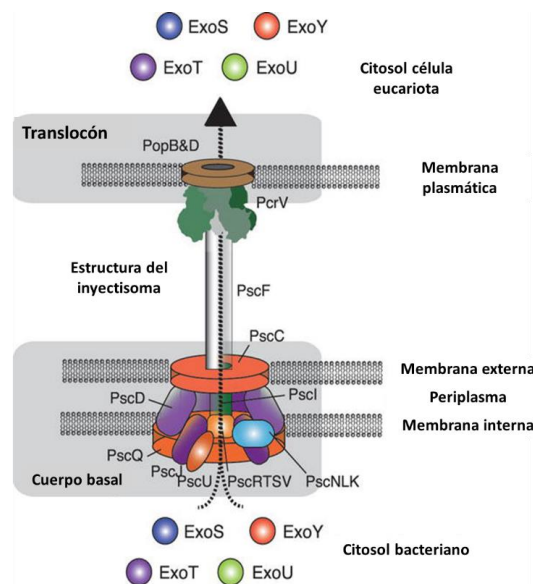


Figura 1.6. Sistema de secreción tipo 3 de *P. aeruginosa*. Paso de las toxinas al interior de la célula huésped. Representación modificada de Naito *et al* 2017.

Las exoproteínas bifuncionales ExoS (49 kDa) y ExoT (53 kDa) están muy relacionadas entre sí, pues comparten un 76% de su secuencia de aminoácidos. Ambas poseen los dominios GTPasa N-terminal (GAP) y ADP-ribosiltransferasa C-terminal (ADPRT), a través de los cuales realizan sus funciones (Hauser, 2009). Una vez que dichas toxinas han sido translocadas al citosol de la célula huésped, el extremo N-terminal activa la función de las proteínas involucradas en la transducción de señales, mientras que el extremo C-terminal produce la inactivación de las mismas; ello deriva

en una alteración en el sistema de señalización celular, provocando en el huésped una hiperproducción de citoquinas proinflamatorias (Lee *et al.*, 2005; Coburn & Frank, 1999). Asimismo, a fin de colonizar y persistir en la infección, el extremo N-terminal desorganiza los filamentos de actina, lo que causa una esferificación de la célula permitiendo la evasión de la fagocitosis (Hauser, 2009). Además, inactivan la actividad de los neutrófilos bloqueando las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la migración celular (Vareechon *et al.*, 2017). La captación endocítica mediada por ExoS, se basa en la internalización de *P. aeruginosa* en la célula huésped a través de la invaginación de la membrana plasmática y formación de vesículas, donde las bacterias pueden sobrevivir (Foulkes *et al.*, 2019). Cabe destacar que aunque ExoU sea la que tenga una mayor asociación con peores desenlaces clínicos, la que se presenta con mayor frecuencia es ExoS, tanto en infecciones crónicas como la FQ (Mitov *et al.*, 2010) como en infecciones agudas como la sepsis (El-Solh *et al.*, 2012; Jabalameli *et al.*, 2012; Garey *et al.*, 2008). En este sentido, se determinó que la presencia de ExoS con ADPRT funcional fue capaz de aumentar la diseminación de este microorganismo a partir de la infección de células del epitelio pulmonar (Rangel *et al.*, 2015).

Por último, ExoY, es una adenilato ciclasa que causa la desorganización de los filamentos de actina de la célula mediante el aumento del AMPc. Esto resulta en un incremento de la permeabilidad endotelial y en la inhibición de la fagocitosis (Hauser, 2009).

Además del SST3, *P. aeruginosa* posee otros sistemas de secreción a través de los cuales libera otras toxinas importantes:

El sistema de secreción tipo I (SST1), formado por una proteína de membrana externa y un transportador ABC, se divide en dos tipos: el sistema Apr implicado en la secreción de la proteasa alcalina AprA; y el sistema involucrado en la captación del hierro mediante la secreción de la proteína HasAp, considerado un componente crucial en las infecciones agudas debido a su unión al grupo hemo de la hemoglobina (Veesenmeyer *et al.*, 2009).

El sistema de secreción tipo II (SST2) ampliamente conservado en bacterias gram negativas (Peabody *et al.*, 2003), está codificado por los genes *xpc* (proteína extracelular) y *hxc* (homólogo a *xpc*), el cual es funcional únicamente en condiciones limitantes de fósforo (Bleves *et al.*, 2010; Ball *et al.*, 2002). Es el sistema más versátil que posee *P. aeruginosa* para secretar proteínas al medio extracelular, de hecho, es el único capaz de translocar grandes exoproteínas plegadas previamente en el periplasma, a través de la

membrana externa (Filloux, 2004; Peabody *et al.*, 2003). Las exoproteínas secretadas por este sistema incluyen, la exotoxina A y las proteasas LasA y LasB.

La exotoxina A es capaz de autodirigirse a receptores celulares específicos después de haber sido secretada al medio extracelular. Su estructura tridimensional está conformada por tres dominios: el I, relacionado con el reconocimiento de los receptores celulares específicos; el II, con la translocación de las toxinas y el III, es el dominio enzimático encargado de ribosilar el ADP del factor de elongación 2 (EF-2) (Pastrana *et al.*, 2005; Allured *et al.*, 1986). Esta ribosilación resulta en el bloqueo de la síntesis proteica, lo cual promueve la generación de daño tisular (Allured *et al.*, 1986). Las toxinas LasA y LasB son enzimas con actividad elastolítica que producen un importante daño tisular en las infecciones respiratorias (Kipnis *et al.*, 2006; De Bentzmann *et al.*, 2000). LasB, es una zinc-metaloproteasa que juega un papel importante en la degradación de la elastina y colágeno (críticos para la elasticidad del tejido pulmonar), así como en la inactivación del sistema inmunitario del huésped. Su actividad se ve potenciada gracias a la actividad de la serin-proteasa LasA (estafilolisina), que se une a la elastina a fin de incrementar la función de degradación. La acción de ambas proteínas es importante en las etapas iniciales de la infección pulmonar, ya que permiten la difusión de *P. aeruginosa* (Alcorn & Wright, 2004; Olson & Ohman, 1992; Galloway, 1991). La producción de las mismas está condicionada por las concentraciones extracelulares de hierro y zinc; y está controlada por varios genes, tales como *lasR* y *rhlR*, implicados en la regulación de otros genes por QS (Storey *et al.*, 1998; Toder, 1994).

El sistema de secreción tipo V (SST5), es la vía de secreción más simple de *P.aeruginosa*. Al igual que SST2 libera las toxinas al medio extracelular. Cuando éstas llegan a la membrana externa pueden permanecer asociadas a ella o liberarse por medio de una escisión proteolítica. Existen dos subtipos de SST5: el SST5a (autotransportador) y el SST5b (a diferencia del SST5a, posee una segunda proteína que forma el canal de la membrana externa) (Bleves *et al.*, 2010). En particular, el SST5a secreta la esterasa EstA, involucrada en la producción de ramnolípidos afectando a la motilidad y a la formación de biopelículas (Wilhelm *et al.*, 2007). Por otro lado, el SST5b libera al medio la exoproteasa LepA, la cual induce la activación de un complejo proteico que controla la transcripción de ADN y de la ruta NF-κB (Kida *et al.*, 2008; Henderson *et al.*, 2004).

La proteína hexamérica Hcp1, genera un nanotubo en el SST6 que puede compararse con el inyectisoma del SST3. A diferencia de los sistemas explicados previamente, actualmente las toxinas secretadas por el SST6 no están claras, debido a

que Hcp1 se considera como un componente de la maquinaria más que en un sustrato. Puede detectarse en el esputo de pacientes con FQ, posiblemente como consecuencia de la lisis de los microorganismos durante la infección. Esto sugiere que podría estar relacionado con el mantenimiento de las infecciones crónicas (Bleves *et al.*, 2010; Mougous *et al.*, 2006).

### **1.5.3 Pigmentos involucrados en la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*.**

*P. aeruginosa* secreta una serie de pigmentos característicos, de los cuales destacan como determinantes de virulencia, la toxina piocianina y el sideróforo pioverdina.

La piocianina (PCN) es una toxina fenazina con actividad redox, capaz de reducir y liberar el hierro de la transferrina. Dado que se comporta como un ion bipolar, puede atravesar fácilmente las membranas citoplasmáticas. Su síntesis está regulada por los sistemas de detección de QS, en los que intervienen dos operones *phzABCDEFG* y los genes *phzH*, *phzM* y *phzS*, que modifican el compuesto tricíclico corismato, precursor a partir del cual se genera este pigmento (Gallagher *et al.*, 2002; Mavrodi *et al.*, 2001). Otros reguladores globales adicionales como el SDC GacA-GacS y Vfr también intervienen en la síntesis de esta molécula, pero en menor medida (Fuqua *et al.*, 2001).

A fin de descifrar la contribución exacta de la PCN en la patogenia de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* se han realizado diversos estudios *in vivo* utilizando ratones (Lau, *et al.*, 2004) y modelos alternativos, tales como *C. elegans* y *D.melanogaster* (Lau *et al.*, 2003; Mahajan-Miklos *et al.*, 1999), a partir de los cuales se ha revelado que este pigmento juega un papel fundamental en las infecciones, interrumpiendo numerosas vías celulares eucariotas conservadas evolutivamente (Ran *et al.*, 2003). En concreto, a partir de estudios realizados en ratones, determinaron que los órganos con mayor afectación debido al estrés oxidativo producido por la PCN fueron los pulmones y el tejido cardíaco (Rashid *et al.*, 2020). En el modelo de *C. elegans* se demostró que la PCN participaba en la virulencia al producir reactivos intermediarios del oxígeno; y que los mutantes *phzB1*, *mvfR* y *phnAB*, deficientes en la producción de la misma, redujeron drásticamente la letalidad en el nematodo. Incluso los mutantes de *C.elegans* sensibles al estrés oxidativo fueron extremadamente sensibles a la exposición de este pigmento induciéndoles a una mayor mortalidad (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999). El hecho de que la PCN participe en la infección de modelos alternativos como plantas,

insectos y nemátodos, sugiere que es un factor de virulencia conservado que permite que *P. aeruginosa* infecte a hospedadores con diversos orígenes evolutivos (Lau *et al.*, 2004). Clínicamente tiene gran relevancia, pues tiene un papel crítico en las infecciones nosocomiales, especialmente en pacientes que padecen FQ y otitis media crónica, ya que presentan cantidades muy elevadas de este pigmento en sus secreciones (Rashid *et al.*, 2020). Las concentraciones elevadas de PCN en el esputo de pacientes con FQ provocó la apoptosis de los neutrófilos, por el contrario, las cepas deficientes en este pigmento redujeron de manera significativa esta capacidad. Además no afectó a todas las células por igual, puesto que los macrófagos y las células epiteliales de las vías respiratorias no fueron sensibles a la PCN pese a exponerlas a concentraciones similares (Usher *et al.*, 2002). La PCN también interfiere en múltiples funciones celulares de los mamíferos (Lau *et al.*, 2004) causando múltiples daños en el hospedador, tales como: inhibición del crecimiento de las células epidérmicas y de la respiración celular; alteración de la función ciliar (Sorensen & Klinger, 1987) e interrupción de la homeostasis del calcio modulando el ciclo redox generando ROS (Denning *et al.*, 1998). Además inhibe la liberación de prostaciclina (anticoagulante y vasodilatador) (Kamath *et al.*, 1995) y de óxido nítrico; y finalmente, altera el sistema inmune mediante la modulación de los niveles de citoquinas RANTES e IL-8 (Jayaseelan *et al.*, 2014; Lau *et al.*, 2004; Denning *et al.*, 1998). En los últimos años se ha revelado que causa más daños de los que se pensaba, ya que es capaz de reducir la transcripción del gen que codifica la catalasa en la línea celular epitelial alveolar humana A549, y en las células epiteliales bronquiales humanas (O'Malley *et al.*, 2003) implicadas en la modulación del glutatión celular (GSH). De modo que en pacientes con FQ, además de la disfunción de los canales de cloro CFTR, se le añade por el efecto de la PCN el agotamiento del GSH, que es el mayor componente del sistema de defensa antioxidante del pulmón humano que, en condiciones normales, protege al tracto respiratorio inferior del estrés oxidativo (Ancochea *et al.*, 2004).

En conjunto, la gran cantidad de efectos nocivos que produce en el tejido colonizado y los numerosos efectos antagónicos en el huésped, tanto *in vivo* como *in vitro*, ponen de manifiesto que este pigmento juega un papel importante en el mantenimiento de las infecciones crónicas y en la patogénesis mediada por *P. aeruginosa* (Hall *et al.*, 2016; Lau *et al.*, 2004).

Otro pigmento involucrado en la virulencia es el sideróforo pioverdina (PVD), una molécula de bajo peso molecular que actúa como agente quelante del hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Schalk & Guillon, 2013). Este elemento es esencial para el crecimiento bacteriano y en



el transcurso de las infecciones puede ser un factor limitante (Page, 2019; Holden & Bachman, 2015). Los sideróforos se componen de tres partes: un cromóforo de tipo dihidroquinolina (responsable de su fluorescencia), un péptido específico de la cepa (que comprende 6–12 aminoácidos), y una cadena lateral unida al átomo de nitrógeno en la posición C-3 del cromóforo (Schalk & Guillon, 2013). *P. aeruginosa* puede producir tres tipos distintos de pioverdina: PVDI, PVDII y PVDIII, cada una caracterizada por tener una cadena peptídica diferente (Meyer, 2000; Meyer *et al.*, 1997), siendo la producida por la cepa tipo PAO1 la del grupo I (PVDI) (Schalk & Guillon, 2013).

Su síntesis implica numerosas enzimas diferentes, incluyendo las sintetetasas peptídicas no ribosómicas, las cuales se encargan de producir el cromóforo y las distintas cadenas peptídicas (Hohlneicher *et al.*, 2001). Uno de los métodos más comunes de adquisición de hierro implica la secreción al medio extracelular de estos compuestos quelantes de alta afinidad, y una vez se han formado los complejos ferri-sideróforos, son absorbidos por la bacteria a través de receptores específicos de la superficie celular (Braun, 1995). La vía de señalización comprende: el receptor de membrana externa FpvA, el factor antisigma FpvR y el factor sigma de la familia extracitoplasmática (ECF) PvdS (Lamont *et al.*, 2002). De modo que los complejos formados se transportan al interior celular a través del receptor de la superficie celular FpvA, que transduce una señal a la parte periplásmica del factor antisigma FpvR, el cual controla la actividad de ECF PvdS. Éste se une a la ARN polimerasa e inicia la transcripción de los genes necesarios para la producción de PVD, así como para la producción de los factores de virulencia, exotoxina A (ToxA) y endoproteasa, PrpL (Schalk & Guillon, 2013; Visca *et al.*, 2007; Lamont *et al.*, 2002). Es importante destacar que la expresión de PvdS está regulada por la proteína represora Fur, cuya función es detectar el hierro, por tanto, PvdS (y como consecuencia la PVD) únicamente se sintetiza en condiciones limitantes de hierro (Leoni *et al.*, 1996; Cunliffe *et al.*, 1995).

Son varios los motivos que hacen que la PVD sea un pigmento esencial para la patogénesis de *P. aeruginosa*. En primer lugar, debido a su elevada afinidad por el hierro, este patógeno puede infligir un daño considerable al huésped a fin de secuestrar dicha molécula de las proteínas, como la transferrina y la lactoferrina (Xiao & Kisaalita, 1997; Meyer *et al.*, 1996), incluso es capaz de adquirirlo de las mitocondrias (Kang *et al.*, 2018; Kirienko *et al.*, 2015; Kirienko *et al.*, 2013). En segundo lugar, como se ha comentado, una vez se ha formado el complejo ferri-sideróforo se desencadena la expresión de la propia maquinaria biosintética de la PVD y de diversos factores de virulencia (Lamont

*et al.*, 2002; Wilderman *et al.*, 2001; Ochsner *et al.*, 1996); y en tercer lugar, el hierro proporcionado por este sideróforo se requiere para la formación de biopelículas (Banin *et al.*, 2005). De modo que la PVD juega un papel fundamental en el desarrollo de las infecciones, tanto agudas como crónicas y, al igual que la piocianina, es capaz de producir infección en diferentes modelos experimentales (Visca *et al.*, 2007). En particular, se ha determinado tanto en un modelo murino como en el modelo alternativo *C. elegans*, que la acumulación de PVD en los tejidos del huésped (tejidos pulmonares en los ratones y tejidos extrafaríngeos en *C. elegans*), se correlacionó con una mayor virulencia de *P.aeruginosa* y como consecuencia una mayor mortalidad en estos modelos (Kang *et al.*, 2019). Asimismo, el análisis de este factor de virulencia testado en diferentes modelos de infección (plantas, modelos invertebrados y mamíferos) reveló que la PVD producía un mayor efecto en mamíferos en comparación con los invertebrados *D. melanogaster* y *G.mellonella*, por lo que podría utilizarse como diana para el control de las infecciones en humanos. Sin embargo, dada la variación observada en los experimentos, probablemente el impacto clínico variaría en función del tipo de infección y se limitaría a atenuar el efecto de la misma en lugar de tener un efecto de cura (Granato *et al.*, 2016). Esto significaría que a pesar de que pudiesen utilizarse como dianas útiles, deberían administrarse en combinación con tratamientos antibióticos (Banin *et al.*, 2008).

El esputo de pacientes con FQ contiene cantidades significativas de PVD (Haas *et al.*, 1991). Sin embargo, en el estudio realizado por De Vos y su equipo, más del 25% de los aislados procedentes FQ fueron incapaces de sintetizar PVD (De Vos *et al.*, 2001). Este resultado podría deberse a la tasa particularmente alta de mutación que presentan estas cepas, pudiendo producir mutaciones en los genes *pvd* (Macía *et al.*, 2005; Oliver *et al.*, 2000). Otra posibilidad es que los mutantes deficientes en PVD obtengan el hierro por captación cruzada de las cepas productoras de PVD, evitando gastar los mismos recursos, obteniendo así un beneficio individual (Harrison & Buckling, 2005; Griffin *et al.*, 2004). Otra opción, es que el aumento de las concentraciones de hierro en los pulmones de los pacientes con FQ (Reid *et al.*, 2004; Reid *et al.*, 2002; Stites *et al.*, 1998) favoreciese la presencia de cepas defectuosas en dichos sistemas. No obstante, los mamíferos secretan proteínas que agotan el hierro, como la lipocalina asociada a la gelatinasa neutrófila (NGAL), que eliminan los sideróforos bacterianos, evitando el establecimiento de la infección (Saiga *et al.*, 2008; Flo *et al.*, 2004). Sin embargo, cabe destacar que según el estudio realizado por Peek y colaboradores, la NGAL no se unía a



la pioverdina, sugiriendo que *P. aeruginosa* evadía el reconocimiento de esta proteína permitiéndole establecer la infección en el huésped (Peek *et al.*, 2012).

#### **1.5.4 Mecanismos extracelulares involucrados en la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*.**

Dentro de los mecanismos de virulencia de este organismo, podemos encontrar las hemolisinas (fosfolipasa C y ramnolípido) y las proteasas (alginato). Ambos factores juegan un papel importante en las infecciones respiratorias, especialmente en FQ, pues tienen la finalidad de producir lesiones en el huésped y evadir su sistema inmunitario, a fin de poder propagar la infección.

- **Hemolisinas:**

*P. aeruginosa* produce la hemolisina termolábil, conocida como fosfolipasa C (Plc), y la hemolisina termoestable denominada ramnolípido (Rhl). La fosfolipasa C degrada los lípidos y la lecitina, promoviendo la destrucción tisular; mientras que la función del ramnolípido se basa en solubilizar los fosfolípidos, inhibir la actividad ciliar del sistema respiratorio y alterar aquellos tejidos que contienen lecitina (Read *et al.*, 1992; Fujita, 1987). De manera que, la acción de ambas puede causar daños en los pulmones de pacientes con FQ, dando lugar a un colapso alveolar debido al déficit de sustancia surfactante (agente tensioactivo compuesto por agua y fosfolípidos), que impide que se colapsen los alveolos durante la respiración (Soberón-Chávez *et al.*, 2005).

- **Alginato:**

Es un copolímero lineal de D-manuronato y C-5 L-guluronato con enlaces  $\beta$ -1,4 (Gacesa & Russell, 1990) considerado factor de virulencia relevante debido a su implicación en la formación de biopelículas (Colmer-Hamood *et al.*, 2016). Su hiperexpresión proporciona un aspecto mucoide a los aislados de *P. aeruginosa* y les confiere protección frente las tensiones que se producen del ambiente. Este fenotipo, ausente en la mayoría de las cepas clínicas y ambientales, es característico de los aislados procedentes de FQ, siendo la causa principal de morbilidad y mortalidad en los pacientes que la padecen (Hauser *et al.*, 2011; Govan & Deretic, 1996). La barrera física producida por el exopolisacárido mucoide proporciona muchas ventajas a *P. aeruginosa* durante la

infección, entre las cuales destacan: la disminución de la fagocitosis; degradación de los radicales libres liberados por los neutrófilos y macrófagos e inhibición de la activación del complemento y de la entrada de antibióticos a la célula (Wu *et al.*, 2015; Hauser *et al.*, 2011; Boyd & Chakrabarty, 1995). En la biosíntesis de este compuesto intervienen doce genes localizados en un solo operón denominado *algD*, sujeto a una regulación positiva y negativa. AlgU es un factor sigma esencial para la expresión de *algD*, dando lugar a la producción de alginato. Se inactiva por el factor anti-sigma MucA (codificado por *mucA*) inhibiendo la síntesis del mismo y de alginato (Hauser *et al.*, 2011). De modo que en las cepas ambientales, el factor anti-sigma MucA se encuentra inactivando al factor sigma AlgU, por tanto no sintetizan alginato. Sin embargo, en pacientes con FQ, se seleccionan mutantes *mucA* (provocando a una pérdida en la producción MucA), con la consecuente desrepresión de AlgU e hiperproducción de alginato.

### **1.5.5 Quorum sensing como sistema de detección celular.**

El *Quorum sensing* (QS) es un sistema de comunicación intercelular bacteriana dependiente de la densidad celular, que permite que las células individuales actúen de forma comunitaria y adaptarse a los cambios ambientales conjuntamente. Se ha visto que desempeña un papel importante en la regulación de la expresión génica, llegando a controlar la expresión de más de 300 genes involucrados tanto en la resistencia, como en la virulencia de la bacteria (Lee & Zhang, 2015). Entre otros, regula la producción de proteasas extracelulares, quelantes de hierro, formación de biopelículas, motilidad y además interviene en la expresión de las bombas de eflujo, y en la respuesta a las señales del sistema inmune del huésped (Stevens *et al.*, 2012; Kipnis *et al.*, 2006; Schuster & Greenberg, 2006).

En QS, la bacteria secreta pequeñas moléculas llamadas autoinductores, que cuando alcanzan un umbral de concentración, se difunden nuevamente dentro de la célula para provocar una respuesta coordinada y promover la supervivencia del grupo (Stevens *et al.*, 2012). Entre los activadores clave de este sistema se encuentran LasR, RhlR, MvfR y VqsR, sin embargo, reguladores como AmpR afectan a la regulación de los genes de QS por un mecanismo desconocido (Balasubramanian *et al.*, 2013).

Actualmente se conocen tres sistemas interconectados de comunicación: *las*, *rhl* y *pqs* (Cornelis, 2020; Lee & Zhang, 2015): Las y Rhl son sistemas de señalización de N-acil homoserina lactona que conjuntamente afectan al 10% del transcriptoma de *P.aeruginosa* (Schuster & Greenberg, 2006). En particular, y de forma breve, el sistema

las se encuentra implicado en la expresión de diversos genes relacionados con la virulencia, incluidos aquellos involucrados en la síntesis de PVD y la del propio autoinductor sintasa, LasI (Whiteley *et al.*, 1999). También actúa sobre el sistema *rhl* y participa activamente en la maduración de las biopelículas (Davies *et al.*, 1998). En cambio, el sistema *rhl*, es el encargado de activar la síntesis de ramnolípido, elastasa LasB y PCN, entre otros factores de virulencia (Whiteley *et al.*, 1999). Cabe decir que el sistema *pqs* está interrelacionado con los dos anteriores, por tanto, la molécula señal la 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona, conocida como “señal quinolona de *Pseudomonas*” (*Pseudomonas quinolone signal, pqs*), activa la formación de biopelículas y regula el sistema *rhl* activando los factores de virulencia mencionados (Pesci *et al.*, 1999). Finalmente, *iqs*, a pesar de relacionarse en la bibliografía como cuarto sistema de QS de *P.aeruginosa* que interviene en la síntesis de las señales *pqs* y de factores de virulencia (Lee *et al.*, 2013), es importante destacar que recientemente se ha demostrado que no forma parte de los sistemas de QS, ya que su síntesis no depende de los genes *ambABCDE*, sino que se trata de un subproducto (aeruginaldehído) de la vía biosintética del sideróforo pioquelina (Cornelis, 2020).

### **1.5.6 Biopelículas.**

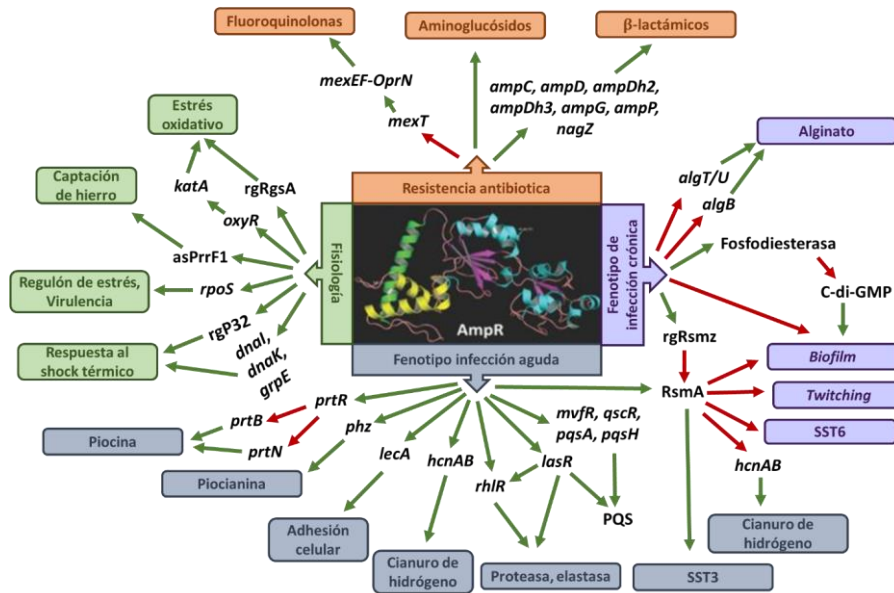
Las biopelículas son comunidades de microorganismos adheridos a una superficie biótica o abiótica rodeada por una matriz de exopolisacárido ADN y proteínas, cuya función se basa en garantizar la protección de los microorganismos frente las agresiones del ambiente. El desarrollo de las biopelículas está controlado por el sistema de QS, de forma que su formación depende de la densidad celular y de la disponibilidad de nutrientes en el medio (Branda *et al.*, 2005; Whitchurch *et al.*, 2002). *P. aeruginosa* es capaz de formar dos tipos de biopelículas: “plano o inicial” y “estructurado o maduro”. En el inicial la confluencia entre las bacterias es uniforme en la superficie, y en el maduro se forman agregados celulares en el interior de la matriz separados por canales o espacios (Kirisits & Parsek, 2006). Dichos canales permiten el flujo de agua, oxígeno y nutrientes, incluso en las zonas más profundas. Sin embargo, en el interior de las biopelículas se encuentran ambientes donde la concentración de oxígeno, pH y nutrientes son diferentes (Davey & O’toole, 2000).

### **1.5.7 AmpR como regulador transcripcional de la virulencia.**

AmpR como se ha mencionado previamente, es un regulador global de la familia LysR. Son los reguladores más abundantes del reino procariota que característicamente se encargan de regular su propia expresión (Maddocks & Oyston, 2008; Schell, 1993). Estudios recientes han demostrado que además de estar involucrado en la regulación de la resistencia a los antibióticos, AmpR posee un extenso regulón que abarca varios factores fisiológicos y de virulencia (Kumari *et al.*, 2014; Balasubramanian *et al.*, 2014; Balasubramanian *et al.*, 2012; Balasubramanian *et al.*, 2011). En análisis proteómicos y fenotípicos, se ha demostrado que regula la expresión de cientos de genes involucrados: en la detección de QS y los fenotipos de virulencia asociados; en diversos procesos fisiológicos y de resistencia antibiótica ( $\beta$ -lactámicos y no- $\beta$ -lactámicos); y en la fosforilación de proteínas, además de ser un componente crítico en el crecimiento celular y la supervivencia de *P. aeruginosa* (Balasubramanian *et al.*, 2012).

Como se ha ido desarrollando a lo largo de esta sección, el potencial patogénico de *P. aeruginosa* está determinado por un gran número de determinantes de virulencia secretados (piocianina, exotoxinas, proteasas, elastasas, etc.) y asociados a la célula (flagelos, pili, lipopolisacáridos). La expresión de la gran mayoría de los factores de virulencia secretados está bajo el control de QS (Williams & Cámara, 2009), en el que se encuentran involucrados los sistemas *las*, *rhl* y *pqs* (Cornelis, 2020). El regulador transcripcional LasR se encuentra en la parte superior de la jerarquía de QS y controla la expresión de los sistemas Las, Rhl y PQS (*Pseudomonas Quinolone signal*) (McGrath *et al.*, 2004; Pesci *et al.*, 1997; Latifi *et al.*, 1996). Éste a su vez está regulado por muchos reguladores transcripcionales diferentes (Balasubramanian *et al.*, 2013) entre los que se encuentra AmpR. De manera que, este último regula la expresión de los principales reguladores de QS, LasR, RhlR, MvfR y QscR, controlando así la expresión de toda la cascada reguladora. De hecho, estudios recientes han demostrado la unión directa de AmpR al promotor de LasR (Balasubramanian *et al.*, 2014). Así lo demostraron Balasubramanian y su equipo en el modelo invertebrado de infección *C. elegans*, exponiéndolos a la cepa tipo PAO1 y a su mutante isogénico *ampR*, PAO $\Delta$ *ampR*. La pérdida del regulador en PAO1 produjo una disminución en la producción de factores de virulencia aguda regulados por QS, como las proteasas LasA y LasB, y la piocianina; disminuyendo la virulencia de *P. aeruginosa* del 38% al 15% en 8 horas. Estos resultados fueron claros indicativos de que AmpR se encuentra en el centro de la red de patogénesis

de *P.aeruginosa* mediante la regulación de QS, y que por tanto, es necesario para que se alcance la virulencia máxima en los nematodos (Balasubramanian *et al.*, 2012).



**Figura 1.7.** Papel de AmpR en la regulación de la resistencia a antibióticos, en la virulencia y en la fisiología de *P. aeruginosa*. Se muestra la expresión génica confirmada por qPCR. Regulación positiva (verde) y negativa (rojo). Modificado de Balasubramanian *et al.*, 2015.

Corroborando el efecto de AmpR sobre los factores de virulencia, un estudio centrado en los genes involucrados en la expresión de PVD y pioquelina concluyó que AmpR se hallaba implicado en la regulación positiva de los mismos. Particularmente la pérdida de *ampR* provocó un crecimiento deteriorado del microorganismo en condiciones limitantes de hierro, situación que se revirtió añadiendo dicho compuesto al medio. Esta observación sugirió que AmpR afecta la absorción de hierro, pero no a su utilización (Balasubramanian *et al.*, 2014).

Debido al papel de AmpR en las infecciones agudas y crónicas, es muy probable que la virulencia de *P. aeruginosa* mediada por este regulador tenga un impacto importante en su éxito clínico (Balasubramanian *et al.*, 2015). La pérdida del mismo se traduce en fenotipos semejantes a cepas de infección crónica, mostrando una pérdida de factores dependientes (proteasas, elastasas, piocianina) e independientes (regulación negativa de los genes SST3) de QS; una mayor resistencia antibiótica y un aumento en la formación de biopelículas debido a la regulación directa de LasR por AmpR (Balasubramanian *et al.*, 2014; Kumari *et al.*, 2014; Balasubramanian *et al.*, 2012). Asimismo, promueve la hipermutabilidad y el fenotipo mucoide en *P. aeruginosa*, ya que

también regula negativamente la expresión de alginato por medio de AlgT/U (Oliver *et al.*, 2000; Doggett, 1969).

El proceso de infección se inicia por medio de células plantónicas que expresan una amplia variedad de factores de virulencia aguda (Ma *et al.*, 2009; Vallet *et al.*, 2001) que ayudan al establecimiento de la infección (Hauser, 2009; Williams & Cámara, 2009). En esta etapa, los microorganismos suelen ser sensibles a los antibióticos (Hogardt & Heesemann, 2013), a menos que la infección inicial se produzca por una cepa resistente. Como parte del proceso de adaptación hacia la infección crónica, como sería la FQ, las cepas pierden capacidad de producir factores de virulencia aguda e hiperexpresan aquellos involucrados en la virulencia crónica (aumento en la formación de biopelículas y resistencia) (Oliver *et al.*, 2000; Doggett, 1969).

#### **1.5.8 Islas de genómicas (PAGI) e islas de patogenicidad (PAPI).**

Una parte importante de los determinantes de virulencia están codificados en el genoma de *P. aeruginosa* de modo que son compartidos por la mayoría de las cepas. Sin embargo, algunas cepas pueden contener islas genómicas adicionales, que incrementen su virulencia (Spencer *et al.*, 2003). Las islas de patogenicidad (PAPI) al igual que las islas genómicas (PAGI), son segmentos de ADN transferidos de forma horizontal que se integran a menudo en genes de ARNt, presentan un contenido G+C diferente al resto del genoma e incluyen elementos genéticos móviles. En *P. aeruginosa* podemos encontrar 12 islas genómicas desempeñando un papel importante en la virulencia (Singh *et al.*, 2014; Battle *et al.*, 2009; Battle *et al.*, 2008) y 2 islas de patogenicidad, PAPI-1 y PAPI-2 descritas en la cepa PA14, las cuales incrementan su virulencia (Kung *et al.*, 2010). PAPI-1 tiene un tamaño de 108 kb y codifica para varios factores de virulencia, como el pili tipo IVB y el regulador de dos componentes PvrR, y PAPI-2 con un tamaño de 11 kb, es reconocida por codificar la proteína ExoU y su chaperona, SpcU, como se ha explicado en el apartado 1.5.2 de la Introducción.

### **1.6 Modelos invertebrados de infección: *Caenorhabditis elegans* y *Galleria mellonella*.**

Durante muchos años se ha pensado que los mamíferos eran la única opción para estudiar las interacciones huésped-patógeno, y evaluar la preclínica de las vacunas y los fármacos antes de su uso en humanos (Means & Aballay, 2011). No obstante, dichos

modelos además de ser económicamente más caros y estar asociados a cuestiones éticas, son difíciles de utilizar de forma rutinaria para el estudio de enfermedades. Por tanto, los modelos alternativos y de fácil manejo siguen siendo necesarios para estudiar la virulencia de los patógenos bacterianos. Dado que los modelos animales no mamíferos como sujetos de experimentación tienen menos limitaciones éticas y económicas, en algunos casos podría ser apropiado incluirlos como herramientas valiosas para explorar dichas interacciones. Existen numerosos datos científicos que argumentan un uso cada vez más amplio de modelos alternativos, como son el vertebrado pez cebra (*Danio rerio*), insectos (*G. mellonella*) y nematodos (*C. elegans*), en el estudio de diversos agentes infecciosos que afectan a los seres humanos (López Hernández *et al.*, 2015).

Los modelos invertebrados de infección han revelado conocimientos importantes sobre las interacciones huésped-patógeno, incluyendo los fundamentos principales del proceso infeccioso, así como en la respuesta inmune del huésped, ambos relevantes en las infecciones en mamíferos (Vogel, 2012; Casadevall, 2005; Lemaitre *et al.*, 1996). En general, el uso compartido de factores de virulencia por un patógeno que infecta a diferentes huéspedes, sugiere que los mecanismos de patogénesis son a menudo independientes del huésped (Irazoqui *et al.*, 2010; Waterfield *et al.*, 2004). Del mismo modo, si un patógeno particular activa respuestas de defensa similares, tanto en hospedadores invertebrados como en vertebrados, sugiere que los mecanismos subyacentes y las vías de señalización de la inmunidad innata contra el patógeno pueden estar conservadas (Yuen & Ausubel, 2014; Irazoqui *et al.*, 2010).

Como se verá más adelante, en este trabajo se ha optado por los modelos alternativos y de fácil manejo, *C. elegans* y *G. mellonella*. Ambos presentan ventajas que los hacen potencialmente útiles para el estudio de microorganismos que afectan a los seres humanos, y gracias a su fácil manejo, mantenimiento, bajo coste, y abstención del cumplimiento de una normativa ética para su uso, permiten la realización de grandes cribados iniciales.

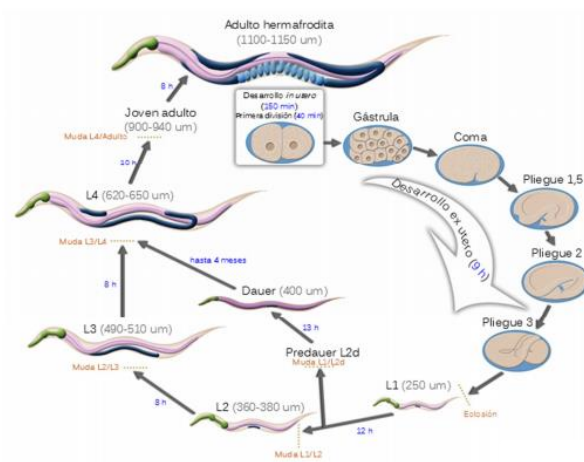
#### **A) Modelo invertebrado de infección *Caenorhabditis elegans***

*Caenorhabditis elegans* es un nematodo de pequeño tamaño (1,5 mm de longitud adulto) (Riddle *et al.*, 1997) que habita en el medio ambiente, entre vegetación y fruta en descomposición donde se alimenta de microorganismos (Kirienko *et al.*, 2014; Yuen & Ausubel, 2014). Fue propuesto como modelo experimental para el estudio de la biología del desarrollo y del sistema nervioso por Sydney Brenner en 1973 (Brenner, 1973) y al



tener secuenciado el genoma completo desde 1998, en la actualidad es uno de los metazoos mejor estudiados (López Hernández *et al.*, 2015; Schulenburg & Ewbank, 2007). Sin embargo, su uso como modelo para el estudio de la patogénesis microbiana y la inmunidad innata es reciente (Kirienko *et al.*, 2014).

Un atractivo añadido para el uso de este nematodo como modelo experimental es su ciclo de vida corto y la gran cantidad de progenie que genera. El ciclo tiene una duración de aproximadamente 4 días a una temperatura óptima de 22-24°C, desarrollándose a lo largo de cuatro etapas larvarias (L1-L4). Siendo L1 la primera etapa larvaria y L4, la etapa adulta en la que se puede distinguir su sexualidad (figura 1.8).



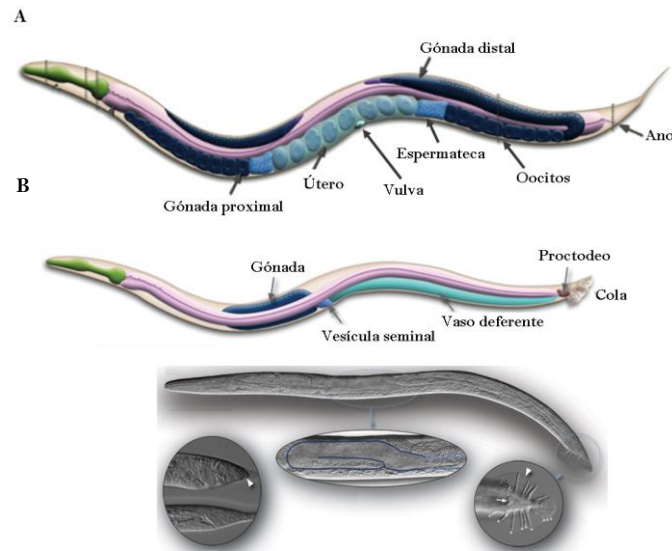
**Figura 1.8.** Ciclo de vida de *C. elegans* a 22°C. Comprende la fases embrionaria, larvaria (L1-L4) y adulta (Altun & Hall, 2009) Modificado de WormAtlas.

Presenta dos formas sexuales: hermafroditas, los cuales poseen dos cromosomas sexuales X (XX); y machos, formados únicamente por un cromosoma sexual X (X0). Aunque anatómicamente son muy similares, pueden diferenciarse bajo la lupa en su etapa adulta, ya que se diferencian por sus estructuras sexuales, y el tamaño inferior de los machos debido al tamaño reducido de su gónada y a la ausencia de embriones en desarrollo (figura 1.9 A y B) (Corsi *et al.*, 2015).

El aparato reproductor de los hermafroditas consta de un ovario distal, un oviducto proximal y una espermateca conectada al útero situado alrededor de la vulva (Schedl *et al.*, 1997). Ambas gónadas albergan la línea germinal donde se desarrollan los espermatozoides (en la etapa larvaria) y los ovocitos (en fase adulta) (Hubbard & Greenstein, 2005). Los ovocitos se fertilizan a medida que pasan a través de la espermateca hacia el útero, donde residirán los óvulos fertilizados y embriones en las primeras etapas de desarrollo. Las diferencias más notables en las larvas macho, se ven



en los tejidos de la parte posterior, donde desarrollan sus órganos sexuales, los cuales están formados por una gónada que se abre al exterior a través de la cloaca, mediante una cámara epitelial denominada proctodeo, cuya función se basa en localizar la vulva y mantenerla abierta durante el apareamiento mediante dos espículas sensoriales (Altun & Hall, 2009; Garcia *et al.*, 2001; Liu & Sternberg, 1995).



**Figura 1.9.** Principales estructuras sexuales de **A)** *C. elegans* hermafrodita adulto **B)** *C. elegans* macho adulto. Modificado de WormAtlas (Altun & Hall, 2009).

Los nematodos hermafroditas, se han definido como hembras capaces de autofecundarse en ausencia de machos produciendo una progenie genéticamente idéntica. Durante el período de fertilidad pueden formar hasta 300 embriones, no obstante, si se aparean con machos, pueden generar una progenie mucho mayor dando lugar a aproximadamente 1000 crías. Esto indica que el esperma producido por los hermafroditas es un factor limitante en la autofecundación. La mayoría de los descendientes producidos son hermafroditas; únicamente el 0.1-0.2% son machos. No obstante, un aumento de la temperatura durante su desarrollo podría inducir a una proliferación de machos. Esto se debe a que el crecimiento por encima de la temperatura óptima (12°C - 25°C), produce errores en la disyunción del cromosoma X, dando lugar a gametos aneuploides (0), los cuales se unirán a un portador X dando lugar a organismos machos (X0) (Altun & Hall, 2009; Lints & Hall, 2009). Incluso, se ha determinado que el crecimiento continuo por encima de 25°C provoca esterilidad en los nematodos, por tanto, como consecuencia de todo ello no se produciría progenie (Corsi *et al.*, 2015).

Gracias a su alimentación a base de microorganismos, es un modelo que puede ser infectado por un número notable de patógenos humanos (Kirienko *et al.*, 2014; Kurz & Ewbank, 2000). De hecho, se ha demostrado que comparte similitudes con el sistema inmune innato de los mamíferos, concretamente, con las cascadas de señalización en respuesta a la invasión de patógenos; y este hecho se deba probablemente, a su estrecha relación con los microorganismos como fuente de alimento, ya que pueden ejercer una presión selectiva para evolucionar y mantener los mecanismos inmunitarios de defensa del nematodo (López Hernández *et al.*, 2015). Desde una perspectiva evolutiva, el sistema inmunológico de *C. elegans* precede a la inmunidad altamente compleja de los vertebrados, puesto que únicamente presenta algunas de las redes de señalización más ancestrales. Este hecho podría ser una ventaja para el estudio de las cascadas de señalización (Ermolaeva & Schumacher, 2014). Un ejemplo de los mecanismos implicados en la defensa antimicrobiana en *C. elegans*, es la señalización relacionada con la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) p38 MAP, la cual es homóloga a la ruta quinasa 1 regulada por señal apoptótica (ASK-1)-MAPK quinasa 3/6 (MKK3/6)-p38 MAPK, necesaria para las respuestas inmunitarias innatas en mamíferos (Kim, 2008).

Se han publicado protocolos detallados para llevar a cabo ensayos de mortalidad en *C. elegans* con múltiples patógenos bacterianos y fúngicos (Powell & Ausubel, 2008; Couillault & Ewbank, 2002; Mylonakis *et al.*, 2002). Hasta el momento el patógeno más estudiado para infectar a *C. elegans* ha sido *P. aeruginosa*, en particular la cepa PA14 (Park *et al.*, 2017; Kirienko *et al.*, 2014). Así pues, Tan y colaboradores (Tan *et al.*, 1999) determinaron que muchos factores de virulencia de *P. aeruginosa* necesarios para causar daños en *C. elegans* (como *gacA*, *toxA*), también fueron necesarios para inducir una mayor virulencia a un modelo murino. Concretamente 9 de 13 genes identificados, fueron necesarios para causar la infección en el modelo murino. Además, demostraron que las fenazinas secretadas por este patógeno, estaban relacionadas con una mayor virulencia, ejerciendo efectos tóxicos sobre *C. elegans* a través de la generación de ROS (Tan *et al.*, 1999). Asimismo, otro estudio, reveló que mutantes de PA14 en genes relacionados con la patogenicidad, disminuyeron su virulencia en el modelo (Rahme *et al.*, 1995); sugiriendo todo ello, que la interacción *P. aeruginosa-C. elegans* puede ser utilizada para identificar nuevos factores de virulencia de *P. aeruginosa* importantes para la patogénesis en los mamíferos.

En el laboratorio *C. elegans* se propaga sobre agar con un césped extendido de *E.coli* cepa OP50 (Kirienko *et al.*, 2014) o sobre el medio *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Navas *et al.*, 2007), de los cuales se alimenta. Debido a su pequeño tamaño, se observan mediante lupas o microscopios que permiten su aumento hasta 1000 veces.

Para llevar a cabo los ensayos de infección, los nematodos deben estar sincronizados aproximadamente 1 semana antes, a fin de reducir la variabilidad de los resultados asociados a las diferencias del desarrollo (López Hernández *et al.*, 2015).

Dependiendo de la forma en la que se prepara el microorganismo para llevar a cabo la infección, se pueden diferenciar 3 tipos de ensayos diferentes: *Fast Killing*, *Slow Killing* y *Liquid Killing* (Kirienko *et al.*, 2013; Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 1999).

El ensayo *Fast Killing* (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999), se trata de una intoxicación rápida de *C. elegans*. Se produce cuando se cultiva el microorganismo en cuestión en medios sólidos (agar) con una elevada osmolaridad, y los nematodos transferidos mueren en el transcurso de 24 horas. Dicha intoxicación está mediada, al menos en parte, por toxinas de bajo peso molecular, incluidas las fenazinas (piocianina). Este ensayo no requiere bacterias vivas, por tanto, no depende de la acumulación de las mismas en el lumen intestinal. Normalmente se utiliza para comparar la virulencia entre diferentes mutantes, aunque también puede usarse para comparar la sensibilidad de diferentes mutantes de *C. elegans* a las toxinas.

El ensayo *Slow Killing* (Tan *et al.*, 1999) se trata de una infección activa con microorganismos vivos. A diferencia del *Fast Killing* se produce cuando los nematodos son cultivados en medios sólidos con un bajo contenido en nutrientes (baja osmolaridad). En este caso, las bacterias se acumulan en el lumen intestinal de *C. elegans*, los cuales desarrollan los síntomas de una infección (lumen intestinal dilatado, reducción de células epiteliales intestinales, motilidad reducida, etc.), muriendo en el transcurso de varios días. Es importante usar larvas del mismo sexo y estadio, debido a que cada una presenta una resistencia diferente frente a la infección. Los hermafroditas L4, son una opción indicada, ya que tienen un tiempo de mortalidad medio entre los adultos jóvenes, que mueren antes, y los adultos machos que mueren más lentamente. Es un tipo de ensayo que suele utilizarse para comparar la sensibilidad de diferentes mutantes de *C. elegans* a la infección, así como para comparar la virulencia de distintos microorganismos en este modelo de infección.

Se ha evidenciado que los ensayos *Fast Killing* y *Slow Killing* están sujetos a mecanismos subyacentes completamente diferentes; ya que al transferir *C. elegans* a

bacterias lisadas por calor, a los medios de los respectivos experimentos, éstas fueron capaces de producir la mortalidad de los nematodos por *Fast Killing* pero no por *Slow Killing* (Tan *et al.*, 1999).

Un ejemplo reciente en el que usaron el ensayo *Slow-Killing* en *C. elegans* con patógenos humanos, es el trabajo realizado por Scott y colaboradores (Scott *et al.*, 2020), en el cual evaluaron la virulencia de tres patógenos del grupo ESKAPE (*P. aeruginosa*, *K.pneumoniae* y *A. baumannii*). Los resultados mostraron que *P. aeruginosa* fue la bacteria más patógena, seguida de *K. pneumoniae*, sin embargo, *A. baumannii* no fue virulenta para el modelo. Dicha patogenicidad fue asociada de manera inversamente proporcional al tiempo en que *C. elegans* residía en el césped bacteriano, mostrando una reducción en el tiempo que *C. elegans* permaneció en el césped de *P. aeruginosa*. No obstante, a diferencia de otros estudios realizados, las cepas más patógenas no estaban asociadas a una mayor colonización intestinal, ya que los nematodos mostraron un aclaramiento mejorado en *P. aeruginosa*; probablemente para llegar a un equilibrio entre microbiota saludable y eliminación de bacterias patógenas. Estos datos, refuerzan la complejidad de comprensión entre las interacciones huésped-patógeno, ya que son varios los factores que interactúan para controlar la patogenicidad en *C. elegans* (Scott *et al.*, 2020).

Finalmente, el ensayo *Liquid Killing* (Kirienko *et al.*, 2013) se trata de una modificación del ensayo *Slow Killing*. Ambas técnicas se desarrollan de la misma manera, con la diferencia de que en el paso final, en *Liquid Killing* las bacterias se transfieren a un medio líquido en placas de microtitulación de 384 pocillos en lugar de transferirse a un medio con agar (*Slow Killing*). Esta técnica permite hacer grandes cribados de compuestos químicos para determinar su efecto sobre la infección.

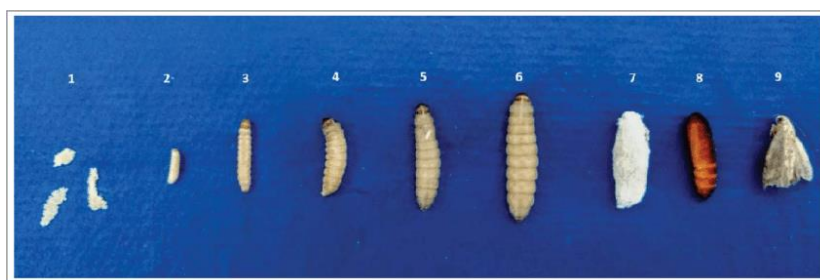
## **B) Modelo invertebrado de infección *Galleria mellonella*:**

*Galleria mellonella*, también conocido como polilla de la cera o gusano de la miel, es un insecto del orden de los Lepidópteros (Tsai *et al.*, 2016). De forma mayoritaria vive en las colmenas de las abejas alimentándose de cera y polen, causando serios problemas a la industria apícola de todo el mundo dada su extensa distribución geográfica (Ellis *et al.*, 2013).

En comparación con *C. elegans*, su ciclo de vida es más largo, con una duración de aproximadamente 7-8 semanas, dependiendo de las condiciones ambientales y el suministro de alimentos (Pereira *et al.*, 2018; Kwadha *et al.*, 2017; Ellis *et al.*, 2013). Se ha demostrado que los factores abióticos como la temperatura y la humedad relativa son

cruciales para todo el ciclo de vida, siendo su temperatura óptima de desarrollo 29–33°C (Kwadha *et al.*, 2017). A pesar de haber sido utilizado como modelo alternativo de infección desde la década de 1980 (Champion *et al.*, 2016), no se estableció con la misma fuerza que *C. elegans*, por lo que su genoma ha sido secuenciado recientemente (Lange *et al.*, 2018).

A lo largo de su ciclo, *G. mellonella* pasa por cuatro etapas de desarrollo: huevo, larva, prepupa/pupa e insecto adulto o polilla (Jorjão *et al.*, 2018; Wojda, 2017). Las fases que normalmente se utilizan como modelo experimental son la polilla (Wojda, 2017) y más frecuentemente, la larva (Tsai *et al.*, 2016). En concreto, las larvas que se utilizan son las del último estadio (5<sup>o</sup>-6<sup>o</sup>). Tienen un tamaño de 2 a 2.5 cm de largo, lo que las hace fácilmente manipulables en el desarrollo de la investigación. Debido a la ausencia de caracteres morfológicos específicos del sexo durante esta etapa, no se hace una diferenciación entre machos y hembras (Kwadha *et al.*, 2017).

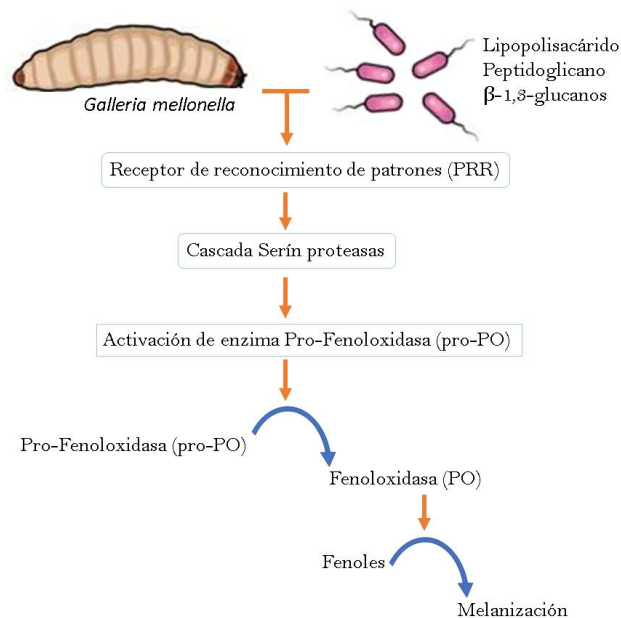


**Figura 1.10.** Fases del desarrollo de *G. mellonella*. Comprende 4 fases: huevos, larvas, prepupas/pupas e insecto adulto o polilla (Jorjão *et al.*, 2018).

Además de las ventajas mencionadas como modelo invertebrado de infección, como su tamaño fácilmente manipulable el cual permite la inyección precisa y directa del patógeno en la hemolinfa, reduciendo el error dentro de la experimentación. Se le añade que se puede incubar a la temperatura fisiológica de los mamíferos (37°C), facilitando el estudio de la patogenia de las infecciones a la temperatura óptima de infección; y además, los resultados post-infección se pueden obtener en un margen de 24-48 horas (Koch *et al.*, 2014). A diferencia de otros huéspedes como los nematodos, los insectos tienen un sistema inmune relativamente avanzado y, por tanto, tienen más probabilidades de generar resultados relevantes relacionados con el proceso de infección de los mamíferos (Ramarao *et al.*, 2012). Poseen un sistema circulatorio y una respuesta inmune innata compleja, incluso, es probable que varios componentes básicos del proceso de infección bacteriana, como la producción de toxinas, la adhesión e invasión celular, sean importantes tanto en insectos como en mamíferos (Jander *et al.*, 2000). La respuesta

inmune innata de *G. mellonella* consiste en 2 partes principales (celular y humoral), con las que combate las infecciones bacterianas, ya sea mediante la activación de los hemocitos fagocíticos circulantes, las cascadas proteolíticas o induciendo efectores inmunes antimicrobianos (Yuen & Ausubel, 2014).

Concretamente, la respuesta humoral se compone de moléculas efectoras solubles que inmovilizan o matan al patógeno, entre ellas se incluyen, proteínas similares al complemento (opsoninas), melanina y péptidos antimicrobianos (AMP) (Tsai *et al.*, 2016). Por otro lado, la respuesta inmune celular, está constituida por unas células denominadas hemocitos (análogas a la sangre de los mamíferos), que se encuentran circulando dentro de la hemolinfa o adheridos a órganos internos, como el tracto digestivo. Dichas células están implicadas en la fagocitosis y encapsulación de los patógenos, así como en la coagulación y la activación de la enzima fenoloxidasa (PO) que conduce a la melanización de las larvas (Altincicek *et al.*, 2008); un proceso relevante que será descrito a continuación. Es importante destacar que estas reacciones son arbitrarias, ya que las defensas inmunes humoral y celular están vinculadas. Los factores humorales influyen en la actividad de los hemocitos y los estos a su vez, son responsables de la producción de muchas moléculas humorales (Lavine & Strand, 2002).



**Figura 1.11.** Cascada de activación de la fenoloxidasa (PO) y producción de melanina en *G. mellonella*

La respuesta de melanización se puede describir como la síntesis y deposición de melanina en la hemolinfa para opsonizar y encapsular patógenos (Tang, 2009). Su actividad está catalizada por la fenoloxidasa (PO), sintetizada como zimógeno inactivo



pro-fenoloxidasa (proPO), en los hemocitos (Tsai *et al.*, 2016; Söderhäll & Cerenius, 1998). Después del reconocimiento de la infección por medio del acoplamiento de receptores que reconocen patrones (PRRs) a las superficies diana de los patógenos, se libera la proenzima inactiva. Esta se activará gracias a la proteólisis desencadenada por cascadas de serín proteasas (Wojda, 2017). La PO activada reacciona con los fenoles transformándolos en quininas, que se polimerizarán formando melanina alrededor de los patógenos y las heridas (Tsai *et al.*, 2016). Su actividad se encuentra bajo un control estricto por inhibidores de serín proteasas, debido a la alta citotoxicidad de los productos intermediarios que genera: dihidroxifenilalanina (DOPA), quinonas y radicales libres; ya que a pesar de ser tóxicos para los microorganismos, también lo son para sus propias células (Cerenius *et al.*, 2008; Kanost & Gorman, 2008; Ashida, 1990).

Los métodos de infección más utilizados son la vía oral (Ramarao *et al.*, 2012) y la intrahemocélica (Koch *et al.*, 2014). En comparación con la inyección intrahemocélica que consiste en inocular, a través del propodio izquierdo del último metámero, concentraciones conocidas del patógeno en cuestión; el uso de la infección oral, basado en la inoculación de los microorganismos a través de la cavidad bucal, es bastante menor, y además, se necesitan compuestos adicionales como toxinas específicas, para alcanzar la mortalidad de *G. mellonella* (Ramarao *et al.*, 2012).

La valoración de la infección se realiza mediante una serie de procedimientos que incluyen, la expresión de proteínas antimicrobianas en respuesta a la infección (Vilmos & Kurucz, 1998), y la producción de lactato deshidrogenasa como marcador de daño celular (Tsai *et al.*, 2016; Wand *et al.*, 2013). Sin embargo, la técnica más usada es la tasa de supervivencia, basada en la infección por vía intrahemocélica, obteniendo la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) (Tsai *et al.*, 2016), definida como concentración a la cual mueren la mitad de las larvas infectadas. Este procedimiento, junto a la activación de la cascada PO y con la consecuente melanización, permite asegurar la mortalidad de *G. mellonella* debida a la infección y la dosis letal del patógeno estudiado. Al igual que en humanos, la cascada se activa una vez se han reconocido los patógenos por los PRR, por tanto, si después de la infección las larvas se oscurecen y mueren, es un claro indicativo de que su muerte ha sido consecuencia de la infección.

*P. aeruginosa* es una de las bacterias gram negativas más estudiadas en el modelo de infección *G. mellonella* (Tsai *et al.*, 2016; Koch *et al.*, 2014). Uno de los primeros estudios en los que se utilizó este microorganismo se realizó en 1975, en el cual se demostró que los mutantes deficientes en la expresión de LPS de 2 cepas de *P. aeruginosa*,

fueron 8-62 veces menos patógenas que las cepas salvajes (*wild type*) (Kropinski & Chadwick, 1975), sin embargo, los mutantes deficientes en el pili, flagelo o proteasas, no mostraron una variación de la virulencia (Jarrell & Kropinski, 1982). Desde entonces, este modelo se ha ido utilizando en diversos estudios a fin de analizar la virulencia de *P.aeruginosa* y los mecanismos de defensa inmune involucrados de *G. mellonella* (Tsai *et al.*, 2016). En este sentido, según Miyata y colaboradores, *P. aeruginosa* PA14 mostró una virulencia elevada con dosis letales entre 1 y 10 UFC; y además, concluyeron que las exotoxinas *exoT* y *exoU*, tienen un papel importante en la mortalidad de este modelo. De hecho, la translocación individual de cualquiera de estas toxinas fue suficiente para obtener niveles elevados de mortalidad. Cabe destacar que la virulencia de *P. aeruginosa* mostrada en dicho trabajo, se correlacionó de forma positiva con la virulencia mostrada en ratones (Miyata *et al.*, 2003). Asimismo, según Harrison (Harrison *et al.*, 2006), la infección de *G. mellonella* por *P. aeruginosa* productoras de sideróforos, provocaron una virulencia mayor que sus mutantes isogénicos. Incluso, en el trabajo realizado por Sonnleitner y su equipo (Sonnleitner *et al.*, 2003), en el que estudiaron el efecto del gen *hfq* sobre la virulencia y la respuesta al estrés de *P. aeruginosa* PAO1, observaron que la deficiencia de este gen produjo una disminución en la expresión de los factores de virulencia (catalasa y piocianina, y daños en los sistemas relacionados con el pili tipo IV como la motilidad *twitching* y *swarming*), ocasionando a una menor mortalidad en *G.mellonella*. Estos hallazgos y su correlación positiva con modelos murinos, sugiere que los mecanismos subyacentes de infección son similares en ambos huéspedes y que el uso de este insecto es un buen método para identificar factores de virulencia de *P. aeruginosa* en mamíferos (Jander *et al.*, 2000).

## **1.7 Interacción entre el perfil de resistencia y la virulencia**

Los procesos de virulencia y resistencia son completamente necesarios para que las bacterias puedan establecer infecciones de manera exitosa, y sobrevivir a las condiciones adversas a las que se exponen en el ambiente hospitalario. Los mecanismos de virulencia son importantes para debilitar al huésped y sus sistemas de defensa; mientras que el desarrollo de resistencias es esencial para superar las terapias antimicrobianas, y sobrevivir y adaptarse a entornos competitivos y exigentes (Beceiro *et al.*, 2013). De hecho, produce indirectamente daños al huésped ya que limita las posibilidades de que éste reciba una terapia empírica adecuada (Juan *et al.*, 2017). Estos hechos sugieren que la virulencia y la resistencia, son procesos relevantes que se



deberían de considerar de forma conjunta, ya que la interacción entre ellos podría: asociar la resistencia a ciertos determinantes de virulencia; producir un coste biológico a la bacteria que comprometiese su virulencia, o incluso, producir un efecto directo positivo sobre ésta. Por tanto, la expresión diferencial de estos factores podría producir una gran variabilidad en la gravedad de la infección y como consecuencia, en el desenlace de la misma (Martínez-Ramos *et al.*, 2014; Sawa *et al.*, 2014; Mulet *et al.*, 2013; Linares *et al.*, 2005).

A pesar de que no se ha establecido un patrón claro derivado de dicha interacción (Beceiro *et al.*, 2013), ciertos estudios han determinado que las cepas con perfil de resistencia MDR presentan una invasividad y mortalidad inferiores a las sensibles en modelos murinos. Además, estas últimas ocasionaron la muerte de forma más rápida que las MDR, sugiriendo que las cepas sensibles pueden comportarse de una manera más agresiva y que la resistencia a los antibióticos podría estar asociada a una disminución de la eficacia biológica (Gómez-Zorrilla *et al.*, 2016; Abdelraouf *et al.*, 2011; Giamarellos-Bourboulis *et al.*, 2004). Asimismo, Peña y su equipo (Peña *et al.*, 2015) comprobaron que la mortalidad temprana en pacientes infectados con cepas de *P. aeruginosa* MDR fue menos frecuente que la ocurrida con cepas sensibles. Concretamente, relacionando resistencia y virulencia con la mortalidad, concluyeron que las cepas con perfil ModR, las cuales presentaron de forma significativa la toxina *exoU* del SST3, se asociaron a un mayor riesgo de mortalidad temprana (5 días); mientras que la mortalidad tardía (30 días) se asoció al perfil de resistencia MDR en infecciones del torrente sanguíneo. Sin embargo, aunque los distintos estudios demuestren que las cepas resistentes se relacionan con una disminución de la patogenicidad, ésta puede diferir entre ellas. Un ejemplo lo demuestra el comportamiento del clon ST235 con presencia de la toxina ExoU, ya que además de ser causante de numerosos brotes en todo el mundo y estar asociado a peores pronósticos clínicos (Recio *et al.*, 2018; Peña *et al.*, 2015), fue el único capaz de causar mortalidad en un modelo murino (Gómez-Zorrilla *et al.*, 2016) en comparación con el resto de clones. Estos hechos sugieren que algunas cepas MDR pueden permanecer tan virulentas como las cepas sensibles (Gómez-Zorrilla *et al.*, 2016; Abdelraouf *et al.*, 2011).

Dado que los factores de virulencia podrían tener un impacto importante en el desenlace de las infecciones, y que los clones epidémicos de alto riesgo MDR/XDR ST111, ST175 y ST235 presentan una disminución en los tres tipos de motilidad bacteriana y en la producción del sideróforo pioverdina y la citotoxina piocianina (Mulet

*et al.*, 2013). Son determinantes que deberían abordarse específicamente en los distintos estudios a fin de poder establecer su importancia en el desenlace de las infecciones bacterianas. No obstante cabe destacar que la asociación entre la resistencia y la virulencia es compleja y que puede depender no solo de varios determinantes microbiológicos sino también de diferentes interacciones con el huésped (Gómez-Zorrilla *et al.*, 2016).



## **2.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



La habilidad de *P. aeruginosa* para desarrollar resistencias a casi todos los antibióticos disponibles, ha favorecido en las últimas décadas el aumento de las infecciones nosocomiales producidas por cepas MDR/XDR, siendo especialmente preocupantes las causadas por los denominados clones de alto riesgo ST111, ST175 y ST235. A esta característica se le añaden los múltiples factores de virulencia que presenta, como el sistema de secreción tipo III (SST3), la motilidad y la producción de pigmentos, los cuales contribuyen al desarrollo de las infecciones.

Estudios recientes han demostrado que la presencia de la toxina ExoU del SST3, se ha asociado a fenotipos altamente virulentos y a un mal pronóstico clínico. Además, se ha determinado que los clones de alto riesgo, ST111, ST175 y ST235, muestran un conjunto definido de marcadores biológicos que incluyen la disminución de la motilidad, producción de pigmentos y eficacia biológica; y posteriormente se descifró la interconexión entre el perfil de resistencia, los clones de alto riesgo y el SST3, teniendo un impacto importante en el desenlace clínico de los pacientes con infección del torrente sanguíneo por *P. aeruginosa*.

A pesar de que la interacción entre resistencia y virulencia fue evaluada posteriormente en un modelo murino, la utilidad de estos modelos para el análisis de grandes colecciones se encuentra limitada, debido a su elevado coste, carga de trabajo y las limitaciones éticas a las que están sujetos. Sin embargo, los modelos invertebrados *Caenorhabditis elegans* y *Galleria mellonella*, como anteriormente se ha comentado, presentan numerosas ventajas para llevar a cabo dichos estudios.

Por todo ello, en la primera parte del presente trabajo se estudió la virulencia de una variedad de aislados de *P. aeruginosa* procedentes de diversas fuentes (fibrosis quística, bacteriemia, epidémicas y ambientales), en ambos modelos invertebrados de infección con el fin de:

1. Analizar la relación entre la fuente de origen y su virulencia.
2. Descifrar si existe una asociación entre el perfil de resistencia, los clones de alto riesgo y el fenotipo de virulencia de *P. aeruginosa*, en modelos invertebrados.
3. Determinar el impacto del genotipo del SST3, la motilidad y la producción de pigmentos sobre la virulencia

El efecto que producen las mutaciones involucradas en el aumento de la resistencia sobre la virulencia es un tema de creciente interés. Trabajos anteriores han demostrado que AmpR además de ser un regulador transcripcional de la  $\beta$ -lactamasa *ampC*, está

relacionado con el QS, producción de alginato, biopelículas, y otros factores de virulencia. Recientemente se ha identificado en clones ST175 hiperproductores de AmpC, una mutación específica en AmpR (G154R). Teniendo en cuenta que esta mutación se ha detectado en gran parte de los ST175 de esta colección, y que además este clon presentó una virulencia particularmente reducida respecto a los clones ST111 y 235, el siguiente objetivo fue:

4. Analizar el efecto de AmpR sobre la virulencia en modelos invertebrados.
5. Determinar el impacto de AmpR (G154R) en la virulencia del clon ST175 en ambos modelos de infección.

Puesto que los clones ST175 mostraron diferencias en la virulencia en ambos modelos de infección, se compararon los genomas de algunos de estos clones de la colección a fin de:

6. Examinar las mutaciones que pudiesen estar involucradas en la ganancia o pérdida de virulencia.

Dado que en la primera parte de este trabajo, en el modelo de *C. elegans*, se demostró la existencia de una interconexión entre virulencia, SST3, perfiles de resistencia y los clones de alto riesgo. En la segunda parte, se amplió el estudio incorporando el total de la colección de bacteriemia, con el objetivo final de:

7. Determinar el valor predictivo de la letalidad como marcador pronóstico de la mortalidad en pacientes por bacteriemia por *P. aeruginosa*.



## **3.MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3.1 Cebadores utilizados en este trabajo.

Cebador	Secuencia 5'-3'	Tamaño fragmento (pb)	Referencia
ExoU-F	AGCGTTAGTGACGTGCG	1546	Feltman <i>et al.</i> , 2001
ExoU-R	GCGCATGGCATCGAGTAATG		
ExoS-F	TCAGGTACCCGGCATTCACTACGCGG	730	Feltman <i>et al.</i> , 2001
ExoS-R	TCACTGCAGGTTTCGTGACGTCTTTCTTTTA		
ExoT-F	TCACTGCAGTTCCGCGTGCTCCGACG	947	Feltman <i>et al.</i> , 2001
ExoT-R	TCAGGTACCTGCTGGTACTCGCCGTT		
ExoY-F	TCCAAGCTTATGCGTATCGACGGTCATC	1142	Feltman <i>et al.</i> , 2001
ExoY-R	CGTATCGATCCGAGGGGGGTGTATCTGACC		

Tabla 3.1. Cebadores usados en este trabajo

### 3.2 Cepas, colecciones bacterianas y variables usadas en el estudio.

Cepas	Características relevantes	Referencia
PAO1	Cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> usada de referencia completamente secuenciada. Usada también como control positivo de las toxinas <i>exoS</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i>	Stover <i>et al.</i> , 2000
PA14	Cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> usada de referencia completamente secuenciada. Usada como Control positivo de las toxinas <i>exoU</i> , <i>exoT</i> , <i>exoY</i>	He <i>et al.</i> , 2004
OP50	Cepa de <i>Escherichia coli</i> usada como fuente de alimento del modelo invertebrado <i>C. elegans</i> .	Brenner, 1974
PAΔR	PAO1 Δ <i>ampR</i> ::lox. Mutante de PAO1 con AmpR inactivado. AmpR es un regulador global de la transcripción involucrado en la expresión de la β-lactamasa cromosómica AmpC y de numerosos determinantes de virulencia	Cabot <i>et al.</i> , 2012
PAΔR(pUCPAR <sub>WT</sub> )	Mutante de PAO1 con AmpR inactivado, complementado con AmpR de tipo salvaje	Cabot <i>et al.</i> , 2012
PAΔR(pUCPAR <sub>G154R</sub> )	Mutante de PAO1 con AmpR inactivado, complementado con AmpR mutado G154R	Cabot <i>et al.</i> , 2012

Tabla 3.2. Cepas de laboratorio usadas en este trabajo.



### 3.2.1 Colección de aislados destinados al estudio.

El presente trabajo fue realizado con el uso de colecciones de microorganismos procedentes de distintas fuentes de aislamiento. Para llevar a cabo la *Parte I* se utilizaron un total de 140 aislados, de los cuales 80 formaron parte de la colección de bacteriemia (20 aislados por cada grupo de resistencia: S, ModR, MDR, XDR), 20 de la colección de fibrosis quística, 20 de la colección de cepas epidémicas y 20 fueron de origen ambiental. Para realizar la *Parte II* se utilizaron los 593 aislados de la colección de la cohorte nacional de bacteriemias. A continuación dichas colecciones se detallan más ampliamente:

Los aislados de bacteriemia, provienen de un estudio multicéntrico prospectivo desarrollado durante 2008-2009, en el cual participaron 10 hospitales nacionales localizados en diferentes comunidades autónomas: Andalucía, Baleares, Cantabria y Cataluña. La colección completa cuenta con un total de 632 aislados de pacientes mayores de edad, monitorizados durante 30 días tras presentar el primer hemocultivo positivo, excluyéndose las bacteriemias polimicrobianas (Peña *et al.*, 2012). Los aislados utilizados fueron caracterizados en estudios previos (Peña *et al.*, 2015; Peña *et al.*, 2013; Mulet *et al.*, 2013; Peña *et al.*, 2012; Cabot *et al.*, 2012).

Las cepas procedentes de pacientes con Fibrosis quística (FQ), fueron obtenidas de un estudio multicéntrico nacional previo realizado en el año 2013, en el que colaboraron 24 unidades de FQ de 17 hospitales de referencia de diversas comunidades autónomas: Baleares, Cataluña, Comunidad Valenciana, Murcia, Andalucía, Madrid, Asturias, País Vasco y Canarias (de Dios Caballero *et al.*, 2016). Las cepas utilizadas fueron caracterizadas en el estudio realizado por López-Causapé y colaboradores (López-Causapé *et al.*, 2017).

La colección de aislados epidémicos extremadamente resistentes (XDR), fueron obtenidos de diversos brotes nosocomiales acontecidos tanto en territorio nacional como europeo. Todos ellos pertenecen a los clones de alto riesgo más prevalentes (ST111, ST175 y ST235), los cuales albergan múltiples combinaciones de mecanismos de resistencia cromosómica y/o adquirida horizontalmente (VIM-1, VIM-2, VIM-13, VIM-20, GES-5 o VEB-1) (Mulet *et al.*, 2013). Su caracterización también fue realizada previamente en diversos estudios (Gilarranz *et al.*, 2013; Vatcheva-Dobrevska *et al.*, 2013; Mulet *et al.*, 2013; Viedma *et al.*, 2012; García-Castillo *et al.*, 2011; Juan & Oliver, 2010; Viedma *et al.*, 2009; Peña *et al.*, 2007).

Las cepas ambientales fueron aisladas de superficies diversas y proporcionadas por una empresa dedicada a la asesoría en higiene alimentaria (Saniconsult) entre los años 2010 y 2013.

### **3.2.2 Variables relevantes utilizadas en este trabajo.**

Las variables utilizadas en este trabajo obtenidas de la caracterización previa de las respectivas colecciones fueron:

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de aztreonam, ticarcilina, piperacilina/tazobactam, ceftazidima, cefepime, ceftolozano/tazobactam, meropenem, imipenem, ciprofloxacino, tobramicina, amikacina y colistina, se determinaron por microdilución en caldo Müller-Hinton (MH), determinadas mediante el uso de diferentes técnicas estandarizadas dependiendo del laboratorio de referencia; siguiendo las pautas y los puntos de corte establecidos por el “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015); y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*” (EUCAST, [www.eucast.org](http://www.eucast.org)), según correspondiese. El perfil de resistencia fue asignado de acuerdo a Magiorakos y colaboradores (Magiorakos *et al.*, 2012).

El secuenciotipo de los aislados definido en todas la colecciones mediante el análisis de secuencias de múltiples locus (*Multilocus Sequence Typing*, MLST) se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Curran y su equipo (Curran *et al.*, 2004).

La presencia o ausencia de las proteínas efectoras (*exoS*, *exoT*, *exoY* y *exoU*) del sistema de secreción tipo III (SST3) estudiadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) siguiendo las pautas descritas por Feltman y colaboradores (Feltman *et al.*, 2001), también fueron utilizadas en este trabajo.

Los distintos tipos de motilidad (*swimming*, *swarming* y *twitching*) analizados se determinaron siguiendo los protocolos descritos previamente (Caiazza *et al.*, 2005; Rashid & Kornberg, 2000).

La producción de pigmentos se analizó siguiendo el protocolo descrito según Sánchez (Sánchez *et al.*, 2002).

Los genomas secuenciados de los clones ST175 utilizados para relacionar la virulencia con los cambios genéticos producidos, fueron obtenidos del trabajo previo realizado por Cabot y colaboradores (Cabot *et al.*, 2016).

Los mutantes empleados para analizar del impacto de la mutación en AmpR G154R en la virulencia de *P. aeruginosa*, fueron obtenidos de trabajos previos (Cabot *et al.*, 2012).

Además, para completar el estudio con la colección de bacteriemia, se utilizaron las variables clínicas y demográficas (sexo y edad) recogidas en el estudio previo de Peña y colaboradores (Peña *et al.*, 2012). Entre las variables clínicas empleadas destacan, la comorbilidad y la gravedad de las enfermedades de base, calculadas utilizando el índice de comorbilidad de Charlson (Charlson *et al.*, 1987); gravedad de la enfermedad en pacientes de UCI estimada según SAPS II (*Simplified Acute Physiology Score*) (Le Gall *et al.*, 1984); presencia de neutropenia (<500 granulocitos/ml), y uso de terapia inmunosupresora (quimioterapia, radioterapia y/o fármacos inmunosupresores durante la presentación de bacteriemia). Además se utilizaron, las fuentes de bacteriemia consideradas de alto riesgo (tracto respiratorio, intraabdominal, tejidos blandos u origen desconocido) (Kang *et al.*, 2005; Garner *et al.*, 1988); la gravedad de la enfermedad aguda según el índice de Pitt (Chow *et al.*, 1991); presencia de shock séptico y síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) (Bone *et al.*, 1992) y, el tratamiento antibiótico recibido (Peña *et al.*, 2012). La mortalidad de los pacientes utilizada fue la descrita por Peña y colaboradores (Peña *et al.*, 2015), donde mortalidad temprana fue definida como fallecimiento del paciente durante los 5 primeros días, y mortalidad tardía como muerte en los 30 días posteriores al inicio de la bacteriemia por *P. aeruginosa*.

### **3.3 Estudio de los factores involucrados en la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*.**

#### **3.3.1 Detección de las toxinas efectoras del Sistema de Secreción Tipo III.**

Como se ha descrito anteriormente, el SST3 es un determinante importante de virulencia de *P. aeruginosa* a través del cual el microorganismo inyecta potentes citotoxinas (*exoS*, *exoY*, *exoT* y *exoU*) en el interior de la célula eucariota. En aquellos casos en los que no se hubiese determinado previamente (cepas ambientales, epidémicas y FQ), se analizó la presencia de dichas exotoxinas, con el fin de determinar su asociación con la virulencia de *P. aeruginosa*.

Brevemente, se procedió a la extracción de ADN de las cepas mediante el kit *DNeasy tissue kit*; (Qiagen, Hilden, Alemania), a continuación se llevó a cabo su

amplificación por PCR en un termociclador (Bio-rad PTC-100, *Petier Thermal Cycler*) siguiendo las condiciones descritas por Feltman y colaboradores (Feltman *et al.*, 2001) con algunas modificaciones como: una desnaturalización inicial a 94°C durante 12 min, seguido de 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, y finalmente el paso de extensión de 10 minutos a 72°C. Los cebadores usados se incluyen en la Tabla 3.1 y los reactivos utilizados se detallan en el Anexo I. Finalmente, se cargaron 10 µl de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1% p/v a fin de detectarlas. En todos los ensayos incluimos las cepas PAO1 y PA14, como controles positivos de *exoS* y *exoU* respectivamente, y ambas para las exoproteínas *exoT* y *exoY*.

### **3.3.2 Ensayos de motilidad.**

La motilidad bacteriana contribuye a la virulencia de *P. aeruginosa* ya que juega un papel importante en la invasión de fluidos y superficies, por tanto, también en la colonización del huésped (Feinbaum *et al.*, 2012; Jarrell & McBride, 2008). Los 3 tipos principales de motilidad descritos son el *swimming*, el *swarming* y el *twitching*. La motilidad tipo *swimming* es aquella que se produce en ambientes acuosos a través del flagelo (Rashid & Kornberg, 2000), la motilidad tipo *swarming* tiene lugar en superficies semisólidas mediante el uso del flagelo y el pili tipo IV (Feinbaum *et al.*, 2012; Rashid & Kornberg, 2000) y, por último, la motilidad tipo *twitching* producida por la extensión, anclaje y retracción de los pili polares tipo IV, acontece en superficies sólidas (Mattick, 2002).

Con el fin de conocer la motilidad de los aislados procedentes de FQ y ambientales, se siguieron los protocolos previamente descritos para los tres tipos de motilidad (Mulet *et al.*, 2013; Caiazza *et al.*, 2005; Rashid & Kornberg, 2000). Los medios utilizados se encuentran descritos en el Anexo I.

La determinación de la motilidad tipo *swimming* se realizó siguiendo el protocolo descrito por Rashid y Kornberg (Rashid & Kornberg, 2000). Brevemente, se basa en la inoculación de varias colonias aisladas, mediante el uso de instrumental fino y estéril, atravesando el medio sin tocar el fondo de la placa. La motilidad tipo *swarming* fue determinada sembrando 2.5 µl de un cultivo crecido previamente en el centro de la placa (Caiazza *et al.*, 2005). La motilidad tipo *twitching* se realizó mediante la inoculación de varias colonias con instrumental fino y estéril atravesando el medio hasta tocar el fondo de la placa y rotarlo 360° (Rashid & Kornberg, 2000). Finalmente se involucraron las

placas en *Parafilm* (Bemis Company; Neenah, Wisconsin, EE.UU) para evitar la deshidratación del medio, y se incubaron durante 16-20 horas a 37°C. Todos estos experimentos fueron realizados por triplicado. Transcurrido el tiempo indicado se midió el diámetro producido por la zona de motilidad, en el caso las motilidades tipo *swimming* y *swarming* fue medido directamente sobre el medio, sin embargo para la motilidad tipo *twitching*, se retiró previamente el agar y se midió la interfaz placa-agar (Mulet *et al.*, 2013). Si la zona de motilidad presentó una forma irregular, se tomaron las medidas de 2 diámetros perpendiculares siendo el resultado la media de dichos valores (Mulet *et al.*, 2013). A partir del diámetro medido en cada uno de los ensayos realizados, se calcularon las medias y la desviación estándar de los valores.

### **3.3.3 Producción de los pigmentos piocianina y pioverdina.**

La toxina de tipo fenazina piocianina y el sideróforo pioverdina, son determinantes de virulencia establecidos que contribuyen a la patogenia de infecciones provocadas por *P. aeruginosa*. Con la finalidad de cuantificar la producción de estos pigmentos en los aislados ambientales y los procedentes de FQ, se siguió el protocolo descrito por Sánchez y colaboradores (Sánchez *et al.*, 2002). Inicialmente, se incubaron los aislados en medio líquido *Pseudomonas* AAC (Anexo I) durante 40 horas a 37°C. A continuación, se centrifugaron los inóculos a 4°C y posteriormente se procedió a la lectura de los pigmentos. La piocianina se cuantificó midiendo la absorbancia a 690 nm, mientras que la pioverdina se midió a través de la emisión de fluorescencia, excitando los sobrenadantes a 400 nm y midiendo su emisión a 460 nm. A partir de los valores obtenidos en los experimentos, realizados por triplicado, se obtuvo la media y la desviación estándar.

## **3.4 Modelos invertebrados de infección usados para los estudios de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*.**

### **3.4.1 Letalidad de *Pseudomonas aeruginosa* en el modelo invertebrado *Caenorhabditis elegans*.**

Para determinar la virulencia bacteriana en el modelo invertebrado *Caenorhabditis elegans* se han descrito diferentes protocolos: *Fast Killing*, *Slow Killing* y *Liquid Killing* (Kirienko *et al.*, 2013; Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 1999). En el presente trabajo estudiamos la virulencia de *P. aeruginosa* utilizando la técnica *Slow killing*

ligeramente modificada de Navas y colaboradores (Navas *et al.*, 2007), que consiste en la acumulación del microorganismo vivo en el lumen intestinal del nemátodo, desarrollando los síntomas propios de una infección, provocándoles la muerte en el transcurso de varios días (Kirienko *et al.*, 2014).

Con ese fin, se sembraron de forma uniforme cada uno de los aislados de *P.aeruginosa* objeto de estudio por triplicado en medio *Potato Dextrose Agar* (PDA, Anexo I), y se incubaron a 37°C durante 18-20 horas para obtener crecimiento en césped (Navas *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 1999). A continuación, se extrajeron los nematodos reproducidos en el laboratorio sobre PDA a 22°C (temperatura a la cual se favorece el desarrollo de hermafroditas). Para ello, fueron filtrados dos veces (90 µm y 22 µm), a fin de ser recolectados en medio líquido para facilitar su posterior inoculación.

Posteriormente, con la ayuda de una lupa (ZUZI binocular spectromicroscope mod.235) se depositaron 5 nemátodos adultos (diferenciados del resto por tener un tamaño superior y por la presencia de gónadas) sobre el césped de cada una de las placas de *P. aeruginosa*. Una vez realizado el experimento por triplicado, las placas se incubaron a 22°C toda una semana, con recuentos de nemátodos vivos cada 24 horas utilizando la lupa binocular a 20 y 40 aumentos. Aunque se procedía a los recuentos de nemátodos viables cada 24 horas, los cambios más significativos fueron observados a las 24, 72 y 168 horas. En cuanto al recuento, se consideraban nemátodos muertos aquellos que no realizaban ningún tipo de movimiento (Navas *et al.*, 2007). En todos los ensayos realizados se incluyeron las cepas *Escherichia coli* OP50 y *P. aeruginosa* PAO1 como controles negativo y positivo de letalidad del nemátodo, respectivamente. A partir de los datos obtenidos de cada experimento, por triplicado, se calcularon las medias y la desviación estándar.

Para poder establecer un análisis comparativo de la letalidad de los distintos aislados de *P. aeruginosa* estudiados en el modelo de *C. elegans*, se desarrolló un sistema de puntuación/calificación del grado de virulencia al que se denominó CEVS, por sus siglas en inglés de “*Caenorhabditis elegans Virulence Score*”. En base a esta puntuación, se definieron 5 rangos de virulencia: CEVS-1 al CEVS-5. Así pues, los CEVS 1 y 2 son considerados no virulentos ya que permiten la reproducción del nematodo a lo largo de la semana; los aislados pertenecientes al CEVS 3 no produjeron, ni la muerte ni la reproducción de los nematodos, por lo que a la semana su recuento se mantenía entre 1 y 5 nemátodos; finalmente, los CEVS 4 y 5 se consideraron virulentos ya que produjeron la mortalidad del 100% de los nematodos en los recuentos realizados a las 168 y 72 horas, respectivamente.

CEVS	Descripción	
1	>50 nematodos vivos a 168h	<b>Aislados no virulentos</b> (Permiten la reproducción de los nematodos)
2	>5-≥50 nematodos vivos a 168h	
3	1-5 nematodos vivos a 168h	<b>Aislados virulencia intermedia</b> (Permiten la supervivencia de los nematodos sin reproducción)
4	≤ 1 nematodos vivos a 168h	<b>Aislados virulentos</b> (Matan a los nematodos)
5	0 nematodos vivos a 72h	

**Tabla 3.3** Score de virulencia de *Caenorhabditis elegans* (CEVS)

Cabe destacar que así como en la primera parte (*Parte I*) de este trabajo el CEVS 3 se incluyó dentro de la categoría “aislados virulentos” (tabla 3.3); en la segunda parte (*Parte II*) del estudio se clasificó como categoría “intermedia” excluyéndolo de los análisis estadísticos. Esta exclusión se realizó con la finalidad de establecer una límite más claro entre las categorías “virulento y no virulento” y así obtener un mayor impacto en el análisis, ya que este CEVS incluye características de ambas categorías (no produce la muerte total de *C. elegans*, pero tampoco fomenta su reproducción). La razón por la que se mantuvo en la primera parte se debe a que el número total de cepas era de 140, de las cuales 17 pertenecieron al CEVS 3 (12%), y dada la ausencia de reproducción de *C. elegans* se consideró dentro del grupo virulento.

#### 3.4.1.1 Factores relacionados con la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* en el modelo *Caenorhabditis elegans*.

Con el propósito de determinar si existe asociación entre perfil de resistencia, clones de alto riesgo, origen de la cepa, presencia o ausencia de *exoS/U*, motilidad y producción de pigmentos *versus* la virulencia de *P. aeruginosa* en *C. elegans*, se realizó un análisis univariante utilizando las pruebas *t* de Student o *U* de Mann-Whitney para las variables cuantitativas; y Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) o test exacto de Fisher para las variables cualitativas. Posteriormente, se realizó un análisis de regresión logística simple a fin de conocer el grado de asociación de cada variable con la virulencia. En todos los casos, se consideró estadísticamente significativo un *p*-valor ≤ 0.05. Posteriormente, se realizó un análisis multivariante por regresión logística por pasos sucesivos hacia atrás (*backward stepwise*) a fin de identificar los factores asociados (positiva o negativamente) de forma independiente con la virulencia.

Para completar el estudio, se realizó un análisis factorial y de correspondencia adicional, basado en la relación de las distintas variables (SST3, motilidad, pigmentos,



perfil de resistencia y clonalidad) con la virulencia de *P. aeruginosa*, para estudiar y corroborar la estructura general de los distintos factores. Para ello, se normalizaron previamente los datos a través de Varimax y las variables principales se utilizaron como método de extracción, agrupándolas en 3 factores (factor 1-3) y ver la relación entre estos.

En la segunda parte del estudio, realizada con la colección de 593 cepas procedentes de bacteriemias, el CEVS 3 fue excluido del análisis, de modo que se usaron los CEVS 1 y 2 como “aislados no virulentos” y los CEVS 4 y 5 como “aislados virulentos”. En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo con el propósito de analizar las diferencias entre los grupos de virulencia de *P. aeruginosa* en *C. elegans* (CEVS1-2, CEVS4-5) y las variables (clínicas, demográficas, perfil de resistencia, SST3). Para ello, se utilizaron medias y desviaciones estándar, números y porcentajes o medianas y rangos intercuartílicos. Se consideró estadísticamente significativo un  $p$ -valor  $\leq 0.05$ . A continuación, para determinar la asociación de la virulencia de *P. aeruginosa* en *C. elegans* (CEVS) y la mortalidad en pacientes *versus* las variables conocidas, se realizaron las pruebas  $t$  de Student o  $U$  de Mann-Whitney para las variables cuantitativas; y Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) o test exacto de Fisher para las variables cualitativas. En todos los casos, se consideró estadísticamente significativo un  $p$ -valor  $\leq 0.05$ .

Con la finalidad de identificar qué características clínicas y microbiológicas (perfil de resistencia y SST3) conocidas podían estar relacionadas a la virulencia, así como su grado de asociación, se realizó un análisis mediante regresión logística simple en el que se incluyeron aquellas variables que tuvieron un  $p$ -valor  $< 0.1$  en el análisis univariante previo. Posteriormente, para identificar los factores asociados de forma independiente con la virulencia, se realizó un análisis multivariado ajustado por la edad, sexo, perfil de resistencia, enfermedades de base y origen de la bacteriemia.

Asimismo, con el propósito de analizar la asociación del perfil de resistencia y la presencia o ausencia de los genes *exoS/U* entre los distintos CEVS se realizó un análisis logístico simple.

Se construyeron curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) utilizando la prueba de log-rank para analizar las curvas obtenidas, con el propósito de estimar el riesgo de la mortalidad en pacientes según el fenotipo de virulencia de *P. aeruginosa* en *C. elegans*. En la curva se consideró a tiempo 0, fecha de aislamiento inicial, y los casos censurados del



análisis fueron en su gran mayoría, consecuencia de la muerte del individuo y a la pérdida de datos debido al traslado de estos a otro hospital.

El programa utilizado para efectuar el análisis estadístico fue el software IBM SPSS Statistics v22 (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.), y para el análisis factorial se utilizó el software Statistica (sistema de software de análisis de datos Statistica, versión 6; Tibco Software, Inc.). Asimismo, se usaron los programas GraphPad Prism 5 (GraphPad; La Jolla, California, EE.UU.) y R v3.6.3 (R Core Team, 2020) con la librería ggplot2 (Wickham, 2016), para representar las gráficas correspondientes.

### **3.4.2 Ensayos de mortalidad en el modelo *Galleria mellonella*.**

El estudio de la virulencia bacteriana en el modelo de *Galleria mellonella* se llevó a cabo mediante la infección intrahemocélica. Este tipo de ensayos permiten inocular concentraciones conocidas del patógeno de estudio, a fin obtener distintos grados de mortalidad, para posteriormente realizar el cálculo de la dosis letal del 50% ( $DL_{50}$ ), definida como dosis necesaria para que muera la mitad de la población (Rang & Hill, 2012). A fin de llevar a cabo la infección se siguió el protocolo descrito previamente por Pérez-Gallego y colaboradores (Pérez-Gallego *et al.*, 2016). Brevemente, se incubaron distintas cepas de *P. aeruginosa*, obtenidas de cultivos previamente crecidos *overnight* hasta alcanzar la fase exponencial. A continuación, dichos cultivos fueron centrifugados (3000 rpm durante 15 minutos) y los *pellet* obtenidos, lavados y resuspendidos en PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (Anexo I) por duplicado. Se prepararon diluciones seriadas en PBS y posteriormente plaqueadas en LB agar para su comprobación. Por cada dilución y cepa se usaron 10 larvas del último estadio, a las que se les inyectó en el último propodio izquierdo 10  $\mu$ l de las respectivas diluciones con una jeringa *Hamilton*. En cada experimento se inyectaron 10  $\mu$ l de PBS a 10 larvas como control negativo de infección y se utilizaron 10 larvas sin manipular como control interno del estado de las mismas. Inicialmente se determinó una  $DL_{50}$  aproximada en un cribado de intervalos amplios de cargas bacterianas y tras ello, se realizaron ensayos independientes a fin de obtener las cargas bacterianas ajustadas. El recuento de las larvas se realizó tras incubación de 24 horas a 37°C, en este punto se consideraron muertas aquellas larvas que no se movían frente a los estímulos externos, las cuales se tornan negras debido a la infección. La  $DL_{50}$  y la desviación estándar se calcularon mediante un *Análisis Probit* (Finney, 1947) con el *software R-3.2.2* (software libre) (R core Team, 2017).

### **3.4.2.1 Factores asociados con la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* en el modelo *Galleria mellonella*.**

Con el objetivo de determinar la asociación entre la virulencia de *P. aeruginosa* en *G. mellonella* (DL<sub>50</sub>) y las variables usadas a lo largo de este trabajo (perfil de resistencia, clones de alto riesgo, origen de las cepas, presencia o ausencia de *exoS/U*, motilidad y pigmentos), se utilizó la prueba estadística *U* de Mann-Whitney y Rho Spearman, según correspondiese. En todos los casos se consideró estadísticamente significativo un *p*-valor  $\leq 0.05$ . Para analizar el efecto de cada una de las variables sobre la virulencia, se realizó una regresión lineal simple. Finalmente, se realizó una regresión lineal múltiple mediante el método *Backward* con el propósito de analizar el efecto ajustado de las variables sobre la virulencia y así determinar cuáles tienen mayor efecto. En todos los casos se consideró estadísticamente significativo un *p*-valor  $\leq 0.05$

El programa utilizado para efectuar el análisis estadístico y la representación gráfica fue el software IBM SPSS Statistics v22 (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Asimismo, se utilizó el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad; La Jolla, California, EE.UU.), para representar las gráficas correspondientes.

### **3.5. Análisis de los cambios genéticos en el clon ST175 asociados con la virulencia en ambos modelos.**

Las mutaciones producidas en los genes (n=385) de los distintos clones ST175 secuenciados previamente (Cabot *et al.*, 2016), se utilizaron para analizar si la virulencia dependía de uno o varios de los cambios ocasionados, o al número al número total de ellos producido en cada aislado.

Con el fin de analizar la asociación entre la virulencia (CEVS) y el número de cambios genómicos presentes en los clones ST175 en el modelo de *C. elegans*, se llevó a cabo la prueba estadística *U* de Mann-Whitney. Asimismo, se realizó la prueba de exacta de Fisher con el objetivo de determinar los cambios genéticos que podían estar relacionados con la virulencia. En ambos casos se consideró estadísticamente significativo los *p*-valor  $\leq 0.05$ .

Asimismo, en el modelo de *G. mellonella*, se efectuó el coeficiente de correlación de Pearson con el objetivo de estudiar la asociación entre el número de cambios de los

clones ST175 y la virulencia ( $DL_{50}$ ). Posteriormente, para determinar los cambios que podrían estar asociados a la virulencia se llevó a cabo la prueba estadística  $U$  de Mann-Whitney. En ambos casos se consideró estadísticamente significativo los  $p$ -valor  $\leq 0.05$ .





## **4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



# CAPITULO I

*Virulencia de Pseudomonas  
aeruginosa en el modelo de  
Caenorhabditis elegans*

---

***Parte I. Relación entre la  
virulencia de *Pseudomonas  
aeruginosa*, la resistencia y  
factores de virulencia***

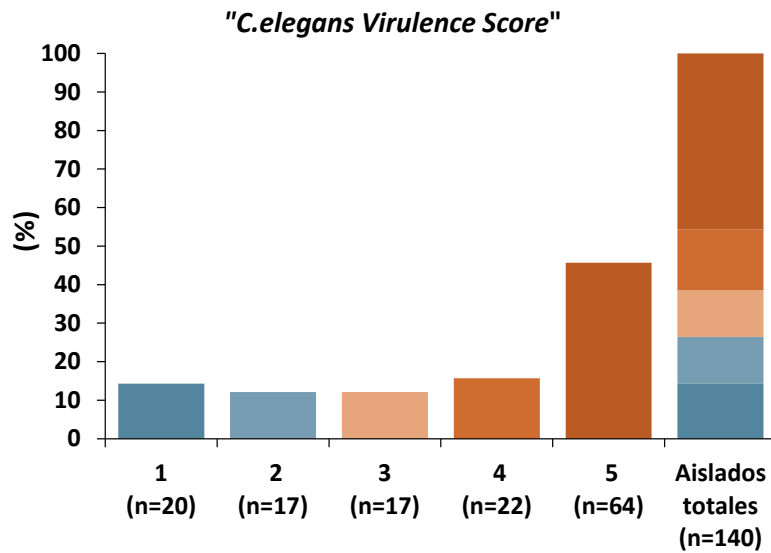
---





#### 4.1 Distribución de los aislados según su fenotipo de virulencia en *Caenorhabditis elegans*.

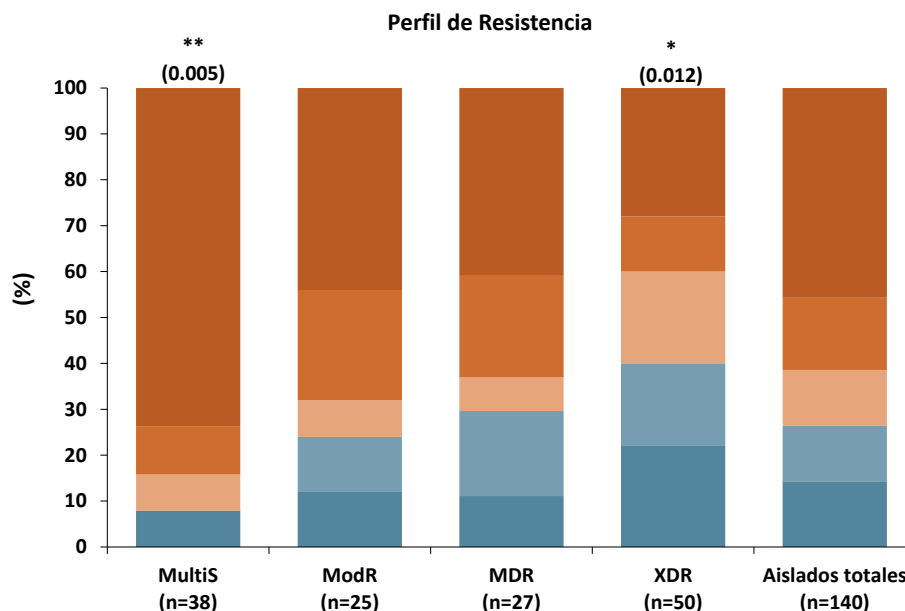
Para establecer un análisis comparativo de la letalidad de los aislados estudiados, se estableció unos grados o niveles de virulencia (CEVS), como se ha explicado en apartados anteriores. En la figura 4.1 se muestra la distribución de los diferentes aislados estudiados en función de su grado de virulencia, representado por los colores naranja y azul, respectivamente. El gradiente de ambas tonalidades explica los diferentes grados de virulencia. Como se puede observar, aproximadamente un 74% (103/140) de los aislados fueron virulentos (CEVS 3,4 y 5), mientras que un 26% (37/140) pertenecieron a no virulentos (CEVS 1 y 2).



**Figura 4.1.** Distribución de los 140 aislados entre los distintos *Caenorhabditis elegans virulence score* (CEVS). Se indica el número absoluto de cepas (n).

## 4.2 Virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* en función del perfil de resistencia y la procedencia de los aislados

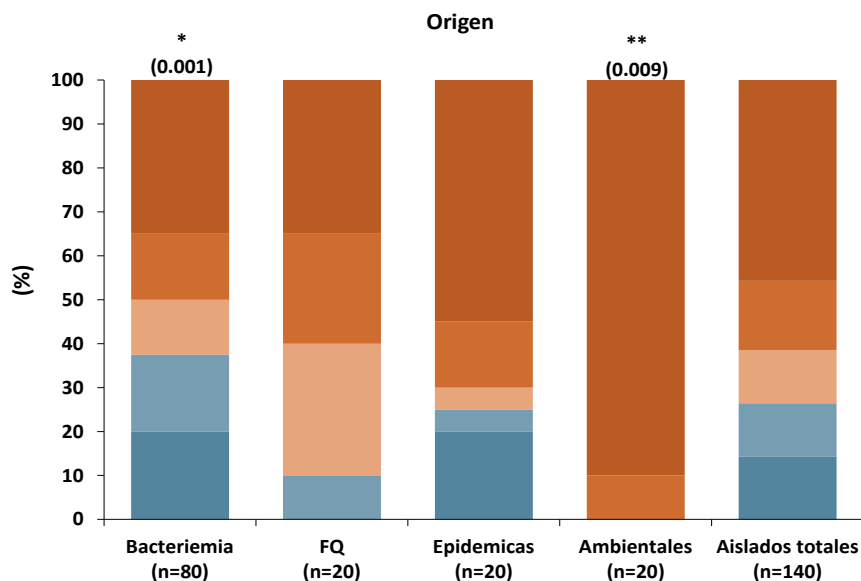
Comprender la interacción entre la resistencia a los antibióticos y la virulencia es un punto importante a considerar para poder mejorar el análisis del desenlace de las infecciones por *P. aeruginosa* (Juan *et al.*, 2017; Peña *et al.*, 2015). Las mutaciones que aumentan la resistencia a los antibióticos tienen diversos efectos sobre la eficacia biológica y el potencial patogénico de la bacteria durante la infección. Del mismo modo que existen estudios que describen que el aumento de la resistencia va asociado a una disminución de la eficacia biológica y la virulencia (Gómez-Zorrilla *et al.*, 2016; Mulet *et al.*, 2013; Abdelraouf *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2002), hay otros que indican todo lo contrario (Skurnik *et al.*, 2013), demostrando que existen cepas clínicas MDR que mantienen su virulencia intacta (Kaszab *et al.*, 2019) probablemente debido a las denominadas mutaciones compensatorias (Perron *et al.*, 2010). Con el fin de conocer si efectivamente la adquisición de resistencias está asociada con un coste biológico y una posible reducción en la virulencia, se estudió el impacto de los diferentes perfiles de resistencia en la virulencia en el modelo de *C. elegans*.



**Figura 4.2.** Impacto del perfil de resistencia (MultiS, ModR, MDR, XDR) en la virulencia en *C. elegans* (CEVS). Se realizaron la prueba Chi-cuadrado o exacta de Fisher para analizar las diferencias entre los diferentes grupos.\*Virulencia significativamente menor ( $p$ -valor $<0.05$ ), \*\* virulencia significativamente mayor ( $p$ -valor $<0.05$ ). Aislados virulentos (CEVS 3 a 5) y no virulentos (CEVS 1-2).

En la Figura 4.2, se puede apreciar claramente un incremento en la proporción de aislados no virulentos de acuerdo al perfil de resistencia: un 8% de los aislados no virulentos son sensibles a prácticamente todos los antibióticos testados (MultiS), el 24% son resistentes a una o varias clases de antibióticos usados (ModR), el 29.6% son resistentes a más de tres clases de antibióticos (MDR), y un 40% de aislados fueron resistentes a prácticamente todos (XDR).

Los datos obtenidos sostienen la evidencia aportada por otros trabajos que indican que la adquisición de la resistencia está asociada con un mayor coste biológico y una reducción en la virulencia (Hwang & Yoon, 2019; Gómez-Zorrilla *et al.*, 2016; Abdelraouf *et al.*, 2011). En estos trabajos, demostraron en modelos murinos, que aquellos ratones infectados con cepas resistentes tuvieron una mayor supervivencia que los infectados con cepas sensibles. Esta misma asociación fue determinada en *C. elegans* con patógenos humanos como *P. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (Gomis-Font *et al.*, 2020; Cabot *et al.*, 2016; Beceiro *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2002), teniendo un mayor impacto en aquellos aislados que presentaron el reciclaje del PG deteriorado (Cabot *et al.*, 2018).



**Figura 4.3.** Impacto de la de procedencia del aislado en la virulencia en *C.elegans* (CEVS). Se realizaron las pruebas Chi-cuadrado o exacta de Fisher para analizar las diferencias entre los diferentes grupos \*Virulencia significativamente menor ( $p$ -valor<0.05),\*\*virulencia significativamente mayor ( $p$ -valor<0.05). Aislados virulentos (CEVS 3 a 5) y no virulentos (CEVS 1 y 2).

En cuanto a la procedencia de los aislados reflejada en la figura 4.3, se puede observar que la mayor proporción de aislados virulentos se observaron en los aislados de

procedencia ambiental, en los que el 90% fueron MultiS y el 10% restante fueron ModR, sin presentar en ningún caso MDR/XDR. A estos le siguieron el 90% de los aislados procedentes de FQ; el 75% de los aislados epidémicos, y finalmente, los procedentes de bacteriemias con un 62.5% de cepas virulentas.

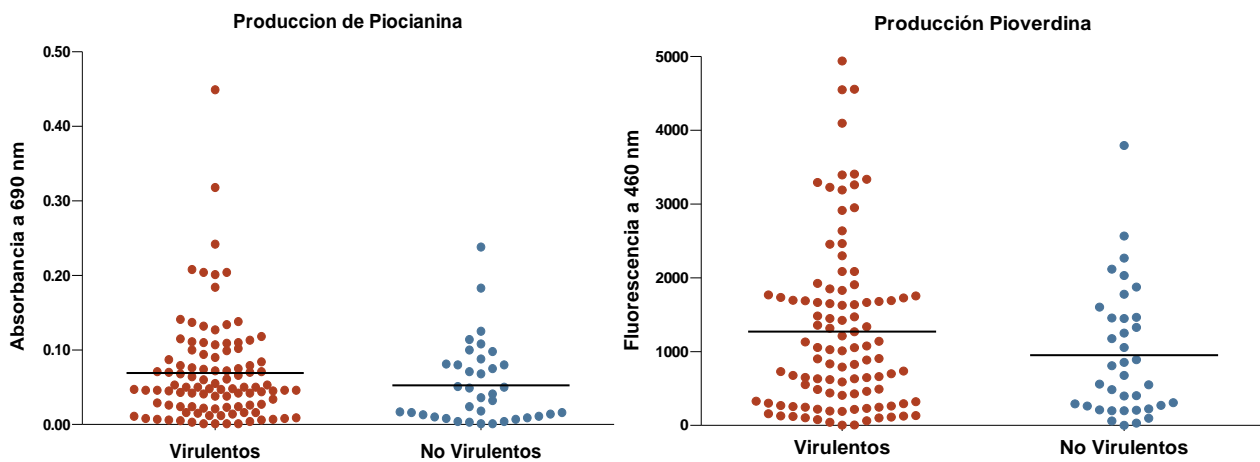
Resulta curioso resaltar que en los aislados procedentes de bacteriemia, la virulencia fue más baja que en los aislados de FQ, esto *a priori*, podría ser debido a la elevada proporción de cepas MDR/XDR en aislados de bacteriemia (50%), pero al determinar la proporción de cepas MDR/XDR en aislados de FQ, vemos que es del 85%. Esta disminución de la proporción de la virulencia en los aislados de bacteriemia y también aislados epidémicos respecto a los ambientales, podría deberse a la selección previa en ambos grupos de cepas MDR y XDR; las cuales están relacionadas con un incremento de aislados no virulentos. No obstante, aunque los aislados procedentes de FQ estén asociados con una disminución de los factores de virulencia debido a su adaptación a las infecciones crónicas (Balasubramanian *et al.*, 2015; Jansen *et al.*, 2015; Marvig *et al.*, 2015; Nguyen & Singh, 2006), en este trabajo y usando nuestro modelo presentaron una virulencia acusada.

Una de las razones que podría explicar estos resultados, es la elevada presencia del clon de alto riesgo ST175, el cual como veremos más adelante muestra una virulencia reducida en el modelo, y representa el 42.5% del 50% de cepas MDR/XDR de la colección de bacteriemia. Sin embargo, la diversidad clonal de los aislados procedentes de FQ fue mucho mayor y ninguno de ellos perteneció a clones de alto riesgo. Otro motivo por el cual las cepas de FQ son virulentas en este modelo, podría deberse al tipo de infección utilizado; ya que para infectar a *C. elegans*, se empleó el método *slow-killing* (Tan *et al.*, 1999), basado en la inoculación de los nematodos sobre un césped de *P.aeruginosa* previamente crecido y del cual se alimentan durante un semana. Es posible que al haber crecido el microorganismo previamente al ensayo de infección, *P. aeruginosa* haya sintetizado diversos factores de virulencia, provocando rápidamente la muerte en el modelo. En este sentido, Siryapon y colaboradores (Siryaporn *et al.*, 2014), observaron que la adhesión a superficies rígidas junto con la detección de QS, inducían la virulencia de *P. aeruginosa* tanto en mamíferos como en eucariotas unicelulares. Hecho que podría haber favorecido la virulencia de las cepas en esta colección.

### 4.3 Efecto de los determinantes de virulencia: SST3, motilidad y producción de pigmentos, en la letalidad de *Pseudomonas aeruginosa*.

Uno de los factores más relevantes en la virulencia de este patógeno es el SST3, cuya finalidad es inyectar potentes citotoxinas en el citosol de las células eucariotas (Hauser, 2009). Aunque también cuenta con otros determinantes de virulencia como la producción de pigmentos (piocianina y pioverdina) y la motilidad (*swimming*, *swarming*, *twitching*). Es conocido que el amplio repertorio de sistemas de motilidad bacteriana, juegan un importante papel en invasión de tejidos (Feinbaum *et al.*, 2012; Jarrell & McBride, 2008). Del mismo modo, se conoce que los pigmentos, poseen un papel relevante en la fisiología bacteriana y la patogénesis (Visca *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 2004). Como se ha comentado anteriormente, se ha descrito que los clones de alto riesgo están asociados a un conjunto de parámetros biológicos en los que se incluyen una reducida motilidad y producción de pigmentos.

Con el fin de evaluar la importancia de estos determinantes en la virulencia de *P.aeruginosa* en el modelo de *C. elegans*, analizamos la correlación entre ellos.



**Figura 4.4.** Análisis comparativo de los 140 aislados de *P. aeruginosa*, entre la producción de pigmentos (piocianina y pioverdina) y los fenotipos de virulencia establecidos en *C. elegans*, virulentos (CEVS 3 a 5) y no virulentos (CEVS 1 y 2). Se realizó la prueba U de Mann-Whitney para analizar las diferencias entre los diferentes grupos. Se consideró significativo \**p*-valor<0.05.

Tal y como se muestra en la figura 4.4, no se observaron diferencias significativas entre la virulencia de *P. aeruginosa* y la producción de piocianina y pioverdina. Por tanto, indicaría que ninguno de estos factores sería esencial para la virulencia en el modelo de *C. elegans*, a diferencia de lo que cabría esperar según estudios previos que demuestran

que ambos pigmentos se relacionan con un aumento de la virulencia en diversos modelos de infección (Hashimoto *et al.*, 2021; Rashid *et al.*, 2020; Kang *et al.*, 2019; Lopez-Medina *et al.*, 2015; Lau *et al.*, 2004; Mahajan-Miklos *et al.*, 1999). De hecho, los mutantes defectuosos en la producción de los mismos, y la exposición a compuestos que reducen o inhiben su expresión, conllevan a un aumento en la supervivencia de los huéspedes infectados (Hashimoto *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2020; Froes *et al.*, 2020; Kirienko *et al.*, 2019; Kang *et al.*, 2018; Minandri *et al.*, 2016; Prithiviraj *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 1996).

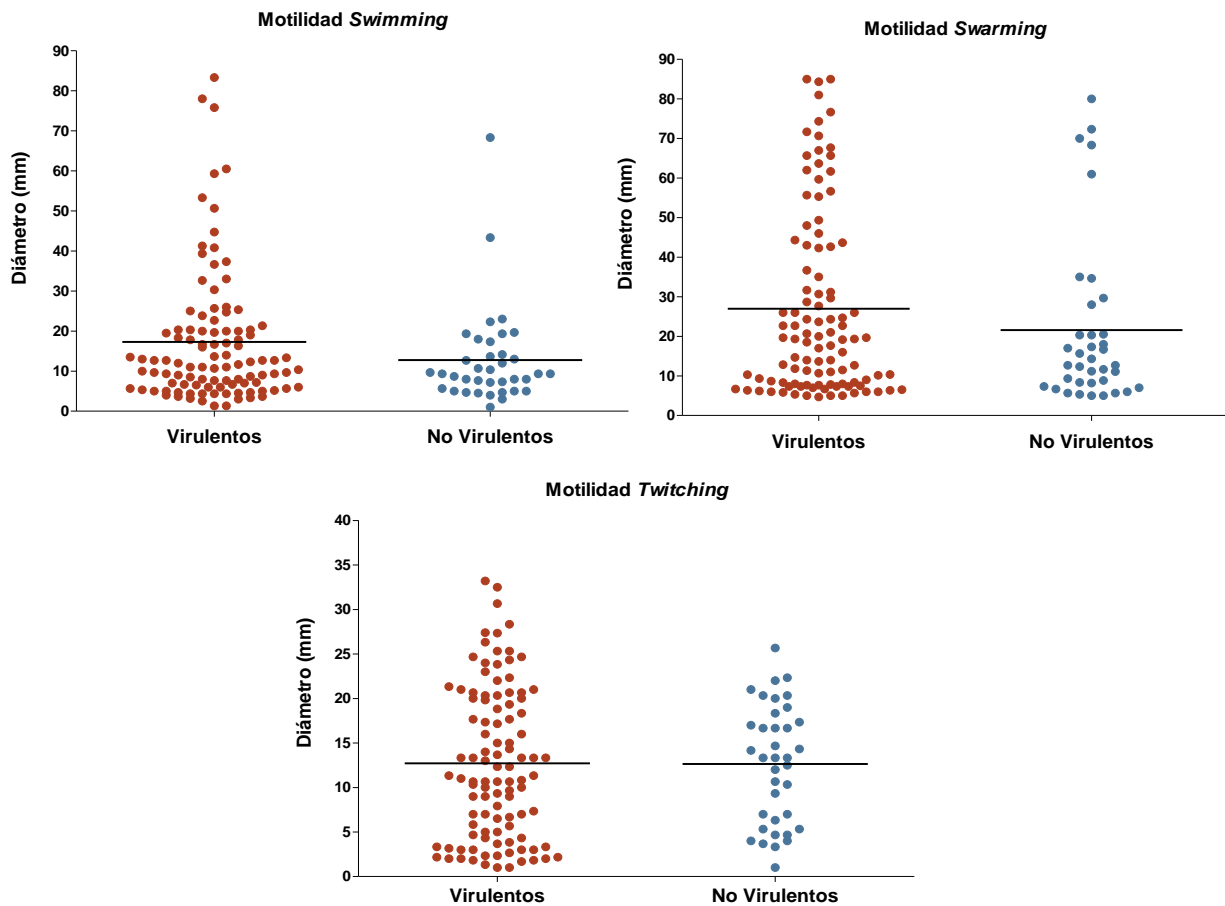
La falta de impacto en la virulencia podría ser debido a varias causas, una de ellas, podría ser la gran cantidad de aislados virulentos que posee esta colección, ya que éstos se encuentran representados por el 73.6% del total (figura 4.1), y por tanto la proporción de aislados no virulentos podría no ser suficiente para ser representativa. El método de infección utilizado quizás no fuese el más apropiado para observarse distinciones entre la producción de pigmentos pues como se ha explicado previamente, la literatura describe 3 ensayos distintos. En el método *Slow Killing* (utilizado en este trabajo) intervienen multitud de factores de virulencia (Tan *et al.*, 1999); mientras que en el *Fast killing* y *Liquid Killing* intervienen las toxinas fenazinas (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999); y pioverdina (Conery *et al.*, 2014; Kirienko *et al.*, 2013) como factores clave para producir la muerte en *C. elegans*. Dado que para los ensayos *Fast Killing* y *Liquid Killing* los pigmentos parecen ser esenciales, es posible que con el método *Slow-killing* el impacto haya sido menor dado que intervienen más factores de virulencia.

O bien, otro factor que puede haber influido, podría ser el posible comportamiento de aversión que pudiese tener nuestro modelo frente *P. aeruginosa* durante la infección. Esta estrategia la lleva a cabo durante la colonización de los patógenos y permite a *C.elegans* la distinción entre las fuentes de alimentos favorables y desfavorables (Ballestriero *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2005), pudiendo evitar alimentarse, en nuestro caso, de ciertas cepas de *P. aeruginosa*, produciendo así un cambio en el impacto en la virulencia.

Por otro lado, Cezairliyan y colaboradores (Cezairliyan *et al.*, 2013) demostraron que la síntesis de piocianina es dependiente de pH, y por tanto la diferencia observada en la toxicidad de los nematodos expuestos a PA14 podía deberse a diferencias en los estados de oxidación. En este estudio, observaron que mediante el ensayo *Fast Killing*, la toxina responsable de la muerte de *C. elegans* era la fenazina-1-acido carboxílico en lugar de la piocianina (Cezairliyan *et al.*, 2013). Por tanto, cabe la posibilidad de que la pérdida de impacto de la piocianina en la virulencia pueda deberse a que se hayan

generado compuestos que hayan causado un cambio en el pH, y que se haya producido una disminución en la síntesis de piocianina y como consecuencia, la pérdida en el impacto.

En el mismo sentido, un análisis realizado por Granato y su equipo (Granato *et al.*, 2016), reveló que aunque la pioverdina se encuentre involucrada en diversos contextos de infección, el efecto sobre la virulencia varió considerablemente entre los distintos huéspedes y en muchos casos mostró un efecto disminuido demostrando que, aunque interviene en la virulencia, la pioverdina no es un factor indispensable en las infecciones. Este mismo efecto fue observado por Chieda y su equipo (Chieda *et al.*, 2008) con mutantes de PAO1 deficientes en la producción de piocianina, ya que mostraron la misma virulencia que la cepa tipo, pudiendo estar involucrados en la patogenia otros factores de virulencia.



**Figura 4.5.** Análisis comparativo de 140 aislados, entre la motilidad *twitching*, *swarming* y *swimming*, y los fenotipos de virulencia de *P. aeruginosa* en *C. elegans*. Aislados virulentos (CEVS 3 a 5) y no virulentos (CEVS 1 y 2). Se realizó la prueba U de Mann-Whitney para analizar las diferencias entre los diferentes grupos. Se consideró significativo \**p*-valor<0.05



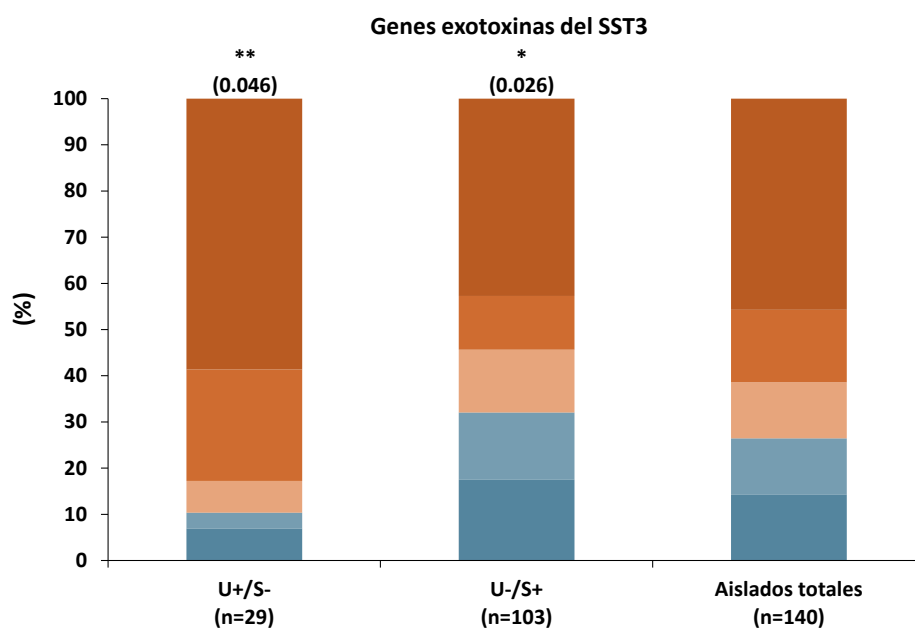
Al igual que en la producción de pigmentos, ninguno de los 3 tipos de motilidad mostró una relación con la virulencia de *P. aeruginosa* en nuestro modelo de *C. elegans* a diferencia de lo que cabría esperar según la bibliografía, que afirma que tanto la presencia de flagelo como de pili tipo IV, se relacionan con un incremento de la virulencia (Kazmierczak *et al.*, 2015; O'Toole & Kolter, 1998). De hecho, mutantes deficientes en la motilidad han mostrado un déficit en la virulencia (Han *et al.*, 2008; Pérez-Varela *et al.*, 2017; Weller-Stuart *et al.*, 2017; Fleiszig *et al.*, 2001; Drake & Montie, 1988; Montie *et al.*, 1982). Incluso según Overhage (Overhage *et al.*, 2008), las cepas que presentaron motilidad tipo *swarming*, también mostraron niveles más altos de transcripción del SST3 y proteasas extracelulares. Por otro lado, Marko (Marko *et al.*, 2018) y su equipo, han propuesto recientemente que la pérdida de pilinas (subunidades que conforman el pili tipo IV) debida a mutaciones en su operón (FimS-AlgR), producen una disminución de la piliación pero un aumento de los factores de virulencia asociados a infecciones crónicas, como el alginato, sugiriendo que las subunidades formadoras del pili tipo IV, se encuentran involucradas en la regulación de la virulencia de *P. aeruginosa*.

Según el estudio desarrollado por Mulet y colaboradores (Mulet *et al.*, 2013), corroborado posteriormente por Hwang y su equipo (Hwang & Yoon, 2019), los aislados MDR/XDR (relacionados en este trabajo con una mayor proporción de aislados no virulentos), se asocian a una disminución significativa en la expresión de factores de virulencia, tales como, la motilidad y la producción de pigmentos. Por tanto, al igual que con la producción de pigmentos la falta de asociación podría deberse a la gran cantidad de aislados virulentos que posee esta colección y al modelo de infección usado.

Uno de los determinantes más relevantes de virulencia de *P. aeruginosa*, es el SST3 (Engel & Balachandran, 2009). Este sistema inyecta potentes citotoxinas en las células eucariotas (*exoS*, *exoT*, *exoU* y *exoY*). Estudios anteriores indican que *exoS* se encuentra entre el 58-72% de los aislados y está generalmente asociado a un fenotipo invasivo; mientras que *exoU* es menos frecuente (28%-42%) y está asociado a una elevada toxicidad (Hauser, 2009). En consonancia con los estudios previos de Peña y colaboradores (Peña *et al.*, 2015), las exoproteínas *exoT* y *exoY* se hallaron en la gran mayoría de los aislados, estando presentes en el 99% y el 93% respectivamente. Sin embargo, *exoU* y *exoS* (proteínas, en general, mutuamente excluyentes) se encontraron en una menor proporción; concretamente, el 20.7% de los aislados fueron *exoU* positivos, y el 73.6% fueron positivos para *exoS*. Además, se observó que respecto al total de

aislados estudiados, una pequeña parte no presentaron ninguna de las dos exoproteínas (5%) y un único aislado presentó ambas (0.7%).

La distribución de las exoproteínas S y U en función del CEVS se puede observar en la figura 4.6. En ella se representa la presencia de ExoU (por tanto ausencia de ExoS) ( $exoU^+/exoS^-$ ) y ExoS ( $exoU^-/exoS^+$ ). Se excluyeron del análisis las exotoxinas ExoT y ExoY debido a su presencia en la mayoría de las cepas, puesto que el análisis de las mismas no aportaría ningún tipo de asociación relevante en la virulencia de *P. aeruginosa* en el modelo de *C. elegans*.



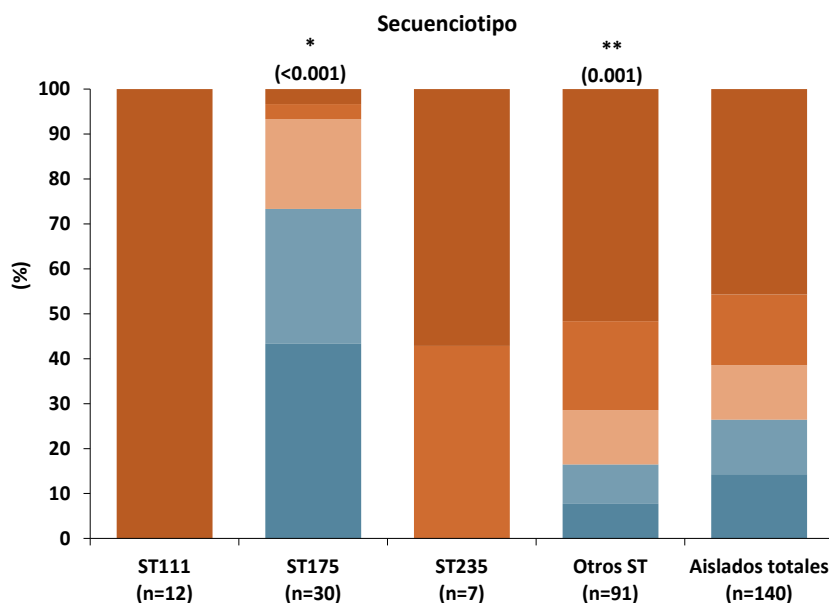
**Figura 4.6.** Impacto del genotipo del SST3( $exoU^+$  o  $exoS^+$ ) en la virulencia de *P.aeruginosa*. Se realizaron la prueba Chi-cuadrado o exacta de Fisher para analizar las diferencias entre los diferentes grupos \*Virulencia significativamente menor ( $p$ -valor $<0.05$ ), \*\*virulencia significativamente mayor ( $p$ -valor $<0.05$ ). Aislados virulentos (CEVS 3 a 5) y no virulentos (CEVS 1 y 2).

En particular se puede observar que los aislados positivos para  $exoU$  ( $exoU^+/exoS^-$ ) fueron significativamente más virulentos (89,7%) que los que presentan  $exoS$  (68%). Estadísticamente, la presencia de ExoU ( $exoU^+/exoS^-$ ) se asoció de forma significativa con los CEVS 3, 4 y 5, mientras que el genotipo positivo para ExoS ( $exoU^-/exoS^+$ ) lo hizo con los CEVS 1 y 2. Estos resultados, se encuentran en consonancia con diversos estudios en los que el SST3 se relaciona con una mayor virulencia, especialmente la toxina ExoU, la cual es necesaria para causar virulencia en modelos murinos tanto por infección intraperitoneal (Gómez-Zorrilla *et al.*, 2016) como por neumonía aguda (Sawa *et al.*, 2014); además es un contribuyente importante en la virulencia del ST235 en

*C.elegans* (Recio *et al.*, 2020); y está asociada con hasta el 90% de los casos de enfermedad grave en infecciones humanas (Hauser & Rello, 2003).

#### 4.4 Clones de alto riesgo ST111, ST175 y ST235. Análisis mutacional del clon ST175

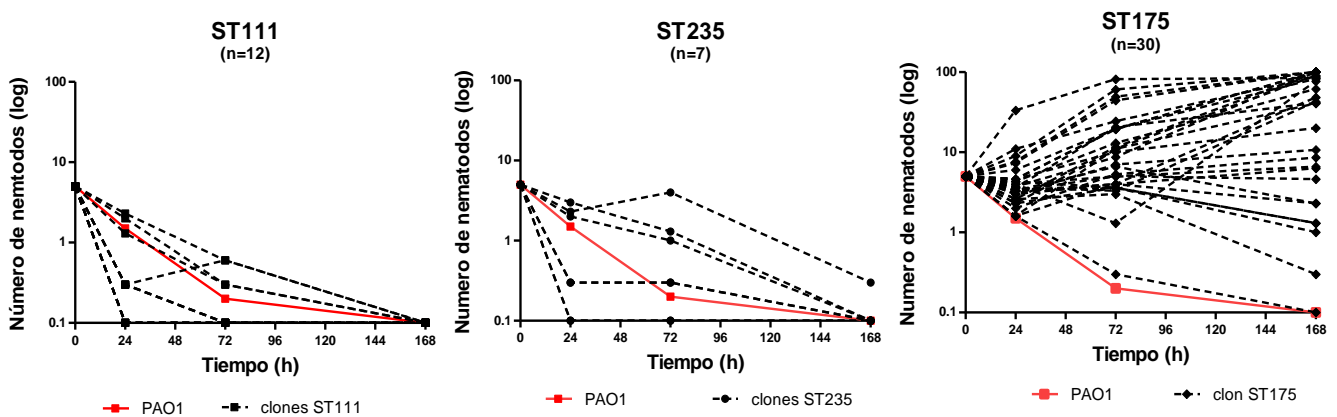
La importancia clínica de los clones de alto riesgo MDR/XDR radica en la capacidad que poseen para acumular y diseminar resistencias (Woodford *et al.*, 2011), causando brotes epidémicos a nivel mundial asociados a una elevada morbilidad y mortalidad. Los principales clones son el ST111, el ST235 y el ST175, este último altamente distribuido en España, seguido de los ST111 y ST235 (Oliver *et al.*, 2015). Conocer las razones del éxito de estos clones es importante para abordar estrategias en el tratamiento y control de las infecciones (Baquero *et al.*, 2011). Recientemente se ha determinado que presentan un conjunto definido de marcadores biológicos (Mulet *et al.*, 2013) sin embargo, la virulencia de los mismos debe de ser estudiada más a fondo, ya que existen pocos trabajos que hayan tratado esta cuestión.



**Figura 4.7.** Impacto del perfil alélico (MLST) en la virulencia en *C. elegans*. Se realizaron la prueba Chi-cuadrado o exacta de Fisher para analizar las diferencias entre los diferentes grupos \*Virulencia significativamente menor ( $p$ -valor<0.05), \*\*virulencia significativamente mayor ( $p$ -valor<0.05). Aislados virulentos (CEVS 3 a 5) y no virulentos. (CEVS 1 y 2).

Al examinar la distribución de los mismos en la colección (figura 4.7), observamos que un 35% de los aislados (49/140) pertenecieron a alguno de los clones de alto riesgo clásicos (Oliver *et al.*, 2015). En concreto, 12 aislados pertenecieron al clon ST111, 30

corresponden al ST175 y 7 al ST235. La figura 4.7 muestra la asociación entre cada uno de los clones de alto riesgo y los CEVS. Aquellos pertenecientes a los clones de alto riesgo ST111 y ST235, fueron altamente virulentos (CEVS4 y CEVS5), mientras que un 73% de los clones pertenecientes al ST175 fueron no virulentos (CEVS 1 y CEVS 2). El resto de los ST175 presentaron, en su gran mayoría, una virulencia moderada (CEVS 3). Estudios previos respaldan nuestros datos que demuestran el clon ST175 mostró una virulencia significativamente reducida (Gómez-Zorrilla *et al.*, 2016; Mulet *et al.*, 2013). De hecho, mediante el análisis estadístico, este clon se relacionó de forma negativa con la virulencia asociándose a los CEVS 1-2. Por lo que respecta a los clones no pertenecientes a los clones mayoritarios de alto riesgo, el 82.53% fueron virulentos para este modelo de infección.



**Figura 4.8.** Letalidad de los clones de alto riesgo de *P. aeruginosa* ST111 (n=12), ST175 (n=30) y ST235 (n=7) en el modelo *C.elegans*. Se muestra la media de supervivencia de los nematodos a las 0, 24, 72 y 168 horas. Se incluyen los valores de la PAO1 (rojo) con fines comparativos.

En la figura 4.8 se muestra la letalidad a lo largo de una semana, en ella se puede apreciar de una forma más clara la virulencia reducida del clon de alto riesgo ST175 (MDR/XDR) en *C. elegans*, así como la variación de virulencia dentro del mismo clon.

Estos resultados respaldan parcialmente el estudio previo de Gómez-Zorrilla y su equipo, en el cual los clones ST111 y ST175 mostraron una virulencia reducida respecto al ST235, el único capaz de causar la muerte en un modelo murino manteniendo intactas la resistencia y la virulencia (Gómez-Zorrilla *et al.*, 2016). También se encuentran en consonancia con el estudio realizado recientemente por Recio y su equipo con el modelo de *C. elegans*, donde el ST235 mostró una virulencia elevada a diferencia del ST175. Puesto que estos clones se asociaron a una disminución de ciertos factores de virulencia (Mulet *et al.*, 2013), es posible que el SST3 juegue un papel importante en la diferencia de la letalidad entre ellos. En este sentido, la virulencia acusada del ST235 podría deberse

a la presencia de la toxina *exoU* que, como se ha ido comentando a lo largo de este trabajo, es uno de los determinantes de virulencia más importantes de *P. aeruginosa*. De hecho, la presencia de *exoU* en el clon ST235, se ha asociado a una mayor virulencia en estudios realizados con modelos animales de infección (Recio *et al.*, 2020; Gómez-Zorrilla *et al.*, 2016) y a un mayor riesgo de mortalidad en pacientes con infecciones del torrente sanguíneo y del tracto respiratorio (Recio *et al.*, 2018; Peña *et al.*, 2015; El-Solh *et al.*, 2012; Viedma *et al.*, 2009). En este trabajo el 71% de los clones ST235 presentaron un genotipo positivo para *exoU* y los dos únicos que fueron negativos para ambas toxinas (*exoS* y *exoU*), mostraron una ligera disminución en la patogenicidad y fueron los dos únicos aislados que pertenecieron al CEVS4. Estos datos apoyan la idea de que el clon XDR ST235 *exoU*<sup>+</sup>, exhibe un fenotipo muy virulento y afecta de forma negativa al desenlace de las infecciones (Recio *et al.*, 2018; Peña *et al.*, 2015; Viedma *et al.*, 2009).

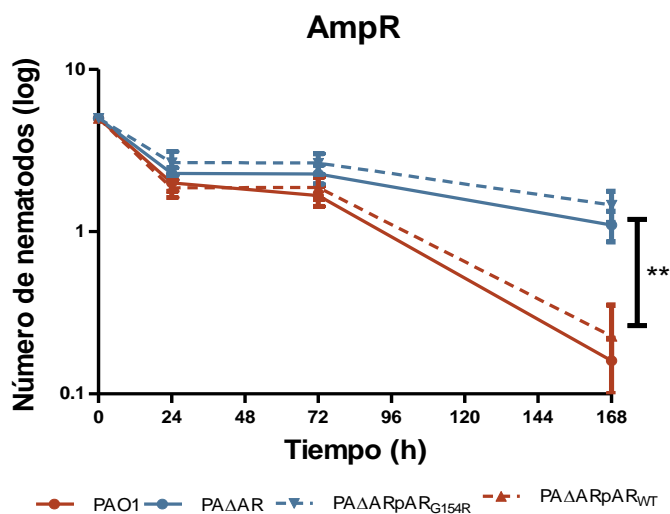
Respecto al resto de los clones de alto riesgo, el 100% de los ST111 y ST175 mostraron un genotipo *exoS* positivo. La virulencia del ST111 observada en nuestro modelo de *C. elegans* difiere de la observada en ratones (Gómez-Zorrilla *et al.*, 2016), motivo por el cual los factores asociados a la patogenia de este clon deberían ser estudiados en profundidad. Mientras que la virulencia reducida del ST175, se encuentra en consonancia con trabajos previos y recientes realizados en modelos murinos y en *C.elegans* (Recio *et al.*, 2020; Gómez-Zorrilla *et al.*, 2016).

Con la finalidad de averiguar qué factores podrían estar relacionados con este particular fenotipo del ST175, estos clones fueron secuenciados y estudiados en detalle, como se verá en los apartados siguientes.

#### **4.4.1 Impacto de la mutación específica G154R AmpR en la virulencia de los clones de alto riesgo ST175.**

Estudios previos de Balasubramanian (Balasubramanian *et al.*, 2012) y Kong (Kong *et al.*, 2005) mostraron que AmpR además de ser un regulador transcripcional de AmpC, también está asociado con *quórum sensing* (QS), producción de alginato, formación de biopelículas y expresión de otros factores de virulencia (Balasubramanian *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2005). Recientemente se identificó que la mutación específica G154R en clones ST175 hiperproductores de AmpC, desencadenaba la activación de AmpR como regulador positivo de la síntesis de *ampC*, con la consecuente hiperproducción de la  $\beta$ -lactamasa, generando por tanto, resistencia a los  $\beta$ -lactámicos (Cabot *et al.*, 2016; Cabot *et al.*, 2012). Puesto que AmpR juega un papel importante, tanto en los factores de

resistencia como la expresión de factores de virulencia. En este trabajo, evaluamos si esta mutación podría tener un impacto sobre la virulencia.



**Figura 4.9.** Virulencia de PAO1 y de los mutantes de *ampR* en *C. elegans*. Se muestra la media de supervivencia de los nematodos a las 0, 24, 72 y 168 horas. Las medias  $\pm$  Desviación estándar (DS) (barras de error) proceden de al menos tres experimentos independientes. Se realizó la prueba *U* de Mann-Whitney para analizar las diferencias entre los diferentes mutantes y PAO1. \*\**p*-valor < 0.001

Como se puede observar en la figura 4.9, la inactivación de *ampR* (PAΔAR) redujo de forma significativa la virulencia de PAO1 aumentando la supervivencia del nematodo.

Los ensayos de complementación con un *ampR* de tipo salvaje (*wt*), se restauró por completo la virulencia inicial de PAO1 (PAΔARpAR<sub>wt</sub>). Sin embargo, la complementación con *ampR*<sub>G154R</sub> (PAΔARpAR<sub>G154R</sub>) no restableció la virulencia inicial, produciendo el mismo efecto de pérdida de virulencia que el mutante *ampR* (PAΔAR). Por tanto estos resultados indican que AmpR es un factor relevante en la virulencia en este modelo y que esta mutación específica en AmpR perjudica la virulencia.

Debido a la disminución de la letalidad observada en los mutantes con la mutación G154R en AmpR, se examinó dicha mutación entre los 30 clones ST175 analizados. A pesar de encontrarse en 22 de los 30 aislados, la presencia o ausencia de esta mutación no explicaba las diferencias en la virulencia dentro del clon; puesto que al igual que en los aislados no virulentos, los clones ST175 que mostraron un fenotipo virulento (CEVS 4 y 5), también presentaron dicha mutación.

4.4.2 Estudio de las mutaciones involucradas en la virulencia de los clones de alto riesgo ST175.

Dado que la presencia de la mutación específica G154R en AmpR no explica en su totalidad la variación en la patogenicidad observada, seguidamente se examinaron las posibles mutaciones que pudiesen estar involucradas en los cambios fenotípicos observados en la virulencia de los ST175. Para ello, se compararon genomas secuenciados previamente (Cabot *et al.*, 2016), de dos aislados no virulentos (CEVS 1), con los dos únicos aislados altamente virulentos (CEVS 4 y 5) respecto al genoma de la cepa de referencia PAO1.

Tal y como se muestra en la tabla 4.1, se observaron mutaciones en 70 genes y regiones intergénicas las cuales fueron exclusivas de cada uno de los grupos establecidos, “no virulento” y “virulento” (tabla 4.1). En concreto, 24 cambios se encontraron únicamente en el grupo no virulento (*flgI*, *gacA*, *magD*, *ampD*, *ctpL*, etc.), mientras que 58 se encontraron únicamente en el grupo virulento (*pys2*, *cobB*, *hemN*, *tsi1*, *hsiA3*, etc.). Sin embargo, de las mutaciones encontradas en el grupo de aislados no virulentos, ninguna fue compartida por ambas cepas; por lo que no se puede atribuir la particular pérdida de virulencia a la presencia de mutaciones en genes específicos. Por el contrario, los aislados virulentos compartieron 11 de los genes mutados, entre los cuales se encontraron la proteasa extracelular (*lepA*), la piocianina S2 (*pys2*) y el gen *hsiA3*, que forma parte del operón del loci H3 del Sistema de Secreción Tipo 6 (SST6) (Sana *et al.*, 2013). Sin embargo, aunque los aislados virulentos mostrasen mutaciones comunes, sería necesario realizar un análisis funcional con múltiples genomas de este clon para obtener información más detallada sobre los impulsores de su virulencia.

LOCUS GEN	NOMBRE GEN	CAMBIO	AISLADOS			
			No Virulentos (CEVS = 1)		Virulentos (CEVS = 4/5)	
			20A3	20C9	22C1	22C6
PA0161		G49S				
PA0425	<i>mexA</i>	Q183X				
PA0434		P673S				
PA0533		A138T				
PA0573		R51K				
PA0574		R188S				
PA0818		InDel				
Región Intergénica (PA0873)		InDel				
PA1084	<i>flgI</i>	R121C				
PA1085	<i>flgJ</i>	P167T				
PA1103		E245A				



PA1150	<i>pys2</i>	V506I				
PA1150	<i>pys2</i>	T517A				
PA1153		A67T, A73V				
PA1238		G337A				
PA1273	<i>cobB</i>	A200V				
PA1288		V17A				
PA1302		InDel				
Región Intergénica (PA1352)		InDel				
PA1400		L490P				
PA1546	<i>hemN</i>	V326A				
PA1611		Leu71P				
PA1845	<i>tsiI</i>	Q145E				
PA1848		T386M				
PA1945		R373Q				
PA2099		W49X				
PA2268		A332T				
PA2335		T758S				
PA2360	<i>hsiA3</i>	A24P				
PA2426	<i>pvdS</i>	Tyr66H				
PA2552		H160Y				
PA2586	<i>gacA</i>	InDel				
PA2589		A185T				
PA2798		E297D				
PA2916		A92S				
PA2984		H515R				
PA3024		V331G				
PA3297		A86T				
PA3327		A1723T				
PA3348		R34W				
PA3391	<i>nosR</i>	V443M				
PA3843		P10T				
PA3880		A27V				
PA4006	<i>nadD1</i>	F111L				
PA4081	<i>cupB6</i>	Y105F				
PA4112		P1145S				
PA4163		A95T				
PA4221	<i>fptA</i>	S698F				
PA4322		V47M				
PA4403	<i>secA</i>	D580V				
PA4489	<i>magD</i>	G773C				
PA4505	<i>dppD</i>	T305A				
PA4509		D196N,R201Q				
PA4522	<i>ampD</i>	T139M				
PA4541	<i>lepA</i>	A457S				
PA4587	<i>ccpR</i>	C77Y				
PA4675	<i>chtA</i>	D651V				
PA4785		A106P				



PA4822		T294P				
PA4844	<i>ctpL</i>	A513T				
PA4851		InDel				
PA5017	<i>dipA</i>	W38X				
PA5040	<i>pilQ</i>	InDel				
PA5082		F49I				
PA5161	<i>rmlB</i>	C266F				
PA5171	<i>arcA</i>	T167I				
PA5272	<i>cyaA</i>	S773N				
PA5311		Q119E				
PA5415	<i>glyAI</i>	R76Q				
PA5441		S511N				
PA5464		G31E				

**Tabla 4.1.** Mutaciones diferenciales detectadas en cada uno de los aislados ST175 no virulentos (n=2) y virulentos (n=2). Se utiliza el genoma de *P.aeruginosa* PAO1 como referencia.

Con el fin de ampliar el estudio, se utilizaron 14 clones ST175 secuenciados previamente para comparar los respectivos genomas frente al de otro clon ST175 usado de referencia (PAmb179) (Cabot *et al.*, 2016), y averiguar los cambios genéticos que pudiesen estar asociados con la virulencia. Dichos aislados fueron obtenidos de la colección de bacteriemia en los que también se determinó la virulencia en el modelo de *C. elegans* (resultados reflejados en el siguiente apartado) (Peña *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos mostraron que la diferencia del número total de mutaciones entre las cepas no virulentas (CEVS 1-2) y virulentas (CEVS 3-4-5) no fue significativa ( $p=0.470$ ), dado que las cepas no virulentas mostraron una mediana de 45 mutaciones (mutaciones mínimas=33; máximas=144), mientras que las cepas virulentas mostraron una mediana de 41 (mutaciones mínimas=24; máximas=90). Por lo que respecta a los cambios asociados a la virulencia, cabe destacar que un polimorfismo (D668G) en el gen WP\_038403099.1 (cuya función reside en codificar para una helicasa dependiente de ATP), se asoció de forma significativa con un aumento de la virulencia ( $p=0.041$ ); no obstante la repercusión del mismo en la patogenicidad de *P. aeruginosa* debe ser estudiada en profundidad en futuros trabajos. Otros polimorfismos localizados en 5 genes, que mostraron un  $p$ -valor de 0.066, también podrían ser considerados en trabajos futuros ya que tal vez debido al bajo número de cepas del estudio podrían haber perdido impacto en la virulencia. Asimismo, se determinó que del total de genes, un 31% presentaron una mayor proporción de mutaciones en los aislados virulentos y un 66% en las cepas no virulentas. Estos resultados, en los que los aislados no virulentos sufren más cambios que los virulentos, puede deberse al número de clones no virulentos presentes en este

análisis, ya que de 14 clones, 10 fueron no virulentos (CEVS 1-2) y 4 fueron virulentos (CEVS 3-5).

#### 4.5 Análisis de los factores asociados a la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

Además de establecer una asociación entre la virulencia de *P. aeruginosa* y los factores que puedan estar implicados en ella; analizamos la importancia de dicha asociación y su relación con las variables (positiva o negativa), mediante un análisis de regresión logística univariante (tabla 4.2). Corroborando los resultados expuestos, se determinó una asociación positiva y significativa (valores de Odds Ratio y de la significación) entre el perfil de resistencia MultiS (OR=5.83, p=0.006), la presencia de ExoU (*exoU*<sup>+</sup>/*exoS*<sup>-</sup>) (OR=4.03, p=0.030) y la virulencia (CEVS 3,4,5). Mientras, que el perfil XDR, el clon ST175 y la presencia de ExoS (*exoS*<sup>+</sup>/*exoU*<sup>-</sup>), se asociaron de forma negativa con la misma, mostrando un OR de 0.35 (p=0.008), OR=0.06 (p≤0.001) y OR de 0.27 (p=0.021), respectivamente. Esto demuestra que los aislados que presentaron el genotipo positivo para ExoU (*exoU*<sup>+</sup>/*exoS*<sup>-</sup>) y/o el perfil de resistencia MultiS, fueron significativamente más virulentos que los clones ST175, el perfil de resistencia XDR, y/o la presencia de la exotoxina S.

Variable	Odds Ratio (OR)	OR (95% IC)	p-valor
<b>ST175</b>	0.06	0.02-0.15	≤0.001
<i>exoS</i>	0.27	0.09-0.82	0.021
<i>exoU</i>	4.03	1.14-14.19	0.030
<b>XDR</b>	0.35	0.16-0.76	0.008
<b>MultiS</b>	5.83	1.67-20.34	0.006

**Tabla 4.2.** Análisis por regresión logística univariante de los factores predictivos de la virulencia de *P.aeruginosa* en el modelo de infección *C.elegans*.

Además de realizar un modelo univariante, se planteó la opción de realizar un análisis de regresión logística múltiple para identificar cuáles podrían ser los factores asociados de manera independiente con la virulencia. *A priori*, todos los factores estudiados fueron inicialmente incluidos en el modelo y posteriormente ajustado por aquellas variables que resultaron significativas. Este modelo indicó que el clon de alto

riesgo ST175, fue el único factor que mostró una asociación independiente con la falta de virulencia (OR=0.68,  $p < 0.001$ ) en el modelo de *C. elegans*.

#### **4.5.1 Análisis factorial de las variables estudiadas en función del origen, secuenciotipo y los determinantes de resistencia y virulencia.**

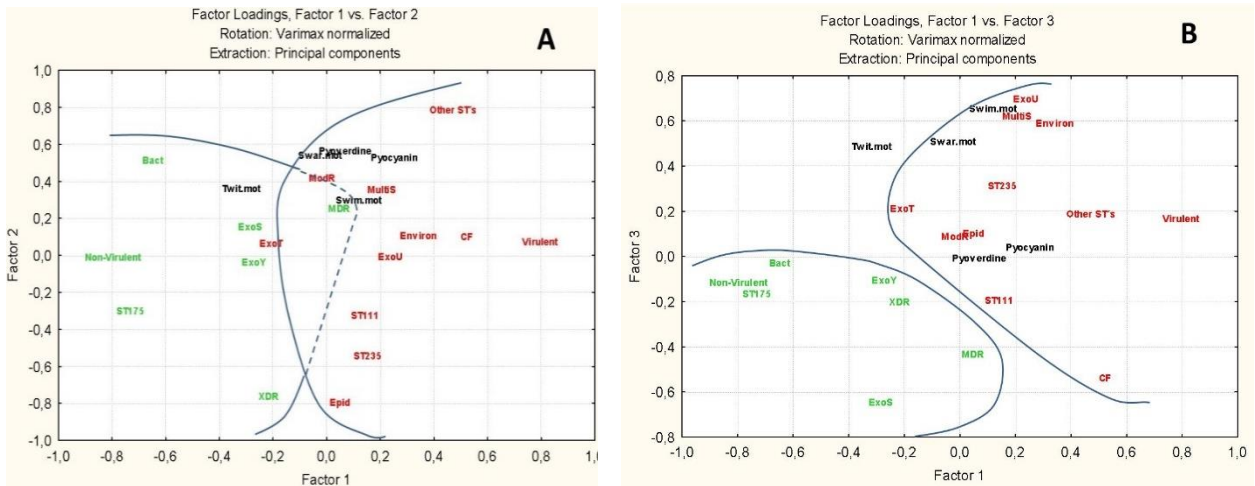
Además de las regresiones explicadas previamente, se realizó un análisis combinado entre el gradiente de virulencia de *P. aeruginosa* en *C. elegans* y los factores asociados con ella (perfil de resistencia, secuenciotipo, origen y SST3, motilidad y pigmentos) en los distintos aislados, con el objetivo de determinar la estructura de las interrelaciones entre las variables cualitativas y cuantitativas (Figura 4.10).

Los principales marcadores definidos en el Factor 1 fueron el clon ST175 y el origen de los aislados (bacteriemia y FQ). Se puede observar a los aislados de FQ (más virulentos) frente los de bacteriemia (menos virulentos) con signos opuestos; y el clon ST175 situado dentro de los no virulentos (tabla 4.3). Los marcadores definidos en el Factor 2 fueron el ST235, cepas con otros secuenciotipos (ST), el perfil de resistencia XDR, origen epidémico, la producción del sideróforo pioverdina y la motilidad tipo *swarming*. En este caso, se puede observar una variación importante entre el clon ST235 y las cepas con otros ST, demostrando que dentro de los aislados virulentos hay unos más que otros; además, explicaría la virulencia asociada al origen epidémico, al perfil XDR y en menor medida a la motilidad tipo *swarming* y a la producción de pioverdina. Por último, los marcadores del Factor 3 fueron el perfil de resistencia MultiS, las exoproteínas ExoS y ExoU del SST3, la motilidad tipo *swimming* y el origen de los aislados (ambientales o FQ). Este análisis confirmó que los aislados no virulentos se asociaron de forma significativa con el clon de alto riesgo ST175, los perfiles de resistencia MDR y XDR, la presencia de ExoS y ExoY, origen de bacteriemia y valores reducidos de pioverdina, piocianina, motilidad tipo *swimming* y tipo *swarming*. Sin embargo, los aislados virulentos se asociaron principalmente a los clones ST111 y ST235, clones con otros ST, a las fuentes ambientales, epidémicas y FQ, a los perfiles de resistencia ModR y MultiS, presencia de ExoU y ExoT (como variable espuria) y a valores elevados en la producción de ambos pigmentos, así como en la motilidad mencionada. Además, en la figura 4.11 se observa que la mayoría de las variables quedaron bien representadas en el espacio factorial que unía estas con las cepas estudiadas. Los tres primeros ejes de la figura explican el 82.16% de la variación total o

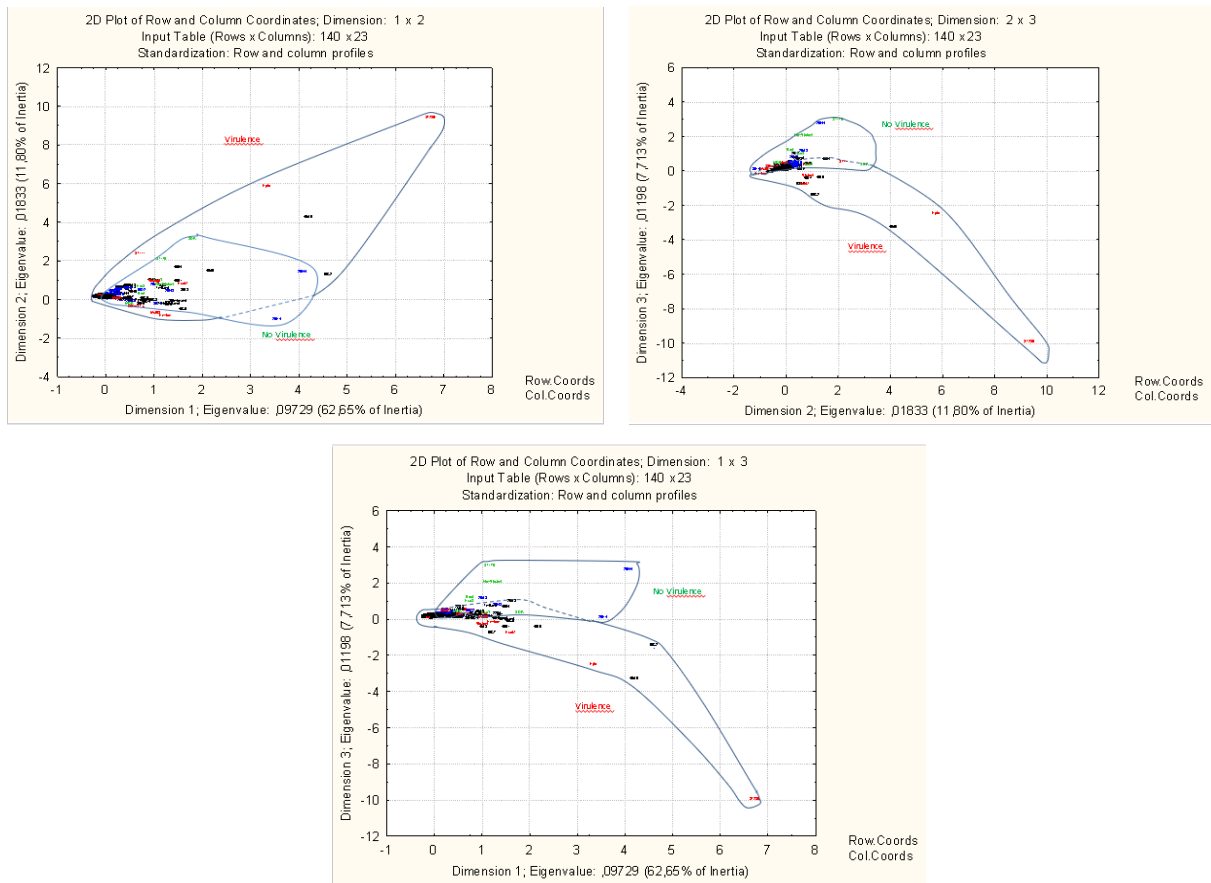
inercia. En el contexto general, es posible inferir la estructura virulenta y no virulenta basada en el análisis factorial.

Variables	Factor 1	Factor 2	Factor 3
<b>Secuenciotipo</b>			
Otros ST	0.473078	<b>0.755805</b>	0.162859
ST111	0.143600	-0.354937	-0.219576
ST175	<b>-0.729383</b>	-0.331501	-0.191779
ST235	0.153441	<b>-0.574049</b>	0.286685
<b>Origen</b>			
Bacteriemia (Bact)	<b>-0.647794</b>	0.481196	-0.055631
Epidémicos (Epid)	0.050234	<b>-0.825243</b>	0.077954
Fibrosis Quística (CF)	<b>0.523223</b>	0.068951	<b>-0.564354</b>
Ambientales (Environ)	0.342661	0.075778	<b>0.565074</b>
<b>Perfil de Resistencia</b>			
XDR	-0.216590	<b>-0.793884</b>	-0.225944
ModR	-0.016688	0.386670	0.062613
MultiS	0.206159	0.325017	<b>0.595526</b>
MDR	0.046874	0.222460	-0.457609
<b>Exotoxinas del SST3</b>			
ExoU	0.238108	-0.038874	<b>0.671287</b>
ExoS	-0.283166	0.122514	<b>-0.671469</b>
ExoT	-0.207426	0.032910	0.186442
ExoY	-0.270468	-0.067312	-0.132127
<b>Virulencia <i>P.aeruginosa</i></b>			
Aislados no-Virulentos	<b>-0.796247</b>	-0.041577	-0.141304
Aislados virulentos	<b>0.796247</b>	0.041577	0.141304
<b>Motilidad</b>			
<i>Twitching</i>	-0.317305	0.326095	0.458140
<i>Swimming</i>	0.119745	0.263959	<b>0.626552</b>
<i>Swarming</i>	-0.023952	<b>0.506912</b>	0.480658
<b>Pigmentos</b>			
Pioverdina	0.070486	<b>0.528306</b>	-0.037006
Piocianina	0.252977	0.494242	0.012694

**Tabla 4.3.** Análisis factorial de las variables estudiadas. Los números representan las cargas de factoriales (explicación relativa) de las variables de acuerdo con los tres factores principales que se extrajeron mediante el enfoque de componentes principales. Las cargas factoriales se normalizaron con Varimax. Los valores marcados fueron  $>+/-0.50$ . Los puntos determinan los factores y aislados virulentos (rojo) y no virulentos (verde) en las figuras 4.10 y 4.11.



**Figura 4.10.** Relación entre las variables que explican las diferencias generales entre cepas virulentas (rojo) y no virulentas (verde). **A.** Estructura definida por los factores 1 y 2; **B.** Estructura definida por los factores 1 y 3. Se expresan las diferencias en las variables cuantitativas mediante  $\text{media} \pm \text{DS}$ .



**Figura 4.11. A, B y C** Disposición de clones y variables en el espacio factorial según el análisis de correspondencia

Dado que se ha demostrado que existe una relación entre los clones de alto riesgo y algunos determinantes de virulencia y de resistencia de *P. aeruginosa* (SST3, perfil de resistencia, ST175) y la virulencia mostrada en *C. elegans*, el siguiente objetivo fue evaluar el valor predictivo de este modelo de infección como marcador pronóstico de la bacteriemia por *P. aeruginosa*. Con ese fin, como se verá en la *Parte II* del presente trabajo, ampliamos el estudio con la colección completa de la cohorte de bacteriemias.

---

*Parte II. Impacto de la virulencia en  
Caenorhabditis elegans en las  
características y el desenlace de las  
bacteriemias por Pseudomonas  
aeruginosa*

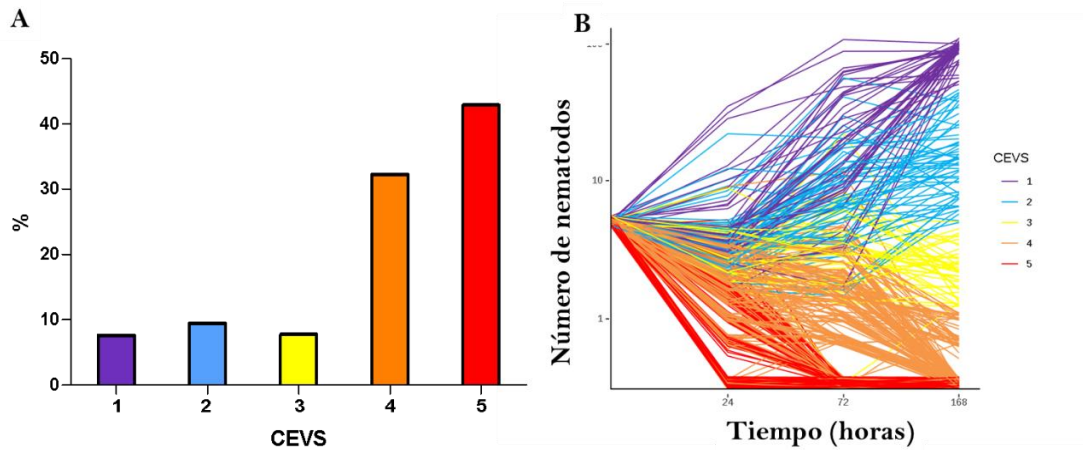
---





#### 4.6 Distribución de los aislados procedentes de la colección de bacteriemia en función de su virulencia.

La distribución de los aislados en los diferentes CEVS (A) en función de su virulencia se puede apreciar en la figura 4.12, así como la dinámica de supervivencia de *C. elegans* (B) en el transcurso de una semana representados por diferentes colores: lila y azul para los CEVS no virulentos 1 y 2 (permiten la reproducción del nematodo), amarillo para el CEVS 3 de virulencia intermedia (inhibe la reproducción del nematodo), y finalmente, naranja y rojo para los CEVS virulentos 4 y 5 (provocan la muerte al nematodo).

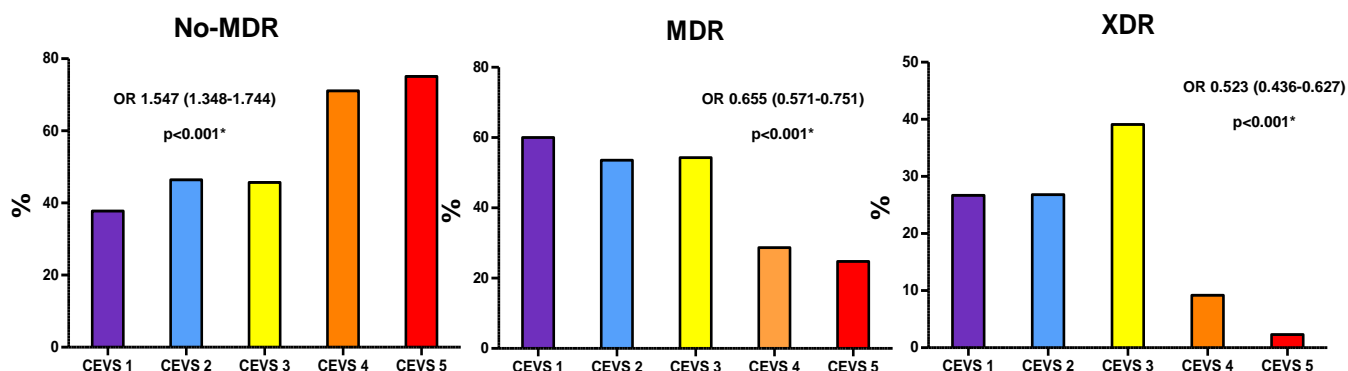


**Figura 4.12.** Virulencia de los 593 aislados de bacteriemia por *P.aeruginosa* en el modelo *C.elegans*. (A) Prevalencia de los 593 aislados estudiados en cada categoría de CEVS. Se indican los números absolutos de aislados (n). (B) Dinámica de supervivencia de los nematodos durante 7 días.

En consonancia con la distribución de los aislados obtenida en la primera parte del estudio (figura 4.1), se observa una mayor proporción de aislados en los CEVS virulentos. Particularmente, el 42.9% y el 32.4% pertenecieron a los CEVS 4 y 5 respectivamente, por tanto, un 75.3% de los aislados de la colección se consideraron virulentos. El 7.6% de los aislados se agruparon en el CEVS 3; y en menor medida, con una proporción del 17.1%, los aislados se clasificaron como no virulentos, perteneciendo el 7.6% al CEVS 1 y el 9.5% al CEVS 2.

#### 4.7 Letalidad de *Pseudomonas aeruginosa* en función de su perfil de resistencia y del genotipo del SST3.

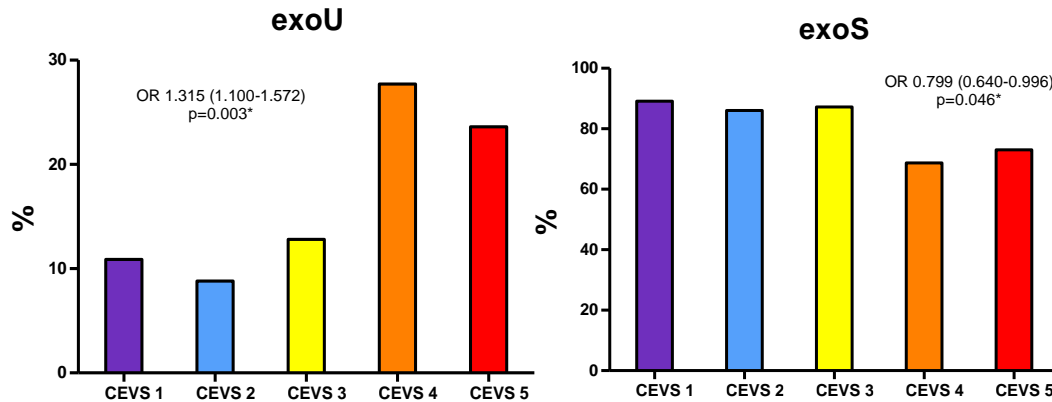
Dado que en el análisis inicial se observó una clara correlación entre la resistencia de *P. aeruginosa* y la virulencia en el modelo de *C. elegans*, evaluamos si dicha correlación seguía manteniéndose en los aislados procedentes de la cohorte de bacteriemias (figura 4.13). En este contexto, del total de aislados un 45.2% mostraron un perfil resistente, de los cuales un 33.7% presentaron un fenotipo MDR y un 11.5% un perfil XDR. Al igual que en el estudio anterior, se observó una proporción significativamente mayor de aislados no virulentos dentro de estos grupos (CEVS 1 y 2). Concretamente, el perfil MDR presentó un 56% de aislados no virulentos frente al 26.5% que sí lo fueron, y el perfil XDR un 27% de aislados no virulentos respecto al 5.4% (tabla 4.4). Además, estos perfiles mostraron un OR de 0.655 ( $p < 0.001$ ) y 0.523 ( $p < 0.001$ ), respectivamente, indicando una correlación negativa y significativa con los CEVS 4 y 5, y por tanto con la virulencia. Por el contrario, el perfil sensible (no-MDR) que incluye las categorías MultiS y ModR, mostró un OR de 1.547 ( $p < 0.001$ ), es decir, una asociación significativa y positiva con dichos CEVS, y en consecuencia con la virulencia.



**Figura 4.13.** Distribución del CEVS según los perfiles de sensibilidad (No-MDR, MDR, XDR). Para determinar el Odds Ratio (IC 95%) y estudiar la relación con la virulencia, se utilizó el perfil de resistencia como variable dependiente. Se consideraron estadísticamente significativos valores de \* $p$ -valor  $< 0.05$ .

Por consiguiente, se constató una correlación inversa entre la ganancia de resistencias y la pérdida de la eficacia biológica y virulencia bacterianas, en consonancia con la literatura (Hwang & Yoon, 2019; Kaiser *et al.*, 2017; Gómez-Zorrilla *et al.*, 2016; Abdelraouf *et al.*, 2011). La disminución de los factores de virulencia en las cepas MDR/XDR, se asemeja al fenotipo de las cepas adaptadas a infecciones crónicas, pudiendo permitirles el éxito en las infecciones (Mulet *et al.*, 2013). Además,

recientemente se ha demostrado que las cepas XDR son más sensibles al suero humano que las cepas sensibles, lo que conlleva también una virulencia menor en el huésped (Kaiser *et al.*, 2017) corroborando los resultados obtenidos.



**Figura 4.14.** Distribución de los genes *exoU*<sup>+</sup> y *exoS*<sup>+</sup> en los distintos CEVS. Para determinar el Odds Ratio (IC 95%) y estudiar la relación con la virulencia, utilizamos la presencia de las exoproteínas como variable dependiente. Se consideraron estadísticamente significativos valores de \**p*-valor<0.05.

Aunque la elevada mortalidad asociada a *P. aeruginosa* se deba a razones multifactoriales, probablemente la virulencia intrínseca desempeñe un papel importante (Schulert *et al.*, 2003). Entre los factores de virulencia establecidos y tal como se ha determinado en los apartados previos, destaca el SST3 en particular la exotoxina ExoU. Siguiendo las líneas del análisis previo, la exoproteína ExoS (*exoU*<sup>-</sup>/*exoS*<sup>+</sup>), en esta colección se detectó en una mayor proporción de aislados en comparación con la toxina ExoU (*exoU*<sup>+</sup>/*exoS*<sup>-</sup>), hallándose estas en el 68.4% y 20.6% de las cepas, respectivamente. Además, tal y como se puede apreciar en la figura 4.14, los aislados con presencia de *exoU* mostraron una relación positiva con la virulencia presentando un OR de 1.315 (*p*<0.003), siendo significativamente más frecuentes entre los CEVS 4-5 encontrándose en el 25.1% de los aislados, mientras que en los CEVS 1-2 se hallaron únicamente el 9.9%. Por el contrario, la presencia de *exoS* mostró un efecto negativo con la misma, presentando un OR de 0.799 (*p*>0.056), siendo significativamente más frecuente entre los CEVS 1-2 que en los CEVS 4-5, documentándose en el 87% y 71.3%, respectivamente. Estos datos se encuentran en consonancia con los resultados obtenidos y con diversos estudios en los que demuestran que *exoU* se encuentra involucrado en la patogenicidad de *P. aeruginosa* (Medina-Rojas *et al.*, 2020; Recio *et al.*, 2018; Aditi *et al.*, 2017; Peña *et al.*, 2015).

#### **4.8 Clones de alto riesgo XDR: Impacto del fenotipo de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* en el desenlace de las infecciones por bacteriemia.**

Dada la importancia de los clones de alto riesgo en el entorno clínico, en este trabajo además de investigar la interacción entre la resistencia y la virulencia en el modelo de *C. elegans*, profundizamos en el estudio de la patogenicidad de los clones de alto riesgo más prevalentes y diseminados en el territorio nacional ST111, ST175 y ST235 (Oliver *et al.*, 2015).

En el estudio del cual procede esta colección determinaron que la gran mayoría de cepas que presentaron un perfil de resistencia XDR, mostraron un secuenciotipo relacionado con los clones de alto riesgo. Concretamente, de 81 aislados XDR, 61 pertenecieron al clon ST175, 9 al clon ST111, 2 al clon ST235 y 2 al ST244 (Peña *et al.*, 2015). En el presente trabajo, el estudio del impacto de la virulencia de estos clones en *C. elegans*, puso de manifiesto, tal y como se ha informado en los apartados anteriores (Figura 4.7 y 4.8), que el clon de alto riesgo ST175 XDR más prevalente, se asoció en gran medida a aislados no virulentos (CEVS 1 y 2) hallándose en el 70.5% de los mismos, mientras que los clones ST111 y ST235 se detectaron únicamente en las cepas virulentas ( $p < 0.0001$ ) (tabla 4.4). Dicha disminución de virulencia del clon ST175 fue detectada previamente en un modelo murino, en cual el único clon capaz de causar mortalidad fue el ST235 (Gómez-Zorrilla *et al.*, 2016). Asimismo, estos hallazgos han sido corroborados por estudios recientes en los cuales la disminución de virulencia del ST175 contrasta con la capacidad de los clones ST111 y ST235 de producir mortalidad en el modelo de *C. elegans* (Fernández-Cuenca *et al.*, 2020; Recio *et al.*, 2020)

No obstante, a pesar de mostrar una reducción en la virulencia (siendo más frecuente entre los aislados no virulentos); la mortalidad a los 30 días fue significativamente mayor en individuos infectados con el clon ST175, afectando a un 44.3% de los pacientes, respecto aquellos infectados con el resto de los clones de alto riesgo, los cuales afectaron a un 15% ( $p = 0.031$ ) (tabla 4.5). Este efecto probablemente se deba al retraso en la administración de una terapia antibiótica adecuada (Urzedo *et al.*, 2020; Rossi Gonçalves *et al.*, 2017; Peña *et al.*, 2013) y a la baja prevalencia del clon ST235 en esta colección, ya que se encuentra asociado a numerosos brotes en todo el mundo y a una evolución particularmente desfavorable (Aditi *et al.*, 2017; Peña *et al.*, 2015; Edelstein *et al.*, 2013; Maatallah *et al.*, 2011). De hecho, estudios recientes han determinado que mortalidad a los 30 días fue mayor en pacientes infectados con el clon

ST235 que en aquellos infectados con el clon ST175 (Recio *et al.*, 2018; Viedma *et al.*, 2009). Es posible que un aumento en la prevalencia de este clon hubiese establecido un impacto significativamente mayor en la mortalidad de las cepas MDR/XDR (Peña *et al.*, 2015).

Clones de alto riesgo	No virulentos	Virulentos	p-valor
ST175 (n=44)	31 (70.5%)	13 (29.5%)	<0.001*
Otros ST XDR (n=19)	0	19 (100%)	

**Tabla 4.4.** Análisis univariante de la relación de los clones de alto riesgo con el fenotipo de virulencia de *P. aeruginosa* en *C. elegans*. Se consideró \*p-valor<0.05 estadísticamente significativo.

Clones de alto riesgo	Vivos	Fallecidos	p-valor
ST175 (n=61)	34 (55.7%)	27 (44.3%)	0.031*
Otros ST XDR (n=20)	17 (85%)	3 (15%)	

**Tabla 4.5.** Análisis univariante de la relación de los clones de alto riesgo con la mortalidad en pacientes a los 30 días. Se consideró \*p-valor<0.05 estadísticamente significativo.

#### 4.9 Efecto de la virulencia en *Caenorhabditis elegans* en las características de las infecciones por bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa*.

A pesar de las mejoras en la atención médica, la bacteriemia sigue siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad (Angus & Van Der Poll, 2013; Hattemer *et al.*, 2013). Comprender los factores subyacentes del huésped y el patógeno responsables de la gravedad y la mortalidad de las infecciones por *P. aeruginosa* es de suma importancia (Juan *et al.*, 2017). Dada la relación entre los determinantes de virulencia y resistencia en esta colección, y con el fin de determinar el impacto del fenotipo de virulencia de *P. aeruginosa* en *C. elegans* en las características clínicas y el desenlace de la infección en pacientes con bacteriemia, evaluamos la relación entre los diferentes parámetros clínicos y el grado de virulencia establecida (CEVS) (tabla 4.6).

Variables	No virulentos (CEVS 1 y 2) (n=101)	Virulentos (CEVS 4 y 5) (n=446)	p-valor
Sexo masculino	76 (75.2)	291(65.2)	0.078
Edad (media±DS)	64.2±16.3	65.1±17.0	0.624
Mortalidad tardía 30días (n=175)	29(28.7)	127(28.50)	1
Mortalidad temprana 5días (n=88)	18(17.8)	70(15.7)	0.653
Inmunosupresión (n=152)	33(32.7)	102(22.9)	0.042*
Neutropenia (n=32)	7(6.9)	23(5.2)	0.470
Estancia en UCI (n=162)	31(30.7)	116(26)	0.384
Puntuación SAPS (media±DS)	44.4±19.8	43.6±17.3	0.269
Índice de Charlson (mediana (RIQ))	2(1-4)	3(1-4.25)	0.603
<b>Exotoxinas del SST3</b>			
<i>exoU</i> (n=128)	10(9.9)	112(25.1)	<0.001*
<i>exoS</i> (n=446)	88(87.1)	318(71.3)	0.004*
<b>Adquisición</b>			
Nosocomial (n=343)	59(58.4)	260(58.3)	1
Relacionados asist. sanitaria (n=220)	41(40.6)	161(36.1)	0.425
Comunidad (n=29)	1(1)	25(5.6)	0.065
<b>Fenotipo <i>P. aeruginosa</i></b>			
Sensible (no-MDR) (n=369)	43(43)	326(73.4)	<0.001*
Multirresistente (MDR) (n=174)	56(56)	118(26.5)	<0.001*
Extremadamente resistente (XDR) (n=51)	27(27)	24(5.4)	<0.001*
<b>Enfermedades de base</b>			
Diabetes (n=160)	31(30.1)	112(25.1)	0.260
Enfermedad pulmonar crónica (n=87)	10(9.9)	68(15.2)	0.207
Enfermedad cardíaca (n=110)	15(14.9)	82(18.4)	0.472
Neoplasia sólida (n=172)	32(31.7)	128(28.7)	0.547
Neoplasia hematológica (n=92)	16(15.8)	65(14.6)	0.787
Insuficiencia renal crónica (n=97)	24(23.8)	59(13.2)	0.013*
Enfermedad neurológica crónica (n=43)	3(3)	35(7.8)	0.086
Cirrosis (n=28)	4(4)	21(4.7)	1
<b>Origen bacteriemia- Alto riesgo</b>			
Desconocido (n=163)	28(27.7)	121(27.1)	0.902
Tracto respiratorio (n=67)	17(16.8)	45(10.1)	0.058
Abdominal (n=25)	3(3)	21(4.7)	0.595
Tejidos blandos (n=20)	1(1)	16(3.6)	0.335
Otros (n=12)	2(2)	9(2)	1
<b>Origen bacteriemia- Bajo riesgo</b>			
Catéter vascular (n=118)	17(16.8)	92(20.6)	0.490
Tracto urinario (n=166)	27(26.7)	119(26.7)	1
Pancreaticobiliar (n=33)	6(5.9)	23(5.2)	0.805
<b>Presentación clínica</b>			
Puntuación de Pitt (mediana (RIQ))	2(1-4)	1(0-3)	0.036*
Shock inicial (n=115)	24(23.8)	84(18.8)	0.261
SDMO inicial (n=63)	17(16.8)	41(9.2)	0.024*
Shock/SDMO a las 48h (n=124)	29(28.7)	87(20)	0.047*
<b>Terapia</b>			
Empírica (n=293)	91(90.1)	408(91.5)	0.697
Definitiva (n=365)	78(77.2)	363(81.6)	0.329

**Tabla 4.6.** Características de los pacientes con infección del torrente sanguíneo por *P.aeruginosa* relacionadas con la virulencia en el modelo *C. elegans*. Los datos se presentan como n (%) a menos que se especifique lo contrario. Se considera estadísticamente significativo \**p*-valor<0.05.

Los resultados reflejan que el fenotipo de virulencia de las cepas en *C. elegans* no tuvo un impacto significativo para la mayoría de los parámetros estudiados, incluyendo las mortalidades temprana (mortalidad a 5 días) y tardía (mortalidad a 30 días). Sin embargo, sí que se observó una asociación entre los fenotipos no virulentos y ciertas características clínicas, tales como, un índice de Pitt elevado (2 (1-4) respecto 1 (0-3),  $p=0.036$ ), inmunosupresión del paciente (32.7% respecto 22.9%,  $p=0.042$ ), SDMO inicial (16.8% respecto 9.2%,  $p=0.024$ ) y shock/Síndrome Disfunción multiorgánica (SDMO) a las 48h (28.7% respecto 20.0%,  $p=0.047$ ), e insuficiencia renal crónica (23.8% respecto 13.2%,  $p=0.013$ ). A pesar de no alcanzar la significación estadística, identificamos una tendencia hacia la asociación entre los fenotipos virulentos (CEVS 4 y 5) e infecciones adquiridas en la comunidad (1% respecto 5.6%,  $p=0.065$ ), mientras que los fenotipos no virulentos (CEVS 1 y 2) mostraron una cierta asociación con las infecciones de origen respiratorio (16.8% respecto 10.1%,  $p=0.058$ ). Esta asociación entre el fenotipo virulento y las infecciones adquiridas en la comunidad fue reportada también en la infecciones por el clon ST131 de *Escherichia coli* (Ciesielczuk *et al.*, 2015). El hecho de que los fenotipos no virulentos se asociasen con este tipo de afecciones es de gran relevancia, ya que sugiere que este tipo de aislados infectan a individuos con peor pronóstico, tal vez procedentes del ambiente hospitalario, mientras que los aislados con fenotipo virulento tienden a infectar a individuos sanos, probablemente procedentes de la comunidad. Así lo describe también Alonso y su equipo (Alonso *et al.*, 2020), que determinaron que las cepas procedentes de neumonías asociada a ventilación, fueron menos virulentas que aquellas procedentes de otras fuentes. En consonancia con esta hipótesis, como se ha mencionado previamente, el clon de alto riesgo más frecuente, (ST175), se asoció con fenotipos de baja virulencia pero con una mayor mortalidad tardía por infecciones del torrente sanguíneo.

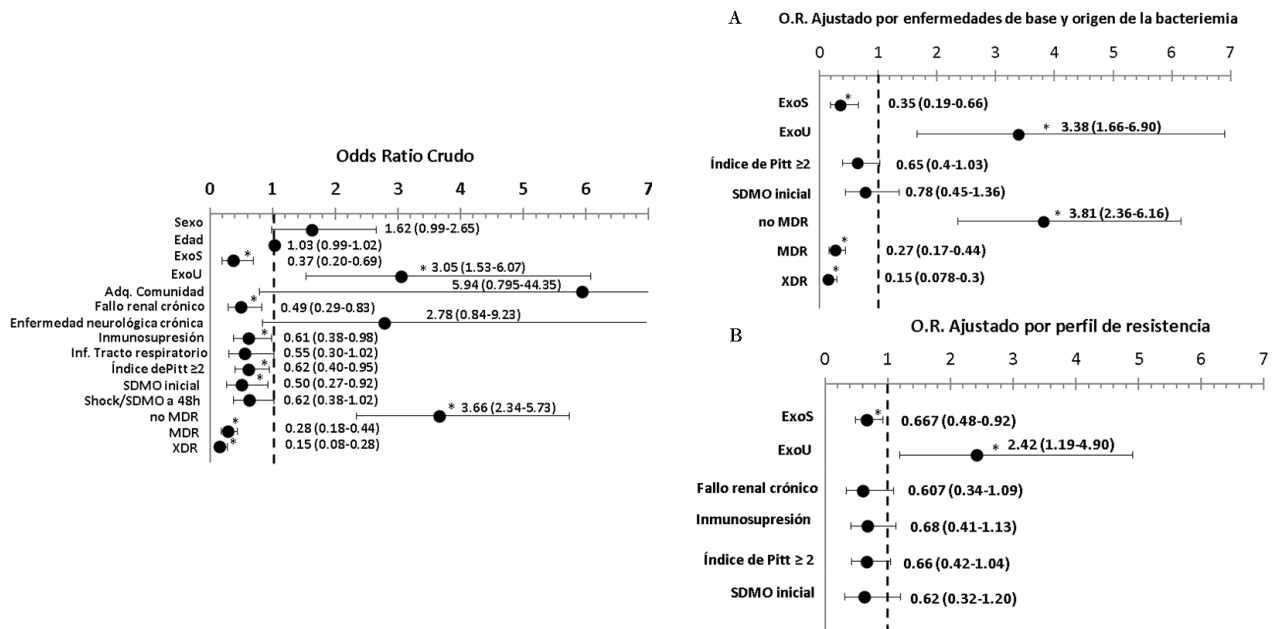
A partir del análisis estadístico realizado mediante regresión logística simple, se determinó la relación, positiva o negativa, entre las variables bacterianas (SST3, perfil de resistencia), las características clínicas, y la virulencia de *P. aeruginosa* (figura 4.15). Los resultados obtenidos mostraron (Odds Ratio Crudo y significación) que estaban asociados de manera positiva y significativa con la virulencia, los aislados con presencia de la exotoxina ExoU (*exoU*<sup>+</sup>/*exoS*) (OR=3.05,  $p=0.001$ ) y los perfiles de resistencia no MDR (MuliS y ModR) (OR=3.66,  $p<0.001$ ). Mientras que los aislados con presencia de ExoS (*exoU*<sup>-</sup>/*exoS*<sup>+</sup>) (OR=0.37,  $p=0.002$ ), los perfiles de resistencia MDR y XDR (OR=0.28,  $p<0.001$  y OR=0.15,  $p<0.001$ ), valores mayores o igual a dos en el índice de



Pitt (OR=0.62, p=0.029), insuficiencia renal crónica (OR=0.49, p=0.01), SDMO inicial (OR=0.50, p=0.027), y la presencia de inmunosupresión (OR=0.61, p=0.04), mostraron una asociación negativa y significativa con la virulencia (figura 4.15).

Debido a que la edad, el sexo, las enfermedades de base y el origen de infección de la bacteriemia pueden influir en el desenlace de la infección por bacteriemia, se realizó un análisis multivariante ajustado por dichos factores, a fin de hallar, aquellos relacionados con la virulencia de *P. aeruginosa* teniendo en cuenta el resto de variables (figura 4.15A). Los factores predictivos que estaban asociados de forma negativa e independiente con la virulencia fueron, la presencia del gen *exoS* (*exoU*<sup>-</sup>/*exoS*<sup>+</sup>) (OR=0.35, p=0.001) y los perfiles MDR y XDR (OR 0.27, p<0.001 y OR=0.15, p<0.001); por el contrario, la presencia del gen *exoU* (*exoU*<sup>+</sup>/*exoS*<sup>-</sup>) (OR=3.38, p=0.001), y los perfiles no MDR (OR=3.81, p<0.001), lo hicieron de manera independiente y positiva.

Para garantizar que el perfil de resistencia no estuviese asociado de manera dependiente a la mortalidad, se realizó el análisis ajustado por esta variable (figura 4.15B). Los resultados mostraron que la presencia del gen *exoS* (*exoU*<sup>-</sup>/*exoS*<sup>+</sup>) se asoció de forma negativa con la virulencia (OR=0.667, p=0.016), mientras que la presencia del gen *exoU* (*exoU*<sup>+</sup>/*exoS*<sup>-</sup>) se asoció de forma positiva (OR=2.42, p=0.014), ambos de manera independiente.



**Figura 4.15.** Representación de los valores de Odds Ratio crudo para las variables asociadas con virulencia. Se empleó el CEVS como variable dependiente, clasificada en aislados virulentos (CEVS 4-5) y no virulentos (CEVS 1-2). **A)** Odds Ratio ajustado por enfermedades de base y origen de la bacteriemia; **B)** Odds Ratio ajustado por el perfil de resistencia. Se considero \**p*-valor<0.05 estadísticamente significativo.



#### **4.10 Relación entre la virulencia en *Caenorhabditis elegans* y la mortalidad en pacientes por bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa*.**

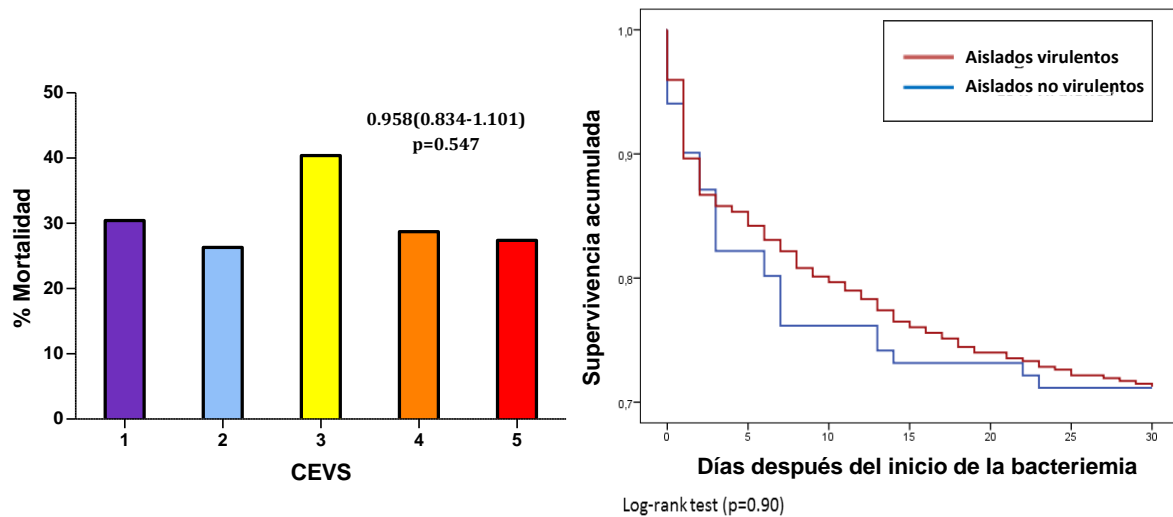
A fin de evaluar el valor predictivo de la letalidad de *P. aeruginosa* en *C. elegans* como indicador pronóstico de la mortalidad en pacientes por infecciones del torrente sanguíneo, en el análisis se incluyó la virulencia producida por *P. aeruginosa* en el modelo de *C. elegans* como posible variable asociada con la mortalidad. Ésta se reflejó como virulencia general (virulencia/CEVS), así como separada en los distintos niveles del sistema de puntuación utilizado (CEVS1-5) (tabla 4.7).

Como se ha demostrado en estudios previos (Peña *et al.*, 2015; Peña *et al.*, 2013), las variables asociadas estadísticamente con la mortalidad fueron, la presencia de neutropenia, cirrosis, neoplasia hematológica, inmunosupresión, el índice de Pitt, las bacteriemias de origen desconocido o respiratorio, la estancia en UCI, las cepas con perfil de resistencia MDR y XDR, así como la edad de los pacientes con un *p*-valor inferior a 0.05. Datos que han sido corroborados recientemente por Recio y colaboradores en dos colecciones de bacteriemia por *P. aeruginosa* (Recio *et al.*, 2020; Recio *et al.*, 2018), así como por Urzedo y Rossi Gonçalves y colaboradores que indican como variables asociadas a la mortalidad por bacteriemia el origen desconocido (Urzedo *et al.*, 2020) y urinario (Gonçalves *et al.*, 2017) de la misma. Por el contrario, los perfiles no-MDR, el origen urinario como fuente de bacteriemia y el catéter vascular se asociaron negativamente con la mortalidad.

La tasa de mortalidad reveló que en total fallecieron el 29% de los pacientes, y que de éstos, el 53.3% lo hicieron en los 5 primeros días desde el inicio de la bacteriemia (mortalidad temprana), pero tal y como se ha mencionado previamente, ni la mortalidad temprana ni la tardía se asociaron a la infección con cepas virulentas. Además, tampoco se observó una asociación entre la mortalidad de los pacientes (variable dependiente) y el CEVS (la figura 4.16A), ni en la supervivencia acumulada en 30 días después de la infección en función del fenotipo de virulencia de *P. aeruginosa* en *C. elegans* (figura 4.16B). Todo ello indica, que el fenotipo de virulencia bacteriana no tuvo un papel importante en la mortalidad de las infecciones por bacteriemia, indicando que el valor predictivo de la letalidad en *C. elegans* no es un buen marcador pronóstico en el desenlace de estas infecciones.

Variables	Vivos (n=418)	Fallecidos (n=175)	p-valor
Sexo masculino	286(68.4)	117(66.9)	0.772
Edad (media±DS)	63.7±17.0	68.3±15.6	0.002*
Estancia en UCI	101(24.2)	57(32.6)	0.041*
Puntuación SAPS (media±DS)	39.9±16.6	49.1±18.6	0.002*
Índice de Charlson (mediana (RIQ))	2(1-4)	3(2-5)	<0.001*
Inmunosupresión	86(20.6)	66(37.7)	<0.001*
Neutropenia	16(3.8)	16(9.1)	0.015*
<b>Virulencia <i>P.aeruginosa</i></b>			
CEVS (media±DS)	3.88±1.26	3.95±1.25	0.470
Virulencia	345(82.7)	146(83.4)	0.905
CEVS 1	31(7.4)	14(8)	0.865
CEVS 2	41(9.8)	15(8.6)	0.758
CEVS 3	26(6.2)	19(10.9)	0.062
CEVS 4	136(32.6)	56(32)	0.924
CEVS 5	183(43.9)	71(40.6)	0.468
<b>Exotoxinas del SST3</b>			
<i>exoU</i>	94(22.5)	34(19.4)	0.445
<i>exoS</i>	312(74.6)	134(76.6)	0.251
<b>Adquisición</b>			
Nosocomial	238 (56.9)	106(60.6)	0.466
Relacionados asist. Sanitaria	158(37.8)	62(35.4)	0.641
Comunidad	22(5.3)	7(4)	0.677
<b>Fenotipo <i>P. aeruginosa</i></b>			
Sensible (no-MDR)	287(69.2)	103(58.9)	0.017*
Multirresistente (MDR)	127(30.5)	72(41.1)	0.013*
Extremadamente resistente (XDR)	39(9.4)	29(16.6)	0.016*
<b>Enfermedades de base</b>			
Diabetes (n=160)	108(25.8)	51(29.1)	0.417
Enfermedad pulmonar crónica (n=87)	53(12.7)	33(18.9)	0.056
Enfermedad cardíaca (n=110)	74(17.7)	35(20)	0.561
Neoplasia sólida (n=172)	120(28.7)	50(28.6)	1
Neoplasia hematológica (n=92)	46(11)	44(25.1)	<0.001*
Insuficiencia renal crónica (n=97)	67(16)	28(16)	1
Enfermedad neurológica crónica (n=43)	29(6.9)	14(8)	0.729
Cirrosis (n=28)	13(3.1)	16(9.1)	0.003*
<b>Origen bacteriemia- Alto riesgo</b>			
Desconocido (n=163)	92(22)	69(39.4)	<0.001*
Tracto respiratorio (n=67)	32(7.7)	33(18.9)	<0.001*
Abdominal (n=25)	20(4.8)	5(2.9)	0.373
Tejidos blandos (n=20)	11(2.6)	9(5.1)	0.137
Otros (n=12)	9(2.2)	3(1.7)	1
<b>Origen bacteriemia- Bajo riesgo</b>			
Catéter vascular (n=118)	94(22.5)	21(12)	0.003*
Tracto urinario (n=166)	134(32)	28(16)	<0.001*
Pancreaticobiliar (n=33)	28(6.7)	5(2.9)	0.076
<b>Presentación clínica</b>			
Puntuación de Pitt (mediana (RIQ))	2(0-4)	4(2-6)	<0.001*
Shock inicial (n=115)	57(13.6)	58(33.1)	<0.001*
SDMO inicial (n=63)	20(4.8)	43(24.6)	<0.001*
Shock/SDMO a las 48h (n=124)	34(8.2)	90(54.2)	<0.001*
<b>Terapia</b>			
Empírica (n= 316)	385(92.1)	159(90.9)	0.625
Definitiva (n=398)	328(84.5)	82(88.2)	0.42

**Tabla 4.7.** Características de los pacientes con infección en el torrente sanguíneo por *P.aeruginosa* de acuerdo con la mortalidad a los 30 días. Los datos se presentan como n° (%) a menos que se especifique lo contrario. Se consideró estadísticamente significativo \*p-valor<0.05.



**Figura 4.15.** A) Correlación entre la mortalidad en pacientes con infección por bacteriemia por *P. aeruginosa* y virulencia en *C. elegans* (CEVS). Se indican el OR (IC 95%) y la significación estadística. B) Supervivencia acumulada a los 30 días de infección por bacteriemia por *P. aeruginosa* según el fenotipo de virulencia en *C. elegans* (baja/alta virulencia). Las curvas de supervivencia se construyeron mediante el método Kaplan-Meier y para estimar el riesgo de muerte según el fenotipo de virulencia, la prueba de log-rank.

Los factores que podrían explicar esta falta de impacto podrían ser: la correlación inversa entre la virulencia y los fenotipos MDR, ya que estos fenotipos se asocian con una mayor mortalidad a los 30 días, como consecuencia posiblemente del retraso en el tratamiento antimicrobiano apropiado para tratar la infección (Peña *et al.*, 2015; Peña *et al.*, 2013; Peña *et al.*, 2012). No obstante, incluso después de haber ajustado por el perfil de resistencia con el propósito de descartar esta posibilidad, el fenotipo de virulencia no mostró un impacto ni en la mortalidad a los 30 días (tardía), ni en la mortalidad a los 5 días (temprana), aunque en esta última las cepas virulentas estuviesen asociadas al genotipo *exoU* positivo (*exoU*<sup>+</sup>/*exoS*<sup>-</sup>) relacionado a este tipo de mortalidad (Peña *et al.*, 2015). Otro factor a tener en cuenta es la baja proporción de aislados con fenotipo no virulento (20%), puesto que esta limitación probablemente redujo la posibilidad de demostrar un impacto importante de la virulencia en el desenlace de estas infecciones.

El modelo de *C. elegans* ha demostrado ser útil en este y en muchos otros trabajos basados en la identificación de factores de virulencia de *P. aeruginosa*, como la producción de pigmentos (Kang & Kirienko, 2020; Feinbaum *et al.*, 2012), el QS (Feinbaum *et al.*, 2012), el SST3 (Miyata *et al.*, 2003), mutaciones que afectan a la resistencia y a los factores virulencia (Sanz-García *et al.*, 2019), etc. Además, como modelo presenta múltiples ventajas; es un ser de pequeño tamaño, tiene un bajo coste y fácil mantenimiento, tiene un tiempo de generación rápido. En general, es una buena alternativa a modelos mamíferos, no tiene limitaciones éticas, y además su sistema

inmune innato es similar al de los mamíferos (Sheehan *et al.*, 2018). Sin embargo, como modelo también tiene sus limitaciones y es imperfecto (López Hernández *et al.*, 2015). Una de las desventajas que presenta, es que la experimentación no se puede realizar a 37°C, temperatura óptima del patógeno de estudio. Aunque su sistema inmune innato tenga similitudes a las de los humanos, presenta diferencias significativas en los procesos y componentes de cada respuesta (Sheehan *et al.*, 2018). Además, debido a su pequeño tamaño, el método de infección utilizado, impide saber si la muerte producida en el modelo se debe a toxicidad/invasión de *P. aeruginosa*, o a la inanición debido al comportamiento de aversión producido frente a los patógenos (Ballestriero *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2005). Asimismo, debemos considerar que no todos los resultados obtenidos en un modelo animal en la investigación preclínica se extrapolarán con éxito a los seres humanos, ya que como se ha mencionado, existen diferencias genéticas, fisiológicas, anatómicas, y moleculares entre las distintas especies (López Hernández *et al.*, 2015; Fuchs *et al.*, 2009).

Por tanto, la realización de otros estudios con aislados procedentes de otras fuentes y que usen otros modelos invertebrados, podría en primer lugar, corroborar si la gran proporción de aislados virulentos observada en esta colección es característica de las infecciones del torrente sanguíneo, y en segundo lugar, proporcionar un mayor conocimiento en el uso potencial de estos modelos como indicadores pronósticos en infecciones por *P. aeruginosa*.

## CAPITULO II

Estudio de la virulencia de  
*Pseudomonas aeruginosa* en el  
modelo *Galleria mellonella*



Al igual que en la primera parte de este trabajo, se analizó en *C. elegans* la interacción entre los clones de alto riesgo y los factores de resistencia y virulencia de *P. aeruginosa*, para poder evaluar posteriormente el valor predictivo de este modelo como indicador pronóstico en las bacteriemias producidas por este patógeno. En este trabajo también se quiso evaluar dicho impacto en el modelo *Galleria mellonella*, de modo que, este capítulo incluirá el estudio de la virulencia de los 140 aislados de *P. aeruginosa* del inicio del trabajo, con el propósito de estudiar la interacción entre los factores mencionados, para finalmente, evaluar también el valor predictivo de *G. mellonella* como indicador pronóstico en el desenlace de estas infecciones.

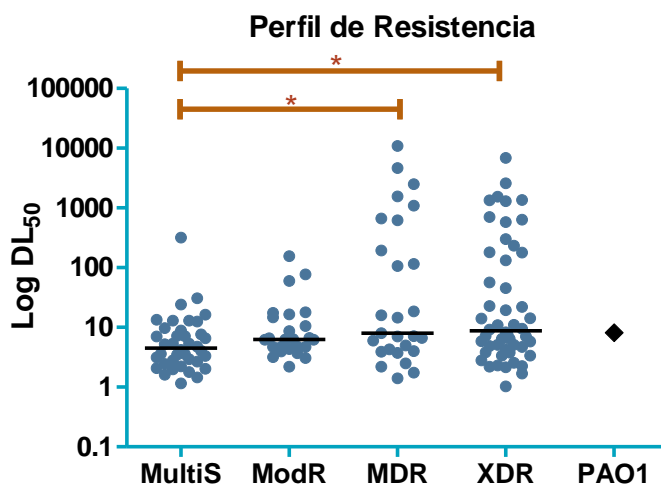
#### **4.11 Relación entre el origen, el perfil de resistencia y la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* en el modelo de *Galleria mellonella*.**

Tal y como se ha ido desarrollando a lo largo de este trabajo, la adquisición de resistencias se asocia a una disminución de la eficacia biológica y de la virulencia bacteriana (Hwang & Yoon, 2019; Kaszab *et al.*, 2019; Pérez-Gallego *et al.*, 2016). Comprender esta asociación es de suma importancia para poder realizar un mejor el análisis de las infecciones. Dada esta circunstancia y que existe una asociación entre la resistencia y la virulencia (Kaszab *et al.*, 2019; Gómez-Zorrilla *et al.*, 2016), se estudió la relación de los mismos en el modelo *G. mellonella*.

*P. aeruginosa* ha demostrado ser un patógeno altamente virulento en el modelo de infección *G. mellonella*. La  $DL_{50}$  de las cepas de referencia PA14 y PAO1 se encuentran entre 1 y 10 UFC (dependiendo de las condiciones experimentales), cuando se inyectan en la hemolinfa de las larvas, provocando la muerte de éstas en 24h (Pérez-Gallego *et al.*, 2016; Beeton *et al.*, 2015; Miyata *et al.*, 2003; Jander *et al.*, 2000). En cambio, otros microorganismos como *Staphylococcus aureus* (Khader *et al.*, 2020) y *A. baumannii* (Grygorcewicz *et al.*, 2020) necesitan dosis muy superiores ( $10^5$ – $10^6$  UFC y  $>10^4$ , respectivamente). En el presente trabajo, como podemos ver en la figura 5.1 la  $DL_{50}$  de PAO1 se situó en torno a 8 UFC.

El impacto de la virulencia de *P. aeruginosa* en función de su perfil de resistencia está reflejado en la figura 5.1, donde las cepas MDR y XDR mostraron una mayor distribución de las dosis con  $DL_{50}$  elevadas, llegando a ser hasta 1000 veces superiores que la cepa de referencia. Mientras que las  $DL_{50}$  de las cepas con perfil MultiS y ModR,

fueron más bajas situándose en valores en torno a la cepa de referencia PAO1 (aproximadamente 8 UFC), siendo las cepas MultiS significativamente más virulentas que las cepas MDR/XDR. De modo que, se observó una relación inversa entre la resistencia y la virulencia de las cepas, al igual que se evidencia en la literatura científica (Hwang & Yoon, 2019; Kaszab *et al.*, 2019; San Millan *et al.*, 2018; Cabot *et al.*, 2018; Gómez-Zorrilla *et al.*, 2016; Mulet *et al.*, 2013; Abdelraouf *et al.*, 2011).



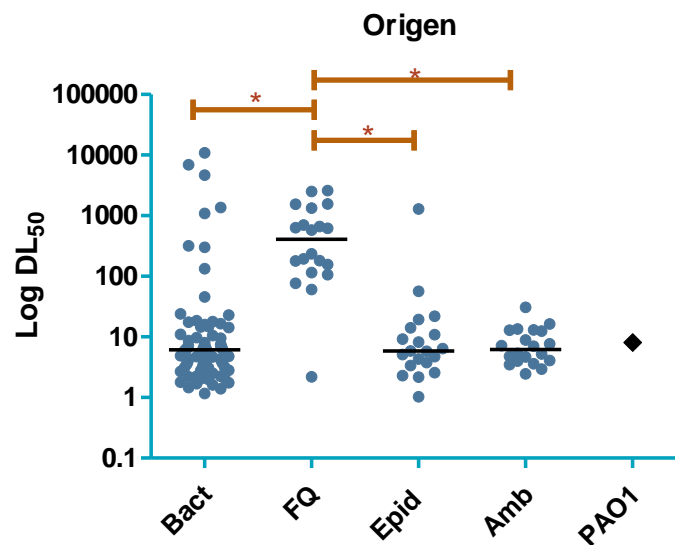
**Figura 5.1.** Distribución de las DL<sub>50</sub> de las cepas en función de su perfil de resistencia (MultiS, ModR, MDR, XDR). Análisis comparativos de los cuatro grupos mediante U de Mann-Whitney. Se consideraron significativos \**p*-valor<0.05. El valor de la cepa de referencia PAO1 se indica con un rombo negro.

Del mismo modo que se realizó en el modelo de *C. elegans*, nos planteamos la posibilidad de que hubiese una relación entre la virulencia y las diferentes fuentes de aislamiento.

La distribución de las DL<sub>50</sub> de *G. mellonella* en base al origen de aislamiento, se encuentra en la figura 5.2. Como se aprecia, las cepas ambientales con un 90% de cepas sensibles, como indicamos al inicio del trabajo, y las epidémicas, con un 100% de cepas MDR/XDR, fueron las que mostraron las DL<sub>50</sub> más bajas, situándose en dosis similares a la cepa de referencia PAO1. A estas le siguieron las cepas de bacteriemia, con un 50% de cepas MDR/XDR que, a pesar de que algunas presentasen DL<sub>50</sub> muy elevadas, la mayoría fueron similares a las ambientales y epidémicas. Finalmente, las procedentes de fibrosis quística con un 85% de aislados MDR/XDR, fueron las que mostraron un aumento significativo de la DL<sub>50</sub>, en el 95% de los aislados (todos a excepción de 1), respecto a las cepas procedentes del resto de fuentes (bacteriemia, epidémicas y ambientales), con un aumento de 10 a 100 veces la PAO1 (situada en torno a 8 UFC).



Estos datos están en consonancia con otros estudios que demuestran que los aislados procedentes del ambiente provocan una tasa de mortalidad elevada situada entre el 75-100% (Kaszab *et al.*, 2019), y que las cepas de FQ son menos virulentas que la cepa PAO1 en el modelo de *G. mellonella* (Geisinger & Isberg, 2017; Whiley *et al.*, 2014); debido a la adquisición de mutaciones que provocan un aumento de la resistencia (Geisinger & Isberg, 2017) y la capacidad reducida de establecer la infección, provocado por un crecimiento deficiente de la cepa y la eliminación por parte del huésped (Whiley *et al.*, 2014).



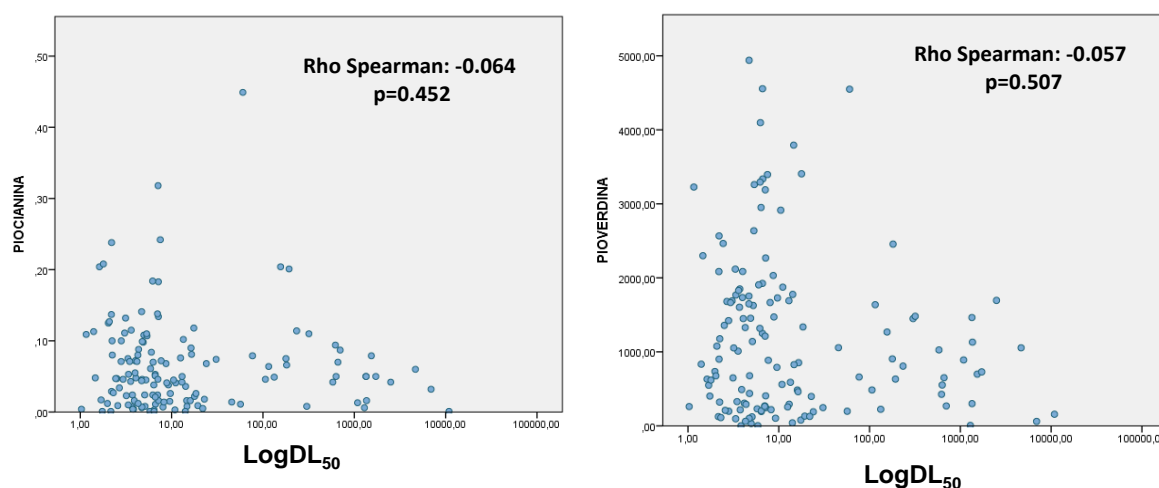
**Figura 5.2.** Distribución de las  $DL_{50}$  de las cepas en función del origen de aislamiento (Bact: Bacteriemia; FQ: Fibrosis quística; Epid: Epidémicas y Amb: Ambientales). Análisis comparativos de los cuatro grupos mediante *U* de Mann-Whitney. Se consideraron significativos \**p*-valor < 0.05. El valor de la cepa de referencia PAO1 se indica con un rombo negro.

La pérdida de virulencia de los aislados de FQ, podría atribuirse a la adaptación de estas cepas a la infección en el huésped, para ello pierden factores de virulencia y crecen de 2 a 3 veces más lento que las cepas de referencia (Head & Yu, 2004). Motivo por el cual no es sorprendente que los aislados de *P. aeruginosa* de pacientes con FQ con infección crónica sean menos virulentos que otras cepas de esta especie cuando se tratan en modelos animales de infección aguda (Hauser *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2006). Además, es posible que la pérdida de factores de virulencia junto a la capacidad reducida de establecer la infección debido al crecimiento deficiente, haya favorecido que el sistema inmune de *G. mellonella* elimine exitosamente a este patógeno (Whiley *et al.*, 2014).

#### 4.12 Repercusión de los determinantes de virulencia: producción de pigmentos, motilidad y SST3, en la letalidad de *Pseudomonas aeruginosa*.

Como se ha mencionado previamente, los pigmentos (piocianina y pioverdina), la motilidad (*swimming, swarming, twitching*) y el SST3, son determinantes de virulencia importantes en *P. aeruginosa* (Feinbaum *et al.*, 2012; Jarrell & McBride, 2008). Por lo que, con el fin de comprender el papel de estos mecanismos de virulencia en la patogenicidad de *P. aeruginosa* evaluamos la letalidad de los diversos aislados en *G.mellonella*.

La pioverdina es un pigmento que interviene en la captación del hierro y es necesario para establecer infecciones y formar biopelículas, (Kang *et al.*, 2019); y la piocianina es una fenazina que se encuentra involucrada en el daño de las células del huésped (Alonso *et al.*, 2020).



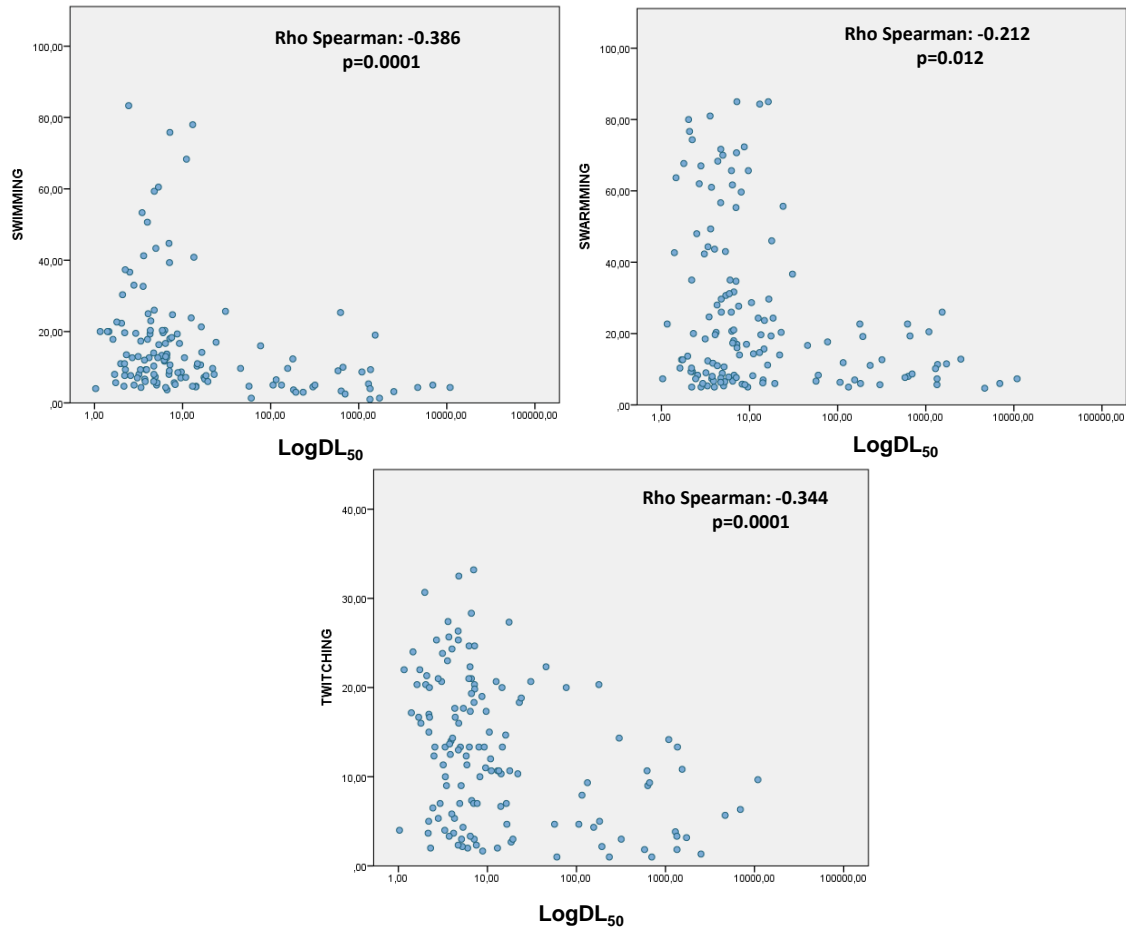
**Figura 5.3.** Correlación entre las producción de pigmentos (piocianina y pioverdina) y la DL<sub>50</sub> de *P.aeruginosa* en *G.mellonella*. Se utilizó el coeficiente de correlación de Rho Spearman y se consideró \**p*-valor<0.05 estadísticamente significativo.

Como vemos en la figura 5.3, en este trabajo no se observa una asociación entre la producción de dichos pigmentos y la virulencia en *G. mellonella*. A pesar de que estos resultados no corroboran el estudio de Harrison y colaboradores, en el que determinaron que las cepas productoras de pioverdina fueron más virulentas que sus mutantes isogénicos (Harrison *et al.*, 2006); se encuentra en consonancia con el estudio de Medina-Rojas (Medina-Rojas *et al.*, 2020) donde las cepas con elevada producción de piocianina y motilidad que carecían del SST3 fueron menos virulentas, que aislados con el mismo

fenotipo pero que contenían el sistema de secreción, demostrando que estos factores están involucrados en la virulencia de las cepas, pero no son esenciales (Medina-Rojas *et al.*, 2020). Siguiendo esta línea, se realizó un estudio con cepas asociadas y no asociadas a ventilación asistida (VAP y no-VAP), donde la virulencia de las mismas tampoco se asoció a la producción de piocianina ni pioverdina (Alonso *et al.*, 2020). Además, se ha revelado que aunque en aspectos generales la pioverdina produzca un aumento de la virulencia, la disponibilidad de este pigmento no es estrictamente predictiva de la virulencia, ya que la adición de pioverdina a niveles bajos en los ensayos de infección, redujo la mortalidad en *G. mellonella* en lugar de aumentarla (Weigert *et al.*, 2017). La falta de impacto de estos factores de virulencia, podría deberse a la acción del sistema inmune de *G. mellonella*, ya que es estructural y funcionalmente similar a la respuesta inmune innata de los mamíferos (Browne *et al.*, 2013), dado que la hemolinfa contiene hemocitos capaces de fagocitar los patógenos y producir superóxidos para eliminarlos (Bergin *et al.*, 2005; Renwick *et al.*, 2007), pudiendo hacer frente de una forma eficaz a la infección por *P. aeruginosa*.

Por otra parte, otro de los determinantes de virulencia estudiados, al igual que en el modelo de infección de *C. elegans*, fue la motilidad; una propiedad que poseen los microorganismos asociada a la colonización de nichos ambientales, adhesión a superficies y formación de biopelículas (Josenhans & Suerbaum, 2002). Por tanto, la presencia de estos factores contribuye a la virulencia de *P. aeruginosa*.

En este trabajo, los tres tipos de motilidad (*swimming*, *swarming* y *twitching*) se asociaron de forma negativa aunque leve con las dosis letales, revelando que el aumento de la motilidad se asocia con una disminución de las dosis letales, por tanto, con un aumento de la virulencia en *G. mellonella* (figura 5.4). Esta asociación puede deberse a la necesidad de *P. aeruginosa* de diseminarse la hemolinfa de *G. mellonella* para producir la infección (Josenhans & Suerbaum, 2002). Esta observación también fue propuesta por Kaszab y sus compañeros, los cuales determinaron que la motilidad *twitching* mostró una correlación significativa con la tasa de mortalidad en *G. mellonella*, además, indicaron que el papel de este tipo de motilidad puede ser reemplazada, al menos parcialmente, por las motilidades tipo *swimming* y/o *swarming* (Kaszab *et al.*, 2019). Asimismo, en el estudio realizado por Skiebe (Skiebe *et al.*, 2012), detectaron una atenuación de la virulencia en *G. mellonella* en mutantes deficientes en la motilidad en *Acinetobacter baumannii*. Incluso, estudios previos han relacionado la motilidad tipo *swarming* con la expresión del SST3 (Murray *et al.*, 2010), lo cual podría contribuir a la virulencia de *P. aeruginosa*.

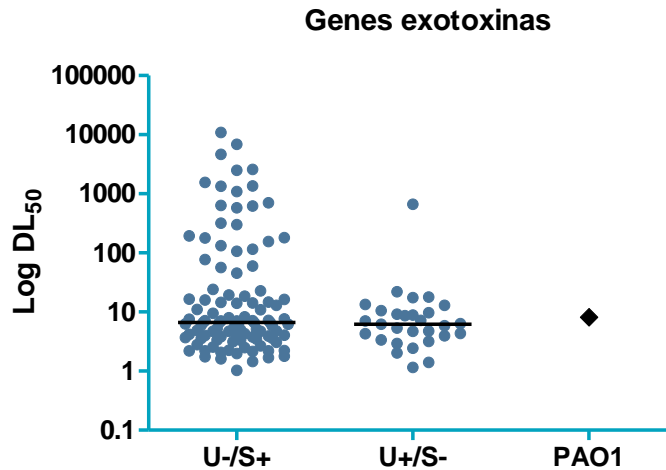


**Figura 5.4.** Correlación entre los distintos tipo de motilidad (*twitching*, *swarming*, *swimming*) y la DL<sub>50</sub> de *P. aeruginosa* en *G. mellonella*. Se utilizó el coeficiente de correlación de Rho Spearman. Se consideró \**p*-valor<0.05 estadísticamente significativo.

El SST3 encargado de inyectar potentes citotoxinas en el interior de las celular eucariotas, es uno de los factores de virulencia más destacados de *P. aeruginosa*. Especialmente la citotoxina *exoU*, la cual se asocia a peores pronósticos clínicos (Peña *et al.*, 2015; Recio *et al.*, 2020). El 20.7% de los aislados de este trabajo fueron positivos para *exoU* (*exoU*<sup>+</sup>/*exoU*<sup>-</sup>), y el 73.6% fueron positivos para *exoS* (*exoU*<sup>+</sup>/*exoU*<sup>-</sup>) y al igual que en el apartado inicial (modelo de *C. elegans*), se excluyeron del análisis las toxinas *exoT* y *exoY* por su presencia en el 99% y 93% de las cepas (figura 5.5).

Tal y como se puede observar en el gráfico, la presencia de *exoU* está relacionada en su mayoría con dosis letales bajas, cercanas a la de PAO1. A pesar de que no exista una significación, se podría observar una ligera diferencia respecto la presencia de *exoS*, en las que se observan unas dosis letales más diversas, aunque también es cierto que la cantidad de aislados que presentan *exoS* es mayor que los que presentan *exoU*. Con todo

ello, los resultados obtenidos indican que las exotoxinas no juegan una papel en la virulencia en el modelo de *G. mellonella*.



**Figura 5.5.** Distribución de las  $DL_{50}$  de las cepas en función de la presencia o ausencia de las toxinas del SST3 *exoS/exoU*. Análisis comparativos de los cuatro grupos mediante *U* de Mann-Whitney. Se consideraron significativos \**p*-valor < 0.05. El valor de la cepa de referencia PAO1 se indica con un rombo negro.

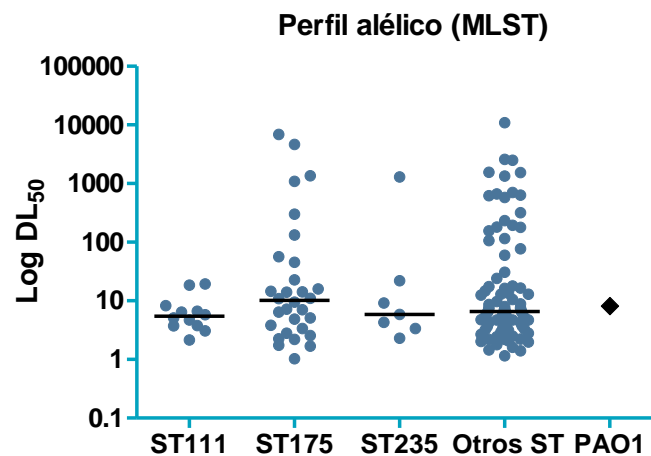
Aunque existen estudios que confirman el papel de las exotoxinas del SST3 en la virulencia en *G. mellonella* (Medina-Rojas *et al.*, 2020; Miyata *et al.*, 2003), los resultados obtenidos corroboran los de estudios recientes, en los que no se asocian de forma significativa con la virulencia. Un ejemplo de ello es el trabajo realizado por Allen y colaboradores (Allen *et al.*, 2020) en el que, a pesar de que los aislados que produjeron el SST3 fueron más virulentos que aquellos que no lo expresaron en un modelo murino; la diferencia en virulencia entre los aislados que expresaron las toxinas *exoS* o *exoU* no fue significativa, sugiriendo que las diferencias en la virulencia no pueden explicarse únicamente por la producción de los diferentes efectores del SST3. Siguiendo esta línea, según Kaszab (Kaszab *et al.*, 2019), la mortalidad de *G. mellonella* producida por *P.aeruginosa* de origen ambiental, no se correlacionó con la presencia o ausencia de diversos genes de virulencia, entre los que se encontraban *exoS* y *exoU*.

#### 4.13 Letalidad de los clones de alto riesgo principales ST111, ST175 y ST235 en el modelo de *Galleria mellonella*.

Como se ha ido desarrollando a lo largo de este trabajo, los clones de alto riesgo tienen una gran importancia en el entorno hospitalario debido a su asociación con un mal pronóstico clínico (Oliver *et al.*, 2015) y a la capacidad que poseen de acumular y diseminar resistencias (Woodford *et al.*, 2011). Con la finalidad de estudiar el impacto de estos clones en la virulencia de *P.aeruginosa*, evaluamos la letalidad de los mismos en el modelo de *G. mellonella*.

El 35% de la colección pertenecieron a los clones de alto riesgo, de los cuales 12 pertenecieron al clon ST111, 30 al ST175 y 7 al ST235. En la figura 5.6 se puede observar que los ST111 y ST235 mostraron dosis letales similares a PAO1, mientras que el clon ST175, pese no haber una diferencia significativa respecto al resto de clones, mostró una disminución de la virulencia. Por lo que respecta a los clones no pertenecientes a los principales de alto riesgo, una parte importante de las cepas exhibieron  $DL_{50}$  en torno la cepa PAO1.

Estos resultados se encuentran en consonancia con los obtenidos en estudios previos en un modelo murino (Gómez-Zorrilla *et al.*, 2016) y en *C. elegans* (Recio *et al.*, 2020), donde el ST235 mostró una virulencia mayor que el ST175.

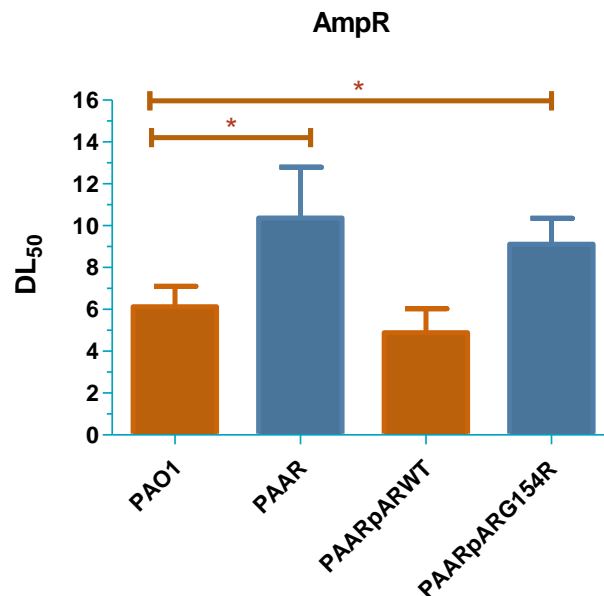


**Figura 5.6.** Distribución de las  $DL_{50}$  en los principales clones de alto riesgo. Análisis comparativos de los cuatro grupos mediante *U* de Mann-Whitney. Se consideraron significativos \**p*-valor<0.05. El valor de la cepa de referencia PAO1 se indica con un rombo negro.

Dado que algunos de los clones ST175 mostraron una disminución de la letalidad, al igual que en *C. elegans*, estos clones fueron analizados con la finalidad de encontrar el motivo que explicase dicha variación en el fenotipo de virulencia.

#### 4.13.1 Análisis de la letalidad de los clones de alto riesgo ST175 portadores de la mutación específica G154R en AmpR

Debido a la disminución de la letalidad observada en algunos clones ST175 y la identificación reciente, en algunos de ellos, de la mutación específica G154R, implicada en la hiperproducción de AmpC (Cabot *et al.*, 2016; Cabot *et al.*, 2012). Evaluamos el efecto de esta mutación específica en la virulencia de *P. aeruginosa* en *G. mellonella*.



**Figura 5.7.** Virulencia de PAO1 y de los mutantes de *ampR* en *G. mellonella* mediante el cálculo de las dosis letales. Se muestra la media de las DL<sub>50</sub> ± Desviación estándar (DS) (barras de error) proceden de al menos tres experimentos independientes. Se realizó la prueba U de Mann-Whitney para analizar las diferencias entre los diferentes mutantes y PAO1. Se consideró estadísticamente significativo \**p*-valor < 0.05

La inactivación de *ampR* (PAΔAR) en PAO1 redujo de forma significativa la virulencia (figura 5.7), aumentando la dosis letal de *P. aeruginosa* en *G. mellonella*; la complementación con *ampR* de tipo salvaje (*wt*) (PAΔARpARWT), restauró por completo la virulencia a los mismos niveles de PAO1. Sin embargo, al complementar con *ampR* mutado en G154R no restableció la virulencia inicial (PAARpARG154R), si no que más bien mostró un incremento en la dosis letal, al igual que ocurrió con el mutante

*ampR* (PAΔAR), indicando que AmpR es un factor importante en la virulencia de *G.mellonella*.

Puesto que la presencia de la mutación G154R en AmpR mostró un incremento significativo en la dosis letal, se examinó la presencia de esta mutación en los 30 clones ST175 analizados. Pese a encontrarse en 22 de los 30 aislados, la presencia o ausencia de esta mutación, no explicó las diferencias en la virulencia, al igual que ocurrió en el modelo de *C. elegans*; dado que al igual que los aislados que presentaron una menor virulencia en *G. mellonella* (con DL<sub>50</sub> hasta 100 veces la cepa de referencia PAO1), los clones ST175 que mostraron una virulencia mayor (con DL<sub>50</sub> incluso inferiores a la PAO1, 8 UFC) también presentaron dicha mutación.

#### **4.13.2. Estudio de las mutaciones involucradas en la virulencia de los clones de alto riesgo ST175.**

Con el propósito de encontrar una relación entre los cambios genéticos producidos o el número de estos y la virulencia (DL<sub>50</sub>), se examinó el genoma de 14 clones ST175 respecto al genoma de otro clon ST175 usado de referencia, secuenciados previamente (Cabot *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos indicaron que no existe una correlación significativa entre el número de mutaciones y la DL<sub>50</sub> de las cepas. Por otro lado, 19 genes mutados se asociaron de manera significativa con dosis elevadas (mediana: 5599,99 y 41,43, respectivamente). Al estudiar a fondo dichos genes, se observó que únicamente estaban presentes en 2 cepas de las 14, las cuales mostraron DL<sub>50</sub> elevadas (202,39 y 4664,9). De manera que no se detectó una asociación entre la virulencia en *G.mellonella* y genes de *P.aeruginosa*. Posiblemente, la falta de impacto de este análisis se deba al número reducido de clones ST175 de los que se dispone en comparación con la gran cantidad de genes de estudio (n=385). Además, una gran proporción de aislados presentan DL<sub>50</sub> elevadas, lo que podría impedir la detección de diferencias asociadas a la virulencia. De manera que, para poder asociar la virulencia de los ST175 a la presencia de mutaciones específicas en el genoma, se necesitará realizar un análisis con un mayor número de clones y con DL<sub>50</sub> más heterogéneas.

#### **4.14 Análisis de los factores asociados a la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*.**

Además de la asociación inicial entre cada una de las variables (perfiles MultiS, MDR, XDR, cepas procedentes de FQ y los 3 tipos de motilidad) y el aumento o



disminución de la virulencia; realizamos un análisis de regresión lineal simple, con el fin de determinar el efecto de dicha asociación. Estos datos revelan que los tres tipos de motilidad (*swarming*, *swimming* y *twitching*), junto con el perfil MultiS, se asocian de manera significativa con una disminución de la dosis letal, y por tanto un aumento de la virulencia. Mientras que las cepas procedentes de FQ, se asocian de forma significativa con un incremento de la mismas, por tanto, con una disminución de la patogenicidad. Con el propósito de identificar las variables asociadas de manera independiente con la virulencia se llevó a cabo un análisis de regresión lineal múltiple. Este análisis reveló que las variables que se asocian en mayor medida a la virulencia son los perfiles MultiS (B=-407.275; p=0.016), ModR (B=-400.070; p=0.037) y el origen epidémico (B=-454.591; p=0.023), asociándose de forma significativa con una disminución de las DL<sub>50</sub>, por tanto, con incremento de la virulencia. No obstante, estas 3 variables explicarían únicamente el 8.6% de la variabilidad del modelo, de modo que se necesitarían más estudios para confirmar el impacto del perfil de resistencia y el origen en la virulencia de *P. aeruginosa* en *G. mellonella*.

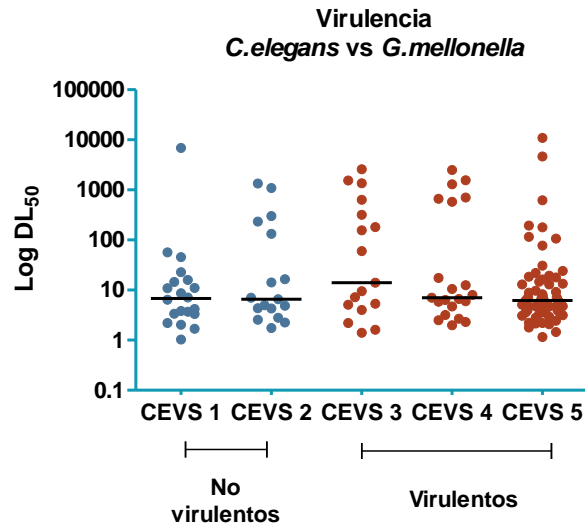
Variable	Coefficiente B	IC 95%	p-valor
<i>Swimming</i>	-9.233	(-17.64-(-0.83))	0.032
<i>Swarming</i>	-6.753	(-12.54-(-0.97))	0.022
<i>Twitching</i>	-21.91	(-38.20-(-5.62))	0.009
MultiS	-333.99	(-666.14-(-1.84))	0.049
FQ	432.17	45.21-819.12	0.029

**Tabla 4.8.** Análisis de regresión lineal simple de los factores predictivos de la virulencia de *P. aeruginosa* en el modelo *G. mellonella*. Se consideró estadísticamente significativo \*p-valor<0.05. IC: Intervalo de confianza al 95%.

#### 4.15. Análisis comparativo de la virulencia entre los modelos *Caenorhabditis elegans* y *Galleria mellonella*.

Uno de los principales objetivos de este trabajo se ha basado en descifrar la asociación entre los clones de alto riesgo, perfiles de resistencia y factores de virulencia en ambos modelos de infección, los cuales han mostrado similitudes y diferencias en los resultados que serán comentados en este apartado.

Para completar el estudio realizamos un análisis comparativo de ambos modelos sobre la virulencia, y tal como podemos observar en la gráfica 5.8, no existe ninguna relación entre *C.elegans* y *G.mellonella*.



**Figura 5.8.** Distribución de las DL<sub>50</sub> en los distintos CEVS.

De acuerdo con los datos obtenidos, documentamos en ambos modelos una clara correlación inversa entre la virulencia de *P. aeruginosa* y resistencia a los antibióticos.

Del mismo modo, las cepas ambientales, epidémicas y de bacteriemia siguieron el mismo patrón de virulencia en ambos modelos; no obstante, un cambio drástico a destacar es el acontecido en las cepas procedentes de FQ, ya que curiosamente en *C.elegans* la proporción de cepas virulentas fue prácticamente del total, mientras que en el modelo *G. mellonella* se invirtió totalmente dicha proporción. Como ya se ha comentado en los apartados anteriores esto puede ser debido al tipo de infección utilizado; dado que la técnica usada en *C. elegans*, implica el crecimiento previo de *P. aeruginosa* permitiendo la secreción de factores de virulencia previa a la inoculación de los nematodos (Tan *et al.*, 1999); mientras que en *G. mellonella*, al tratarse de la inoculación directa de *P. aeruginosa* mediante inyección, el crecimiento del microorganismo es posterior y debe de ser capaz de combatir el sistema inmune del huésped (Koch *et al.*, 2014), además la pérdida de factores de virulencia de los aislados de FQ junto a la capacidad reducida de establecer la infección debido al crecimiento deficiente, ha podido favorecer que el sistema inmune de *G. mellonella* elimine exitosamente a este patógeno (Whiley *et al.*, 2014).

Por otro lado, la producción de pigmentos no tuvo un impacto en la virulencia en ninguno de los modelos. La falta de impacto en *C. elegans* podría deberse al método de infección utilizado dado que para los ensayos *Fast Killing* y *Liquid Killing* los pigmentos parecen ser esenciales (Kirienko *et al.*, 2013; Mahajan-Miklos *et al.*, 1999), mientras que en el método *Slow-killing* intervienen diversos factores de virulencia (Tan *et al.*, 1999).

En este sentido, observaron que la adhesión a superficies rígidas junto con la detección de QS, inducían la virulencia de *P. aeruginosa* tanto en mamíferos como en eucariotas unicelulares, hecho que podría haber favorecido la virulencia de las cepas (Siriyaporn *et al.*, 2014). Otro factor que puede haber influido, es el posible comportamiento de aversión, que pudiese tener nuestro modelo frente *P. aeruginosa* durante la infección, ya que esta estrategia permite a *C. elegans* (Ballestriero *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2005), evitar alimentos desfavorables, en nuestro caso, de ciertas cepas de *P. aeruginosa*, produciendo así un cambio en el impacto en la virulencia. Mientras que en *G. mellonella* la falta de impacto podría deberse a la acción del sistema inmune, ya que es estructural y funcionalmente similar a la respuesta inmune innata de los mamíferos (Browne *et al.*, 2013), pudiendo hacer frente de una forma eficaz a la infección por *P. aeruginosa*.

A diferencia de la producción de pigmentos, los sistemas de motilidad se relacionaron de manera positiva y significativa con la virulencia únicamente en el modelo de *G. mellonella*. Esta asociación puede deberse a la necesidad de *P. aeruginosa* de diseminarse la hemolinfa de *G. mellonella* para producir la infección (Josenhans & Suerbaum, 2002).

De entre los factores de virulencia establecidos, la presencia de la toxina ExoU del SST3 en *C. elegans* se asoció de forma significativa con un aumento de la virulencia, mientras que en *G. mellonella*, a pesar de que los aislados con presencia de *exoU* mostrasen casi en su totalidad dosis letales bajas, no se observó una diferencia significativa en la virulencia. Esta falta de asociación sugiere que las diferencias en la virulencia no se pueden explicar únicamente por la producción de los diferentes efectores del SST3 (Allen *et al.*, 2020).

Por lo que respecta a los principales clones de alto riesgo ST111, ST175 y ST235, destacar que la virulencia, tanto en *C. elegans* como en *G. mellonella*, varió considerablemente dependiendo del clon involucrado; mientras que los ST111 y ST235 se asociaron a fenotipos virulentos, el ST175 mostró una disminución de la patogenicidad en ambos modelos, siendo significativamente mayor en el modelo de *C. elegans*.



## **5.CONCLUSIONES**



1. Los aislados que tienen un perfil de resistencia sensible (MultiS) son significativamente más virulentos que aquellos que presentan un perfil de resistencia MDR/XDR en los modelos *C. elegans* y *G. mellonella*, indicando una clara correlación inversa entre la resistencia y la virulencia en *P. aeruginosa*.
2. Los aislados de procedencia ambiental son los más virulentos en ambos modelos, mientras que en los procedentes de fibrosis quística se observa una disociación entre ellos.
3. El único factor de virulencia involucrado en la virulencia de *P. aeruginosa* en *C. elegans* es el Sistema de secreción tipo 3, en particular el genotipo *exoU* relacionado con una virulencia significativamente mayor que el genotipo *exoS*.
4. A diferencia de los clones de alto riesgo ST111 y ST235, el clon ST175 MDR/XDR ampliamente diseminado en el territorio nacional, presenta una virulencia reducida en el modelo *C. elegans*, siendo el único factor asociado de forma independiente con una disminución de la misma.
5. La elevada virulencia del ST235 podría ser atribuida a la presencia de la toxina *exoU* del SST3, la cual se asocia a una mayor virulencia de las cepas y a un peor pronóstico clínico.
6. Los resultados sugieren que la reducción de la virulencia del clon de alto riesgo ST175 se encuentra asociada a la mutación G154R en el regulador AmpR.
7. El análisis genómico y estadístico reveló que el gen que codifica para una helicasa dependiente de ATP con el polimorfismo D668G, se asocia a un incremento de la virulencia en el modelo de *C. elegans*.
8. El SST3 y el perfil de resistencia actúan como factores predictivos de mortalidad en las infecciones del torrente sanguíneo producidas por *P. aeruginosa*.
9. A pesar de que el fenotipo de virulencia en *C. elegans* se asocia a ciertas características clínicas e intrínsecas de *P. aeruginosa*, no tiene un impacto significativo en la mortalidad de los pacientes con infección del torrente

sanguíneo, indicando que el modelo de infección *C. elegans* no es un buen indicador pronóstico de la mortalidad por bacteriemia por *P. aeruginosa*.

10. De todos los estudiados, el único factor de virulencia que se asocia con la letalidad de *G. mellonella* es la motilidad.
11. Los factores asociados de forma independiente con la virulencia en el modelo *G. mellonella* son los perfiles ModR y MultiS, y la procedencia epidémica de los aislados.
12. La presencia o ausencia de mutaciones individuales no explica las diferencias entre las dosis letales dentro del mismo clon. Es necesario un análisis funcional de los diferentes genomas del ST175 para descifrar los factores que impulsan la reducción de la virulencia en este clon.
13. Aunque *C. elegans* y *G. mellonella* hayan demostrado ser modelos de infección útiles para el estudio de ciertas características intrínsecas de los patógenos, también presentan ciertas limitaciones.
14. En conjunto, los resultados presentados a lo largo de este trabajo son útiles para comprender la interrelación entre los perfiles de resistencia, clones de alto riesgo y virulencia.

### **Consideraciones futuras**

- Determinar los factores por los cuales las cepas mantienen o reducen su virulencia mediante un análisis funcional de los genes. Así como profundizar el análisis genético realizado aumentando el número de clones de alto riesgo ST175, con el propósito de comprobar los resultados obtenidos en este trabajo y descifrar los cambios genéticos asociados a un incremento o disminución de la virulencia
- Ampliar el estudio para intentar determinar el valor predictivo de la letalidad de *G.mellonella* como indicador pronóstico.
- Analizar colecciones de aislados procedentes de otro tipo de infecciones (ambientales, epidémicas, fibrosis quística, etc.), a fin de observar si existen diferencias en virulencia de *P. aeruginosa*, respecto a la colección estudiada. Así como establecer los factores de virulencia implicados en los distintos tipos de infección, y estudiar la relación entre estos y la resistencia.
- Evaluar la virulencia de *P. aeruginosa* en otros modelos de infección, para obtener más información sobre el uso de los mismos y determinar los factores de virulencia relevantes involucrados en la patogenia, así como estudiar la utilidad de los mismos como indicadores pronósticos.





## **6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- Abby, S.S., Cury, J., Guglielmini, J., Néron, B., Touchon, M. & Rocha, E.P.C. (2016). Identification of protein secretion systems in bacterial genomes. *Scientific Reports*, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep23080>.
- Abdelraouf, K., Kabbara, S., Ledesma, K.R., Poole, K. & Tam, V.H. (2011). Effect of multidrug resistance-conferring mutations on the fitness and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(6), 1311–1317. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr105>
- Adewoye, L., Sutherland, A., Srikumar, R. & Poole, K. (2002). The MexR Repressor of the mexAB-oprM Multidrug Efflux Operon in *Pseudomonas aeruginosa*: Characterization of Mutations Compromising Activity. *Journal of Bacteriology*, 184(15), 4308–4312. <https://doi.org/10.1128/JB.184.15.4308-4312.2002>
- Aditi, Shariff, M., Chhabra, S.K. & Rahman, M.U. (2017). Similar virulence properties of infection and colonization associated *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000569>
- Agnello, M. & Wong-Beringer, A. (2012). Differentiation in quinolone resistance by virulence genotype in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042973>
- Alcorn, J.F. & Wright, J.R. (2004). Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa*. elastase abrogates innate immune function. *Journal of Biological Chemistry*, 279(29), 30871–30879. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400796200>
- Allen, J.P., Ozer, E. A., Minasov, G., Shuvalova, L., Kiryukhina, O., Satchell, K.J.F. & Hauser, A.R. (2020). A comparative genomics approach identifies contact-dependent growth inhibition as a virulence determinant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919198117>
- Allured, V.S., Collier, R.J., Carroll, S.F. & McKay, D.B. (1986). Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0-Angstrom resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(5), 1320–1324. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.5.1320>
- Alonso, B., Fernández-Barat, L., Di Domenico, E. G., Marín, M., Cercenado, E., Merino, I., de Pablos, M., Muñoz, P. & Guembe, M. (2020). Characterization of the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* strains causing ventilator-associated pneumonia. *BMC Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05534-1>
- Altincicek, B., Stötzel, S., Wygrecka, M., Preissner, K.T. & Vilcinskis, A. (2008). Host-Derived Extracellular Nucleic Acids Enhance Innate Immune Responses, Induce Coagulation, and Prolong Survival upon Infection in Insects. *The Journal of Immunology*, 181(4), 2705–2712. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2705>
- Altun, Z.F. & Hall, D.H. (2009). WormAtlas Hermaphrodite Handbook - Introduction. *WormAtlas*. <https://doi.org/10.3908/wormatlas.1.1>

- Ambler, R.P.** (1980). The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 289(1036), 321–331. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>
- Ancochea, J., Antón, E. & Casanova, A.** (2004). New therapeutic strategies in idiopathic pulmonary fibrosis. *Arch Bronconeumol*, 40(Supl 6), 16–22.
- Anuj, S. & Whiley, D.M.** (2010). *Pseudomonas aeruginosa* In *PCR for Clinical Microbiology* (pp. 191–195). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-9039-3\\_24](https://doi.org/10.1007/978-90-481-9039-3_24)
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J. Y., Wakabayashi, H. & Oyaizu, H.** (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(4), 1563–1589. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-4-1563>
- Anzai, Y., Kudo, Y. & Oyaizu, H.** (1997). The phylogeny of the genera Chryseomonas, Flavimonas, and Pseudomonas supports synonymy of these three genera. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2), 249–251. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-249>
- Arca-Suárez, J., Fraile-Ribot, P., Vázquez-Ucha, J. C., Cabot, G., Martínez-Gutián, M., Lence, E., González-Bello, C., Beceiro, A., Rodríguez-Iglesias, M., Galán-Sánchez, F., Bou, G. & Oliver, A.** (2019). Challenging antimicrobial susceptibility and evolution of resistance (oxa-681) during treatment of a long-term nosocomial infection caused by a *Pseudomonas aeruginosa* ST175 Clone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.01110-19>
- Arora, S.K., Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S. & Ramphal, R.** (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infection and Immunity*, 66(3), 1000–1007. <https://doi.org/10.1128/iai.66.3.1000-1007.1998>
- Ashida, M.** (1990). The prophenoloxidase cascade in insect immunity. *Research in Immunology*, 141(8), 908–910. [https://doi.org/10.1016/0923-2494\(90\)90047-3](https://doi.org/10.1016/0923-2494(90)90047-3)
- Bagge, N., Ciofu, O., Hentzer, M., Campbell, J.I. A., Givskov, M. & Høiby, N.** (2002). Constitutive high expression of chromosomal  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(11), 3406–3411. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3406-3411.2002>
- Balasubramanian, D., Kong, K.F., Jayawardena, S.R., Leal, S.M., Sautter, R.T. & Mathee, K.** (2011). Co-regulation of  $\beta$ -lactam resistance, alginate production and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* *Journal of Medical Microbiology*, 60(2), 147–156. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.021600-0>
- Balasubramanian, D., Kumari, H., Jaric, M., Fernandez, M., Turner, K. H., Dove, S. L., Narasimhan, G., Lory, S. & Mathee, K.** (2014). Deep sequencing analyses expands the *Pseudomonas aeruginosa* AmpR regulon to include small RNA-mediated regulation of iron acquisition, heat shock and oxidative stress response. *Nucleic*

- Acids Research*, 42(2), 979–998. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt942>
- Balasubramanian, D., Kumari, H. & Mathee, K.** (2015). *Pseudomonas aeruginosa* AmpR: an acute-chronic switch regulator. *Pathogens and Disease*, 73(2), 1–14. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12208>
- Balasubramanian, D., Schneper, L., Kumari, H. & Mathee, K.** (2013). A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Research*, 41(1), 1–20. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1039>
- Balasubramanian, D., Schneper, L., Merighi, M., Smith, R., Narasimhan, G., Lory, S. & Mathee, K.** (2012). The regulatory repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC  $\beta$ -lactamase regulator AmpR includes virulence genes. *PLoS ONE*, 7(3), e34067–e34067. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034067>
- Ball, G., Durand, É., Lazdunski, A. & Filloux, A.** (2002). A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* *Molecular Microbiology*, 43(2), 475–485. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02759.x>
- Ballestrero, F., Nappi, J., Zampi, G., Bazzicalupo, P., Di Schiavi, E. & Egan, S.** (2016). *Caenorhabditis elegans* employs innate and learned aversion in response to bacterial toxic metabolites tambjamine and violacein. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep29284>
- Banin, Ehud, Vasil, M.L. & Greenberg, E.P.** (2005). From The Cover: Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(31), 11076–11081. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504266102>
- Banin, Eyal, Lozinski, A., Brady, K.M., Berenshtein, E., Butterfield, P.W., Moshe, M., Chevion, M., Greenberg, E.P. & Banin, E.** (2008). The potential of desferrioxamine-gallium as an anti-*Pseudomonas* therapeutic agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43), 16761–16766. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808608105>
- Banville, N., Browne, N. & Kavanagh, K.** (2012). Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. *Virulence*, 3(6), 497–503. <https://doi.org/10.4161/viru.21972>
- Baquero, F.** (2004). From pieces to patterns: Evolutionary engineering in bacterial pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 2(6), 510–518. <https://doi.org/10.1038/nrmicro909>
- Battle, S.E., Meyer, F., Rello, J., Kung, V.L. & Hauser, A.R.** (2008). Hybrid pathogenicity island PAGI-5 contributes to the highly virulent phenotype of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in mammals. *Journal of Bacteriology*, 190(21), 7130–7140. <https://doi.org/10.1128/JB.00785-08>
- Battle, S.E., Rello, J. & Hauser, A.R.** (2009). Genomic islands of *Pseudomonas aeruginosa* *FEMS Microbiology Letters*, 290(1), 70–78. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01406.x>

- Baum, E.Z., Crespo-Carbone, S.M., Morrow, B.J., Davies, T.A., Foleno, B.D., He, W., Queenan, A. M. & Bush, K.** (2009). Effect of MexXY overexpression on ceftobiprole susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(7), 2785–2790. <https://doi.org/10.1128/AAC.00018-09>
- Bean, H.D., Rees, C.A. & Hill, J.E.** (2016). Comparative analysis of the volatile metabolomes of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Journal of Breath Research*, 10(4), 047102. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/10/4/047102>
- Bebrone, C., Bogaerts, P., Delbrück, H., Bemmink, S., Kupper, M.B., De Castro, R.R., Glupczynski, Y. & Hoffmann, K.M.** (2013). GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-type  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), 396–401. <https://doi.org/10.1128/AAC.01784-12>
- Beceiro, A., Moreno, A., Fernández, N., Vallejo, J. A., Aranda, J., Adler, B., Harper, M., Boyce, J.D. & Bou, G.** (2014). Biological Cost of Different Mechanisms of Colistin Resistance and Their Impact on Virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 518–526. <https://doi.org/10.1128/AAC.01597-13>
- Beceiro, A., Tomás, M. & Bou, G.** (2013). Antimicrobial resistance and virulence: A successful or deleterious association in the bacterial world? *Clinical Microbiology Reviews*, 26(2), 185–230. <https://doi.org/10.1128/CMR.00059-12>
- Beeton, M.L., Alves, D.R., Enright, M.C. & Jenkins, A.T.A.** (2015). Assessing phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* using a *Galleria mellonella* infection model. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(2), 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.04.005>
- Bellido, F., Martin, N.L., Siehnel, R.J. & Hancock, R.E.W.** (1992). Reevaluation, using intact cells, of the exclusion limit and role of porin OprF in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane permeability. *Journal of Bacteriology*, 174(16), 5196–5203. <https://doi.org/10.1128/jb.174.16.5196-5203.1992>
- Bergin, D., Reeves, E.P., Renwick, J., Wientjes, F.B. & Kavanagh, K.** (2005). Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: Identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.7.4161-4170.2005>
- Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G.P.F., Filloux, A. & Voulhoux, R.** (2010). Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. In *International Journal of Medical Microbiology* (Vol. 300, Issue 8, pp. 534–543). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.005>
- Bone, R.C., Balk, R. A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W. A., Schein, R.M.H. & Sibbald, W.J.** (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*, 101(6), 1644–1655. <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1644>

- Boneca, I.G.** (2005). The role of peptidoglycan in pathogenesis. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 8, Issue 1, pp. 46–53). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.12.008>
- Borkar, D.S., Fleiszig, S. M. J., Leong, C., Lalitha, P., Srinivasan, M., Ghanekar, A.A., Tam, C., Li, W.Y., Zegans, M.E., McLeod, S.D., Lietman, T. M. & Acharya, N.R.** (2013). Association Between Cytotoxic and Invasive *Pseudomonas aeruginosa* and Clinical Outcomes in Bacterial Keratitis. *JAMA Ophthalmology*, 131(2), 147. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2013.778>
- Boyd, A. & Chakrabarty, A.M.** (1995). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(3), 162–168. <https://doi.org/10.1007/BF01569821>
- Branda, S.S., Vik, Å., Friedman, L. & Kolter, R.** (2005). Biofilms: The matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13(1), 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006>
- Braun, V.** (1995). Energy-coupled transport and signal transduction through the Gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiology Reviews*, 16(4), 295–307. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1995.tb00177.x>
- Braz, V.S., Furlan, J.P.R., Fernandes, A.F.T. & Stehling, E.G.** (2016). Mutations in NalC induce MexAB-OprM overexpression resulting in high level of aztreonam resistance in environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* *FEMS Microbiology Letters*, 363(16). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw166>
- Brenner, S.** (1973). The genetics of behaviour. *British Medical Bulletin*, 29(3), 269–271. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a071019>
- Brenner, S.** (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71–94. <https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>
- Browne, N., Heelan, M. & Kavanagh, K.** (2013). An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence*, 4(7), 597–603. <https://doi.org/10.4161/viru.25906>
- Browne, N., Surlis, C., Maher, A., Gallagher, C., Carolan, J.C., Clynes, M. & Kavanagh, K.** (2015). Prolonged pre-incubation increases the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to bacterial and fungal infection. *Virulence*, 6(5), 458–465. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1021540>
- Bruchmann, S., Dötsch, A., Nouri, B., Chaberny, I.F. & Häussler, S.** (2013). Quantitative contributions of target alteration and decreased drug accumulation to *Pseudomonas aeruginosa* fluoroquinolone resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(3), 1361–1368. <https://doi.org/10.1128/AAC.01581-12>
- Bucior, I., Pielage, J.F. & Engel, J.N.** (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Pili and Flagella Mediate Distinct Binding and Signaling Events at the Apical and Basolateral Surface of Airway Epithelium. *PLoS Pathogens*, 8(4), e1002616.



- <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002616>
- Bush, K. & Jacoby, G.A.** (2010). Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Bush, K., Jacoby, G.A. & Medeiros, A.A.** (1995). A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 39, Issue 6, pp. 1211–1233). <https://doi.org/10.1128/AAC.39.6.1211>
- Cabot, G, López-Causapé, C., Ocampo-Sosa, A. ., Sommer, L. ., Domínguez, M. ., Zamorano, L., Juan, C., Tubau, F., Rodríguez, C., Moyà, B., Peña, C., Martínez-Martínez, L., Plesiat, P. & Oliver, A.** (2016). Deciphering the resistome of the widespread *P. aeruginosa* ST175 international high-risk clone through whole genome sequencing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(12), AAC.01720-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01720-16>
- Cabot, G, Florit-Mendoza, L., Sánchez-Diener, I., Zamorano, L. & Oliver, A.** (2018). Deciphering  $\beta$ -lactamase-independent  $\beta$ -lactam resistance evolution trajectories in *Pseudomonas aeruginosa* *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(12), 3322–3331. <https://doi.org/10.1093/jac/dky364>
- Cabot, G, Ocampo-Sosa, A. A., Domínguez, M. A., Gago, J. F., Juan, C., Tubau, F., Rodríguez, C., Moyà, B., Peña, C., Martínez-Martínez, L. & Oliver, A.** (2012). Genetic Markers of Widespread Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* High-Risk Clones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(12), 6349–6357. <https://doi.org/10.1128/AAC.01388-12>
- Cabot, G, Ocampo-Sosa, A. A., Tubau, F., Macia, M. D., Rodríguez, C., Moya, B., Zamorano, L., Suárez, C., Peña, C., Martínez-Martínez, L., Oliver, A. & Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).** (2011). Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(5), 1906–1911. <https://doi.org/10.1128/AAC.01645-10>
- Cabot, G, Zamorano, L., Moyà, B., Juan, C., Navas, A., Blázquez, J. & Oliver, A.** (2016). Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Antimicrobial Resistance and Fitness under Low and High Mutation Rates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(3), 1767–1778. <https://doi.org/10.1128/AAC.02676-15>
- Caiazza, N.C., Shanks, R.M.Q. & O’Toole, G.A.** (2005). Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* *Journal of Bacteriology*, 187(21), 7351–7361. <https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7351-7361.2005>
- Casadevall, A.** (2005). Host as the variable: Model hosts approach the immunological asymptote. In *Infection and Immunity* (Vol. 73, Issue 7, pp. 3829–3832). American Society for Microbiology (ASM). <https://doi.org/10.1128/IAI.73.7.3829-3832.2005>



- Cavallo, J.D., Hocquet, D., Plesiat, P., Fabre, R. & Roussel-Delvallez, M.** (2007). Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials: A 2004 French multicentre hospital study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(5), 1021–1024. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm076>
- Cendra, M. del M., Christodoulides, M. & Hossain, P.** (2017). Signaling Mediated by Toll-Like Receptor 5 Sensing of *Pseudomonas aeruginosa* Flagellin Influences IL-1 $\beta$  and IL-18 Production by Primary Fibroblasts Derived from the Human Cornea. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(APR), 130. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00130>
- Cerenius, L., Lee, B. L. & Söderhäll, K.** (2008). The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. In *Trends in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.02.009>
- Cezairliyan, B., Vinayavekhin, N., Grenfell-Lee, D., Yuen, G.J., Saghatelian, A. & Ausubel, F.M.** (2013). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Phenazines that Kill *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathogens*, 9(1), e1003101. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003101>
- Champion, O.L., Wagley, S. & Titball, R.W.** (2016). *Galleria mellonella* as a model host for microbiological and toxin research. *Virulence*, 7(7), 840–845. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1203486>
- Chang, Y.S.T., Klockgether, J. & Tümmler, B.** (2007). An intragenic deletion in pilQ leads to nonpiliation of a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from cystic fibrosis lung. *FEMS Microbiology Letters*, 270(2), 201–206. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00664.x>
- Charlson, M.E., Pompei, P., Ales, K. & MacKenzie, C.** (1987). A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *Journal of Chronic Diseases*, 40(5), 373–383. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3558716>
- Cheetham, B. F. & Katz, M.E.** (1995). A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. *Molecular Microbiology*, 18(2), 201–208. [https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi\\_18020201.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_18020201.x)
- Chen, Y., Sun, M., Wang, M., Lu, Y. & Yan, Z.** (2014). Dissemination of IMP-6-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST244 in multiple cities in China. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(7), 1181–1187. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2063-5>
- Cheng, K., Smyth, R.L., Govan, J. R. W., Doherty, C., Winstanley, C., Denning, N., Heaf, D.P., Van Saene, H. & Hart, C.A.** (1996). Spread of  $\beta$ -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet*, 348(9028), 639–642. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)05169-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)05169-0)

- Chieda, Y., Iiyama, K., Lee, J. M., Kusakabe, T., Yasunaga-Aoki, C. & Shimizu, S.** (2008). Inactivation of pyocyanin synthesis genes has no effect on the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 toward the silkworm, *Bombyx mori*. *FEMS Microbiology Letters*, 278(1), 101–107. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00982.x>
- Chotirmall, S.H., Smith, S.G., Gunaratnam, C., Cosgrove, S., Dimitrov, B.D., O’Neill, S. J., Harvey, B.J., Greene, C.M. & McElvaney, N.G.** (2012). Effect of estrogen on pseudomonas mucoidy and exacerbations in cystic fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 366(21), 1978–1986. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1106126>
- Chow, J.W., Fine, M.J., Shlaes, D. M., Quinn, J.P., Hooper, D. C., Johnson, M.P., Ramphal, R., Wagener, M.M., Miyashiro, D.K. & Yu, V.L.** (1991). Enterobacter bacteremia: Clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Annals of Internal Medicine*, 115(8), 585–590. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-115-8-585>
- Chuanchuen, R., Narasaki, C.T. & Schweizer, H.P.** (2002). The MexJK Efflux Pump of *Pseudomonas aeruginosa* Requires OprM for Antibiotic Efflux but Not for Efflux of Triclosan. *Journal of Bacteriology*, 184(18), 5036–5044. <https://doi.org/10.1128/JB.184.18.5036-5044.2002>
- Cigana, C., Curcurù, L., Leone, M. R., Ieranò, T., Lorè, N. I., Bianconi, I., Silipo, A., Cozzolino, F., Lanzetta, R., Molinaro, A., Bernardini, M. L. & Bragonzi, A.** (2009). *Pseudomonas aeruginosa* Exploits Lipid A and Muropeptides Modification as a Strategy to Lower Innate Immunity during Cystic Fibrosis Lung Infection. *PLoS ONE*, 4(12), e8439. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008439>
- Clinical and Laboratory Standards Institute.** (2015). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI document M07-A10. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.*
- Coburn, J. & Frank, D.W.** (1999). Macrophages and epithelial cells respond differently to the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Infection and Immunity*, 67(6), 3151–3154. <https://doi.org/10.1128/iai.67.6.3151-3154.1999>
- Colmer-Hamood, J. A., Dzvova, N., Kruczek, C. & Hamood, A.N.** (2016). In Vitro Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Using Conditions That Mimic the Environment at Specific Infection Sites. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 142, pp. 151–191). <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.05.003>
- Cornelis, P.** (2020). Putting an end to the *Pseudomonas aeruginosa* IQS controversy. *Microbiologyopen*, 9(2), e962. <https://doi.org/10.1002/mbo3.962>
- Conery, A. L., Larkins-Ford, J., Ausubel, F. M. & Kirienko, N. V.** (2014). High-Throughput Screening for Novel Anti-Infectives Using a *C. elegans* Pathogenesis Model. *Current Protocols in Chemical Biology*, 6(1), 25–37. <https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch130160>

- Corsi, A. K., Wightman, B. & Chalfie, M.** (2015). A transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 200(2), 387–407. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.176099>
- Couillault, C. & Ewbank, J.J.** (2002). Diverse bacteria are pathogens of *Caenorhabditis elegans*. *Infection and Immunity*, 70(8), 4705–4707. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4705-4707.2002>
- Cowles, K.N. & Gitai, Z.** (2010). Surface association and the MreB cytoskeleton regulate pilus production, localization and function in *Pseudomonas aeruginosa* *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07132.x>
- Cross, A.S.** (2008). What is a virulence factor? In *Critical care (London, England)*. <https://doi.org/10.1186/cc7127>
- Cunliffe, H.E., Merriman, T.R. & Lamont, I.L.** (1995). Cloning and characterization of pvdS, a gene required for pyoverdine synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: PvdS is probably an alternative sigma factor. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/jb.177.10.2744-2750.1995>
- Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T. & Dowson, C.G.** (2004). Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5644. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004>
- Cuzick, A., Stirling, F.R., Lindsay, S. L. & Evans, T.J.** (2006). The type III pseudomonas exotoxin U activates the c-Jun NH 2-terminal kinase pathway and increases human epithelial interleukin-8 production. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.02045-05>
- Dasgupta, N., Lykken, G.L., Wolfgang, M. C. & Yahr, T.L.** (2004). A novel anti-anti-activator mechanism regulates expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Molecular Microbiology*, 53(1), 297–308. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04128.x>
- Davey, M. E. & O'toole, G. A.** (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847–867. <https://doi.org/10.1128/membr.64.4.847-867.2000>
- David J. Finney.** (1947). Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve. In *Cambridge University Press* (Issue 31, p. 256).
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. & Greenberg, E. P.** (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280(5361), 295–298. <https://doi.org/10.1126/science.280.5361.295>
- De Bentzmann, S., Polette, M., Zahm, J. M., Hinrasky, J., Kileztky, C., Bajolet, O., Klossek, J. M., Filloux, A., Lazdunski, A. & Puchelle, E.** (2000). *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors delay airway epithelial wound repair by altering the actin cytoskeleton and inducing overactivation of epithelial matrix

- metalloproteinase-2. *Laboratory Investigation*, 80(2), 209–219. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780024>
- de Dios Caballero, J., del Campo, R., Royuela, A., Solé, A., Máiz, L., Oliveira, C., Quintana-Gallego, E., de Gracia, J., Cobo, M., de la Pedrosa, E. G. G., Oliver, A., Cantón, R., Cortell, I., Asensio, O., García, G., Martínez, M. T., Cols, M., Salcedo, A., Vázquez, C., ... Suárez, L. (2016). Bronchopulmonary infection-colonization patterns in Spanish cystic fibrosis patients: Results from a national multicenter study. *Journal of Cystic Fibrosis*, 15(3), 357–365. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2015.09.004>
- De Vos, D., De Chial, M., Cochez, C., Jansen, S., Tümmler, B., Meyer, J. M. & Cornelis, P. (2001). Study of pyoverdine type and production by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients: Prevalence of type II pyoverdine isolates and accumulation of pyoverdine-negative mutations. *Archives of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s002030100278>
- del Barrio-Tofiño, E., López-Causapé, C., Cabot, G., Rivera, A., Benito, N., Segura, C., Montero, M. M., Sorlí, L., Tubau, F., Gómez-Zorrilla, S., Tormo, N., Durá-Navarro, R., Viedma, E., Resino-Foz, E., Fernández-Martínez, M., González-Rico, C., Alejo-Cancho, I., Martínez, J. A., Labayru-Echverria, C., ... Oliver, A. (2017). Genomics and Susceptibility Profiles of Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(11). <https://doi.org/10.1128/AAC.01589-17>
- del Barrio-Tofiño, E., López-Causapé, C. & Oliver, A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with horizontally-acquired  $\beta$ -lactamases: 2020 update. In *International Journal of Antimicrobial Agents*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106196>
- del Barrio-Tofiño, E., Zamorano, L., Cortes-Lara, S., López-Causapé, C., Sánchez-Diener, I., Cabot, G., Bou, G., Martínez-Martínez, L., Oliver, A., Galán, F., Gracia, I., Rodríguez, M. A., Martín, L., Sánchez, J. M., Viñuela, L., García, M. M. V., Lepe, J. A., Aznar, J., López-Hernández, I., ... Oliver, A. (2019). Spanish nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance mechanisms and epidemiology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(7), 1825–1835. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz147>
- Delcour, A.H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794(5), 808–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>
- Denning, G.M., Railsback, M.A., Rasmussen, G.T., Cox, C.D. & Britigan, B.E. (1998). *Pseudomonas* pyocyanine alters calcium signaling in human airway epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 274(6), L893–L900. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1998.274.6.L893>
- Denning, G. M., Wollenweber, L. A., Railsback, M. A., Cox, C. D., Stoll, L. L. & Britigan, B. E. (1998). *Pseudomonas* Pyocyanin Increases Interleukin-8 Expression by Human Airway Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 66(12), 5777–5784. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.12.5777-5784.1998>

- Doggett, R.G.** (1969). Incidence of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* from clinical sources. *Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/aem.18.5.936-937.1969>
- Doi, Y. & Arakawa, Y.** (2007). 16S ribosomal RNA methylation: Emerging resistance mechanism against aminoglycosides. In *Clinical Infectious Diseases* (Vol. 45, Issue 1, pp. 88–94). Oxford University Press (OUP). <https://doi.org/10.1086/518605>
- Drake, D. & Montie, T.C.** (1988). Flagella, motility and invasive virulence of *Pseudomonas aeruginosa* *Journal of General Microbiology*, 134(1), 43–52. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-1-43>
- Driscoll, J. A., Brody, S. L. & Kollef, M.H.** (2007). The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Drugs*, 67(3), 351–368. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767030-00003>
- Drlica, K. & Zhao, X.** (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 61(3), 377–392. <https://doi.org/10.1128/.61.3.377-392.1997>
- Dubois, V., Arpin, C., Dupart, V., Scavelli, A., Coulange, L., André, C., Fischer, I., Grobost, F., Brochet, J. P., Lagrange, I., Dutilh, B., Jullin, J., Noury, P., Larrivet, G. & Quentin, C.** (2008).  $\beta$ -Lactam and aminoglycoside resistance rates and mechanisms among *Pseudomonas aeruginosa* in French general practice (community and private healthcare centres). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(2), 316–323. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn174>
- ECDC.** (2020). Antimicrobial Resistance in the EU/EEA (EARS-Net). Annual Epidemiological Report for 2019. *Surveillance Report*.
- Edenborough, F.P., Stone, H. R., Kelly, S. J., Zadik, P., Doherty, C. J. & Govan, J.R.W.** (2004). Genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis suggests need for segregation. *Journal of Cystic Fibrosis*, 3(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2003.12.007>
- El Garch, F., Bogaerts, P., Bebrone, C., Galleni, M. & Glupczynski, Y.** (2011). OXA-198, an Acquired Carbapenem-Hydrolyzing Class D  $\beta$ -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(10), 4828–4833. <https://doi.org/10.1128/AAC.00522-11>
- El Solh, A.A., Akinnusi, M.E., Wiener-Kronish, J. P., Lynch, S. V., Pineda, L.A. & Szarpa, K.** (2008). Persistent infection with *Pseudomonas aeruginosa* in ventilator-associated pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 178(5), 513–519. <https://doi.org/10.1164/rccm.200802-239OC>
- El-Solh, A.A., Hattemer, A., Hauser, A. R., Alhajhusain, A. & Vora, H.** (2012). Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Critical Care Medicine*, 40(4), 1157–1163. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3182377906>
- Ellis, J.D., Graham, J. R. & Mortensen, A.** (2013). Standard methods for wax moth research. In *Journal of Apicultural Research* (Vol. 52, Issue 1). Taylor & Francis.



<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.10>

- Empel, J., Filczak, K., Mrówka, A., Hryniewicz, W., Livermore, D. M. & Gniadkowski, M.** (2007). Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in Warsaw, Poland: Further evidence for an international clonal complex. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.00997-07>
- Ermolaeva, M.A. & Schumacher, B.** (2014). Insights from the worm: The *C. elegans* model for innate immunity. In *Seminars in Immunology* (Vol. 26, Issue 4, pp. 303–309). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.04.005>
- Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J. & Poole, K.** (1998). Influence of the MexAB-OprM Multidrug Efflux System on Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* *Journal of Bacteriology*, 180(20), 5443–5447. <https://doi.org/10.1128/JB.180.20.5443-5447.1998>
- Evans, T.J.** (2015). Small colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in chronic bacterial infection of the lung in cystic fibrosis. *Future Microbiology*, 10(2), 231–239. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.107>
- Feinbaum, R.L., Urbach, J.M., Liberati, N.T., Djonovic, S., Adonizio, A., Carvunis, A.R. & Ausubel, F.M.** (2012). Genome-wide identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence-related genes using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *PLoS Pathogens*, 8(7), 11. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002813>
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H. & Prince, A.** (1998). Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infection and Immunity*, 66(1), 43–51. <https://doi.org/10.1128/iai.66.1.43-51.1998>
- Feltman, H., Schulert, G., Khan, S., Jain, M., Peterson, L. & Hauser, A. R.** (2001). Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* *Microbiology*, 147(10), 2659–2669. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-10-2659>
- Filloux, A.** (2004). The underlying mechanisms of type II protein secretion. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1694, Issues 1-3 SPEC.ISS., pp. 163–179). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.05.003>
- Fischer, S., Dethlefsen, S., Klockgether, J. & Tümmler, B.** (2020). Phenotypic and Genomic Comparison of the Two Most Common ExoU-Positive *Pseudomonas aeruginosa* Clones, PA14 and ST235. *MSystems*. <https://doi.org/10.1128/msystems.01007-20>
- Fleiszig, S. M.J., Arora, S. K., Van, R. & Ramphal, R.** (2001). FlhA, a Component of the Flagellum Assembly Apparatus of *Pseudomonas aeruginosa*, Plays a Role in Internalization by Corneal Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 69(8), 4931–4937. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.4931-4937.2001>

- Flo, T.H., Smith, K.D., Sato, S., Rodriguez, D.J., Holmes, M. A., Strong, R.K., Akira, S. & Aderem, A. (2004). Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*, 432(7019), 917–921. <https://doi.org/10.1038/nature03104>
- Fothergill, J.L., Panagea, S., Hart, C.A., Walshaw, M. J., Pitt, T.L. & Winstanley, C. (2007). Widespread pyocyanin over-production among isolates of a cystic fibrosis epidemic strain. *BMC Microbiology*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-45>
- Foulkes, D.M., McLean, K., Haneef, A.S., Fernig, D. G., Winstanley, C., Berry, N. & Kaye, S. B. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* Toxin ExoU as a Therapeutic Target in the Treatment of Bacterial Infections. *Microorganisms*, 7(12), 707. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120707>
- Fraile-Ribot, P.A., Mulet, X., Cabot, G., Del Barrio-Tofiño, E., Juan, C., Pérez, J.L. & Oliver, A. (2017). In vivo emergence of resistance to novel cephalosporin– $\beta$ -lactamase inhibitor combinations through the duplication of amino acid D149 from OXA-2  $\beta$ -lactamase (OXA-539) in sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(9). <https://doi.org/10.1128/AAC.01117-17>
- Frank, D.W. (1997). The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 26(4), 621–629. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.6251991.x>
- Froes, T.Q., Guido, R.V.C., Metwally, K. & Castilho, M.S. (2020). A novel scaffold to fight *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin production: Early steps to novel antivirulence drugs. *Future Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0351>
- Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Adler, T., Aguilar Pimentel, J., Becker, L., Bolle, I., Brielmeier, M., Calzada- Wack, J., Dalke, C., Ehrhardt, N., Fasnacht, N., Ferwagner, B., Frischmann, U., Hans, W., Holter, S., Holzlwimmer, G., Horsch, M., Javaheri, A., Kallnik, M., ... de Angelis, M. (2009). The German Mouse Clinic: A Platform for Systemic Phenotype Analysis of Mouse Models. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. <https://doi.org/10.2174/138920109787315051>
- Fujita, K. (1987). Heat-stable hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa*. [*Hokkaido Igaku Zasshi*] *The Hokkaido Journal of Medical Science*, 62(3), 392–401. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3111962/>
- Fukuda, H., Hosaka, M., Iyobe, S., Gotoh, N., Nishino, T. & Hirai, K. (1995). nfxC-type quinolone resistance in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 39, Issue 3, pp. 790–792). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.3.790>

- Fuqua, C., Parsek, M.R. & Greenberg, E.P.** (2001). Regulation of Gene Expression by Cell-to-Cell Communication: Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing. *Annual Review of Genetics*, 35(1), 439–468. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090913>
- Gacesa, P. & Russell, N.J.** (1990). The structure and properties of alginate. In *Pseudomonas Infection and Alginates* (pp. 29–49). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-1836-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-009-1836-8_3)
- Gallagher, L.A., McKnight, S. L., Kuznetsova, M.S., Pesci, E.C. & Manoil, C.** (2002). Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.184.23.6472-6480.2002>
- Galloway, D.R.** (1991). *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Molecular Microbiology*, 5(10), 2315–2321. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb02076.x>
- García-Castillo, M., Del Campo, R., Morosini, M. I., Riera, E., Cabot, G., Willems, R., Van Mansfeld, R., Oliver, A. & Cantón, R.** (2011). Wide dispersion of ST175 clone despite high genetic diversity of carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in 16 Spanish hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(8), 2905–2910. <https://doi.org/10.1128/JCM.00753-11>
- Garcia, L.R., Mehta, P. & Sternberg, P.W.** (2001). Regulation of distinct muscle behaviors controls the *C. elegans* male's copulatory spicules during mating. *Cell*, 107(6), 777–788. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00600-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00600-6)
- Garey, K. W., Vo, Q.P., Larocco, M.T., Gentry, L. O. & Tam, V.H.** (2008). Prevalence of type III secretion protein exoenzymes and antimicrobial susceptibility patterns from bloodstream isolates of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Journal of Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1179/joc.2008.20.6.714>
- Garner, J.S., Jarvis, W.R., Emori, T.G., Horan, T.C. & Hughes, J.M.** (1988). CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *AJIC: American Journal of Infection Control*, 16(3), 128–140. [https://doi.org/10.1016/0196-6553\(88\)90053-3](https://doi.org/10.1016/0196-6553(88)90053-3)
- Geisinger, E. & Isberg, R.R.** (2017). Interplay between antibiotic resistance and virulence during Disease promoted by multidrug-resistant bacteria. *Journal of Infectious Diseases*, 215(June), S9–S17. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw402>
- Gilarranz, R., Juan, C., Castillo-Vera, J., Chamizo, F. J., Artiles, F., Álamo, I. & Oliver, A.** (2013). First detection in Europe of the metallo- $\beta$ -lactamase IMP-15 in clinical strains of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(9), E424–7. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12248>



- Giske, C.G., Buarø, L., Sundsfjord, A. & Wretling, B.** (2008). Alterations of porin, pumps, and penicillin-binding proteins in carbapenem resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Drug Resistance*, 14(1), 23–30. <https://doi.org/10.1089/mdr.2008.0778>
- Gómez-Zorrilla, S., Calatayud, L., Juan, C., Cabot, G., Tubau, F., Oliver, A., Dominguez, M.A., Ariza, J. & Peña, C.** (2017). Understanding the acute inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* infection: differences between susceptible and multidrug-resistant strains in a mouse peritonitis model. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(2), 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.10.016>
- Gómez-Zorrilla, S., Juan, C., Cabot, G., Camoez, M., Tubau, F., Oliver, A., Dominguez, M.A., Ariza, J. & Peña, C.** (2016). Impact of multidrug resistance on the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*: In vitro and in vivo studies. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 47(5), 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.02.010>
- Gomis-Font, M. A., Cabot, G., Sánchez-Diener, I., Fraile-Ribot, P. A., Juan, C., Moya, B., Zamorano, L. & Oliver, A.** (2020). In vitro dynamics and mechanisms of resistance development to imipenem and imipenem/relebactam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(9), 2508–2515. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa206>
- Gooderham, W. J. & Hancock, R.E.W.** (2009). Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. In *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00135.x>
- Gotoh, N., Tsujimoto, H., Tsuda, M., Okamoto, K., Nomura, A., Wada, T., Nakahashi, M. & Nishino, T.** (1998). Characterization of the MexC-MexD-OprJ Multidrug Efflux System in  $\Delta$ mexA-mexB-oprM Mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(8), 1938–1943. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.8.1938>
- Govan, J.R.W. & Deretic, V.** (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and Burkholderia cepacia. *Microbiological Reviews*, 60(3), 539–574. <https://doi.org/10.1128/mubr.60.3.539-574.1996>
- Granato, E.T., Harrison, F., Kümmerli, R. & Ross-Gillespie, A.** (2016). Do Bacterial “Virulence Factors” Always Increase Virulence? A Meta-Analysis of Pyoverdine Production in *Pseudomonas aeruginosa* As a Test Case. *Frontiers in Microbiology*, 7(Dec), 1952. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01952>
- Griffin, A.S., West, S.A. & Buckling, A.** (2004). Cooperation and competition in pathogenic bacteria. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature02744>

- Grygorcewicz, B., Roszak, M., Golec, P., Śleboda-Taront, D., Łubowska, N., Górska, M., Jursa-Kulesza, J., Rakoczy, R., Wojciuk, B. & Dołęgowska, B.** (2020). Antibiotics Act with vB\_AbaP\_AGC01 Phage against *Acinetobacter baumannii* in Human Heat-Inactivated Plasma Blood and *Galleria mellonella* Models. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12). <https://doi.org/10.3390/ijms21124390>
- Gupta, V.** (2008). Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and acinetobacter species. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 17(2), 131–143. <https://doi.org/10.1517/13543784.17.2.131>
- Gutiérrez, O., Juan, C., Cercenado, E., Navarro, F., Bouza, E., Coll, P., Pérez, J.L. & Oliver, A.** (2007). Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Spanish Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(12), 4329–4335. <https://doi.org/10.1128/AAC.00810-07>
- Haas, B., Kraut, J., Marks, J., Zanker, S.C. & Castignetti, D.** (1991). Siderophore presence in sputa of cystic fibrosis patients. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/iai.59.11.3997-4000.1991>
- Hahn, H.P.** (1997). The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*. A review. *Gene*, 192(1), 99–108. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00116-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00116-9)
- Halavaty, A.S., Borek, D., Tyson, G.H., Veesenmeyer, J.L., Shuvalova, L., Minasov, G., Otwinowski, Z., Hauser, A.R. & Anderson, W. F.** (2012). Structure of the Type III Secretion Effector Protein ExoU in Complex with Its Chaperone SpcU. *PLoS ONE*, 7(11), e49388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049388>
- Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A.J., Forbes, A., Perkins, A.V., Davey, A.K., Chess-Williams, R., Kiefel, M. J., Arora, D. & Grant, G.D.** (2016). Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 8(8), 236. <https://doi.org/10.3390/toxins8080236>
- Han, X., Kennan, R.M., Davies, J.K., Reddacliff, L.A., Dhungyel, O.P., Whittington, R.J., Turnbull, L., Whitchurch, C. B. & Rood, J.I.** (2008). Twitching motility is essential for virulence in *Dichelobacter nodosus*. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.01807-07>
- Harrison, F., Browning, L. E., Vos, M. & Buckling, A.** (2006). Cooperation and virulence in acute *Pseudomonas aeruginosa* infections. *BMC Biology*, 4(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-4-21>
- Harrison, F. & Buckling, A.** (2005). Hypermutability impedes cooperation in pathogenic bacteria. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.09.048>
- Hashimoto, M., Ma, Y. F., Wang, S. T., Chen, C. S. & Teng, C. H.** (2021). Iron acquisition of urinary tract infection escherichia coli involves pathogenicity in *Caenorhabditis elegans*. *Microorganisms*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020310>

- Hatano, K.** (1996). Role of motility in the endogenous *Pseudomonas aeruginosa* sepsis after burn. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2(4), 240–246. <https://doi.org/10.1007/BF02355121>
- Hauser, A.R.** (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by injection. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 654–665. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2199>
- Hauser, A.R, Cobb, E., Bodí, M., Mariscal, D., Vallés, J., Engel, J. N. & Rello, J.** (2002). Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical Care Medicine*, 30(3), 521–528. <https://doi.org/10.1097/00003246-200203000-00005>
- Hauser, A.R, Jain, M., Bar-Meir, M. & McColley, S. A.** (2011). Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 29–70. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-10>
- Hauser, A. & Rello, J.** (2003). Molecular pathogenesis of acute *Pseudomonas aeruginosa* infections. In A. Hauser & J. Rello (Eds.), *Severe Infections Caused by Pseudomonas aeruginosa*, *Kluwer* (pp. 201–230). Academic/Plenum Press. <https://link.springer.com/content/pdf/bfm%3A978-1-4615-0433-7%2F1.pdf>
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M. & Aderem, A.** (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832), 1099–1103. <https://doi.org/10.1038/35074106>
- Head, N.E. & Yu, H.** (2004). Cross-sectional analysis of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: biofilm formation, virulence, and genome diversity. *Infection and Immunity*, 72(1), 133–144. <https://doi.org/10.1128/iai.72.1.133-144.2004>
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C. & Ala'Aldeen, D.** (2004). Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 692–744. <https://doi.org/10.1128/mubr.68.4.692-744.2004>
- Hocquet, D., Nordmann, P., El Garch, F., Cabanne, L. & Plésiat, P.** (2006). Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1347–1351. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1347-1351.2006>
- Hocquet, D., Vogne, C., El Garch, F., Vejux, A., Gotoh, N., Lee, A., Lomovskaya, O. & Plésiat, P.** (2003). MexXy-OprM efflux pump is necessary for adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(4), 1371–1375. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1371-1375.2003>

- Hogan, D.A. & Kolter, R.** (2002). Pseudomonas-Candida interactions: An ecological role for virulence factors. *Science*, 296(5576), 2229–2232. <https://doi.org/10.1126/science.1070784>
- Hogardt, M. & Heesemann, J.** (2013). Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* to a chronic pathogen of the cystic fibrosis lung. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. [https://doi.org/10.1007/82\\_2011\\_199](https://doi.org/10.1007/82_2011_199)
- Hohlneicher, U., Schäfer, M., Fuchs, R. & Budzikiewicz, H.** (2001). Ferribactins as the biosynthetic precursors of the Pseudomonas siderophores pyoverdins. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section C Journal of Biosciences*. <https://doi.org/10.1515/znc-2001-3-423>
- Holden, V. I. & Bachman, M. A.** (2015). Diverging roles of bacterial siderophores during infection. *Metallomics*, 7(6), 986–995. <https://doi.org/10.1039/c4mt00333k>
- Holland, S., Pulido, J., Shires, T. & Costerton, J.** (1993). *Pseudomonas aeruginosa ocular infections* (I. F. R. Jr (ed.); Pseudomona).
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Stanley, J. & William, S.** (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. In T. W. & W. C. B. Md. (Ed.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed). The Williams & Wilkins Co; Baltimore; Md.
- Horna, G., Amaro, C., Palacios, A., Guerra, H. & Ruiz, J.** (2019). High frequency of the *exoU+*/*exoS+* genotype associated with multidrug-resistant “high-risk clones” of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Peruvian hospitals. *Scientific Reports*, 9(1), 10874. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47303-4>
- Hovey, A.K. & Frank, D.W.** (1995). Analyses of the DNA-binding and transcriptional activation properties of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *Journal of Bacteriology*, 177(15), 4427–4436. <https://doi.org/10.1128/jb.177.15.4427-4436.1995>
- Howell, Heather A., Logan, L. K. & Hauser, A.R.** (2013). Type III Secretion of ExoU Is Critical during Early *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *MBio*, 4(2), e00032-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00032-13>
- Hubbard, E. J. A. & Greenstein, D.** (2005). Introduction to the germ line. In *WormBook: the online review of C. elegans biology* (pp. 1–4). WormBook. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.18.1>
- Hwang, W. & Yoon, S. S.** (2019). Virulence Characteristics and an Action Mode of Antibiotic Resistance in Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37422-9>
- Irazoqui, J. E., Urbach, J. M. & Ausubel, F. M.** (2010). Evolution of host innate defence: Insights from *Caenorhabditis elegans* and primitive invertebrates. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 10, Issue 1, pp. 47–58). Nat Rev Immunol. <https://doi.org/10.1038/nri2689>

- J.Giamarellos-Bourboulis, E., Koussoulas, V., CharalambosPanagou, Adamis, T., Baziaka, F., Skiadas, I., Perrea, D., Dionyssiou-Asteriou, A. & Giamarellou, H. (2004).** Experimental sepsis using *Pseudomonas aeruginosa*: the significance of multi-drug resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(4), 357–361. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.03.025>
- Jabalameli, F., Mirsalehian, A., Khoramian, B., Aligholi, M., Khoramrooz, S. S., Asadollahi, P., Taherikalani, M. & Emaneini, M. (2012).** Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Burns*. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2012.07.030>
- Jalal, S., Ciofu, O., Høiby, N., Gotoh, N. & Wretling, B. (2000).** Molecular Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(3), 710–712. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.710-712.2000>
- Jander, G., Rahme, L. G. & Ausubel, F. M. (2000).** Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *Journal of Bacteriology*, 182(13), 3843–3845. <https://doi.org/10.1128/JB.182.13.3843-3845.2000>
- Jansen, G., Crummenerl, L. L., Gilbert, F., Mohr, T., Pfefferkorn, R., Thänert, R., Rosenstiel, P. & Schulenburg, H. (2015).** Evolutionary transition from pathogenicity to commensalism: Global regulator mutations mediate fitness gains through virulence attenuation. *Molecular Biology and Evolution*, 32(11), 2883–2896. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv160>
- Jarlier, V., Hogberg, L. D., Heuer, O. E., Campos, J., Eckmanns, T., Giske, C. G., Grundmann, H., Johnson, A. P., Kahlmeter, G., Monen, J., Pantosti, A., Rossolini, G. M., Van De Sande Bruinsma, N., Vatopoulos, A., Zabicka, D., Žemličkova, H., Monnet, D. L., Simonsen, G. S., Strauss, R., ... Anderson, E. (2019).** Strong correlation between the rates of intrinsically antibiotic-resistant species and the rates of acquired resistance in Gram-negative species causing bacteraemia, EU/EEA, 2016. *Eurosurveillance*. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.33.1800538>
- Jarrell, K.F. & Kropinski, A.M. (1982).** The virulence of protease and cell surface mutants of *Pseudomonas aeruginosa* for the larvae of *Galleria mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology*. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(82\)90065-9](https://doi.org/10.1016/0022-2011(82)90065-9)
- Jarrell, K.F. & McBride, M.J. (2008).** The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nature Reviews Microbiology*, 6(6), 466–476. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1900>
- Jayaseelan, S., Ramaswamy, D. & Dharmaraj, S. (2014).** Pyocyanin: Production, applications, challenges and new insights. In *World Journal of Microbiology and Biotechnology* (Vol. 30, Issue 4, pp. 1159–1168). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1552-5>



- Jimenez, P.N., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K.B., Cool, R.H. & Quax, W.J.** (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 76(1), 46–65. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05007-11>
- Jorjão, A. L., Oliveira, L. D., Scorzoni, L., Figueiredo-Godoi, L. M. A., Prata, M. C. A., Jorge, A. O. C. & Junqueira, J. C.** (2018). From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. *Virulence*, 9(1), 383–389. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1397871>
- Josenhans, C. & Suerbaum, S.** (2002). The role of motility as a virulence factor in bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(8), 605–614. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00173>
- Jovčić, B., Lepšanović, Z., Begović, J., Filipić, B. & Kojić, M.** (2014). Two copies of bla NDM-1 gene are present in NDM-1 producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Serbia. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(3), 613–618. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0094-z>
- Juan, C., Maciá, M.D., Gutiérrez, O., Vidal, C., Pérez, J.L. & Oliver, A.** (2005). Molecular mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(11), 4733–4738. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.11.4733-4738.2005>
- Juan, C., Moyá, B., Pérez, J.L. & Oliver, A.** (2006). Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level  $\beta$ -lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(5), 1780–1787. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1780-1787.2006>
- Juan, C., Peña, C. & Oliver, A.** (2017). Host and Pathogen Biomarkers for Severe *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 215(suppl\_1), S44–S51. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw299>
- Juan, C., Zamorano, L., Mena, A., Alberti, S., Perez, J. L. & Oliver, A.** (2010). Metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3), 474–478. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp491>
- Juan Nicolau, C. & Oliver, A.** (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas* Carlos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(suppl.1), 19–28. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X10700045>
- Kaiser, S. J., Mutters, N. T., DeRosa, A., Ewers, C., Frank, U. & Günther, F.** (2017). Determinants for persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in hospitals: interplay between resistance, virulence and biofilm formation. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2792-8>

- Kamath, J. M., Britigan, B. E., Cox, C. D. & Shasby, D. M.** (1995). Pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits prostacyclin release from endothelial cells. *Infection and Immunity*, 63(12), 4921–4923.
- Kang, C.-I., Kim, S.-H., Park, W. B., Lee, K.-D., Kim, H.-B., Kim, E.-C., Oh, M.-D. & Choe, K.-W.** (2005). Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 760–766. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.760-766.2005>
- Kang, D., Kirienko, D. R., Webster, P., Fisher, A. L. & Kirienko, N. V.** (2018). Pyoverdine, a siderophore from *Pseudomonas aeruginosa*, translocates into *C. elegans*, removes iron, and activates a distinct host response. *Virulence*, 9(1), 804–817. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1449508>
- Kang, D., Revtovich, A.V., Chen, Q., Shah, K.N., Cannon, C. L. & Kirienko, N. V.** (2019). Pyoverdine-Dependent Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates From Cystic Fibrosis Patients. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2048. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02048>
- Kanost, M. R. & Gorman, M. J.** (2008). Phenoloxidases in Insect Immunity. In *Insect Immunology*. <https://doi.org/10.1016/B978-012373976-6.50006-9>
- Kaszab, E., Radó, J., Kriszt, B., Pászti, J., Lesinszki, V., Szabó, Á., Tóth, G., Khaledi, A. & Szoboszlai, S.** (2019). Groundwater, soil and compost, as possible sources of virulent and antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Environmental Health Research*. <https://doi.org/10.1080/09603123.2019.1691719>
- Kazmierczak, B. I., Schniederberend, M. & Jain, R.** (2015). Cross-regulation of *Pseudomonas* motility systems: the intimate relationship between flagella, pili and virulence. *Current Opinion in Microbiology*, 28, 78–82. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.07.017>
- Kerstens, K., Ludwig, W., Vancanneyt, M., De Vos, P., Gillis, M. & Schleifer, K.-H.** (1996). Recent Changes in the Classification of the Pseudomonads: an Overview. *Systematic and Applied Microbiology*, 19(4), 465–477. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(96\)80020-8](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(96)80020-8)
- Kida, Y., Higashimoto, Y., Inoue, H., Shimizu, T. & Kuwano, K.** (2008). A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF- $\kappa$ B through protease-activated receptors. *Cellular Microbiology*, 10(7), 1491–1504. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01142.x>
- Kim, D.** (2008). Studying host-pathogen interactions and innate immunity in *Caenorhabditis elegans*. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 1(4–5), 205–208. <https://doi.org/10.1242/dmm.000265>
- King, J.D., Kocíncová, D., Westman, E. L. & Lam, J. S.** (2009). Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Innate Immunity* (Vol. 15, Issue 5, pp. 261–312). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/1753425909106436>

- Kipnis, E., Sawa, T. & Wiener-Kronish, J.** (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. In *Medecine et Maladies Infectieuses* (Vol. 36, Issue 2, pp. 78–91). Elsevier Masson. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2005.10.007>
- Kirienko, D.R., Kang, D. & Kirienko, N.V.** (2019). Novel Pyoverdine Inhibitors Mitigate *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 9(JAN), 3317. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03317>
- Kirienko, N.V., Ausubel, F. M. & Ruvkun, G.** (2015). Mitophagy confers resistance to siderophore-mediated killing by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(6), 1821–1826. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424954112>
- Kirienko, N.V., Cezairliyan, B.O., Ausubel, F. M. & Powell, J. R.** (2014). *Pseudomonas aeruginosa* PA14 Pathogenesis in *Caenorhabditis elegans*. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1149, pp. 653–669). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0\\_50](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_50)
- Kirienko, N.V., Kirienko, D.R., Larkins-Ford, J., Wählby, C., Ruvkun, G. & Ausubel, F.M.** (2013). *Pseudomonas aeruginosa* Disrupts *Caenorhabditis elegans* Iron Homeostasis, Causing a Hypoxic Response and Death. *Cell Host & Microbe*, 13(4), 406–416. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.03.003>
- Kirisits, M.J. & Parsek, M.R.** (2006). Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? *Cellular Microbiology*, 8(12), 1841–1849. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00817.x>
- Kiser, T. H., Obritsch, M. D., Jung, R., MacLaren, R. & Fish, D. N.** (2010). Efflux pump contribution to multidrug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmacotherapy*, 30(7), 632–638. <https://doi.org/10.1592/phco.30.7.632>
- Kiska, D. & Gilligan, P.** (2003). *Pseudomonas*. In *In: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A. and Tenover, R.H., Eds., Manual of Clinical Microbiology, 8th Edition, American Society for Microbiology Press, Washington DC* (pp. 719–728.).
- Kitten, T., Kinscherf, T.G., McEvoy, J. L. & Willis, D.K.** (1998). A newly identified regulator is required for virulence and toxin production in *Pseudomonas syringae*. *Molecular Microbiology*, 28(5), 917–929. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00842.x>
- Klockgether, J., Würdemann, D., Reva, O., Wiehlmann, L. & Tümmler, B.** (2007). Diversity of the abundant pKLC102/PAGI-2 family of genomic islands in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 189(6), 2443–2459. <https://doi.org/10.1128/JB.01688-06>
- Koch, G., Nadal-Jimenez, P., Cool, R. H. & Quax, W. J.** (2014). Assessing *Pseudomonas* virulence with Nonmammalian host: *Galleria mellonella*. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1149, pp. 681–688). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0\\_52](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_52)



- Kohler, T., Curty, L.K., Barja, F., Van Delden, C. & Pechere, J.C.** (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of Bacteriology*, 182(21), 5990–5996. <https://doi.org/10.1128/JB.182.21.5990-5996.2000>
- Köhler, T., Dumas, J.L. & Van Delden, C.** (2007). Ribosome Protection Prevents Azithromycin-Mediated Quorum-Sensing Modulation and Stationary-Phase Killing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(12), 4243–4248. <https://doi.org/10.1128/AAC.00613-07>
- Köhler, T., Epp, S. F., Curty, L.K. & Pechère, J. C.** (1999). Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 181(20), 6300–6305. <https://doi.org/10.1128/jb.181.20.6300-6305.1999>
- Köhler, T., Michea-Hamzehpour, M., Plesiat, P., Kahr, A.L. & Pechere, J.C.** (1997). Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(11), 2540–2543. <https://doi.org/10.1128/aac.41.11.2540>
- Kollef, M. H., Shorr, A., Tabak, Y. P., Gupta, V., Liu, L. Z. & Johannes, R. S.** (2005). Epidemiology and outcomes of health-care-associated pneumonia: Results from a large US database of culture-positive pneumonia. *Chest*, 128(6), 3854–3862. <https://doi.org/10.1378/chest.128.6.3854>
- Kong, K.-F., Jayawardena, S. R., Indulkar, S. D., del Puerto, A., Koh, C.-L., Høiby, N. & Mathee, K.** (2005). *Pseudomonas aeruginosa* AmpR Is a Global Transcriptional Factor That Regulates Expression of AmpC and PoxB  $\beta$ -Lactamases, Proteases, Quorum Sensing, and Other Virulence Factors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(11), 4567–4575. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.11.4567-4575.2005>
- Kong, K. F., Jayawardena, S. R., Del Puerto, A., Wiehlmann, L., Laabs, U., Tümmler, B. & Mathee, K.** (2005). Characterization of poxB, a chromosomal-encoded *Pseudomonas aeruginosa* oxacillinase. *Gene*, 358(1–2), 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.05.027>
- Kropinski, A. M. B. & Chadwick, J. S.** (1975). The pathogenicity of rough strains of *Pseudomonas aeruginosa* for *Galleria mellonella*. *Canadian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1139/m75-297>
- Kudoh, I., Wiener-Kronish, J.P., Hashimoto, S., Pittet, J. F. & Frank, D.** (1994). Exoproduct secretions of *Pseudomonas aeruginosa* strains influence severity of alveolar epithelial injury. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 267(5), 11–5. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1994.267.5.l551>
- Kulasekara, B. R., Kulasekara, H. D., Wolfgang, M. C., Stevens, L., Frank, D. W. & Lory, S.** (2006). Acquisition and evolution of the exoU locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 4037–4050. <https://doi.org/10.1128/JB.02000-05>

- Kumari, H., Balasubramanian, D., Zincke, D. & Mathee, K.** (2014). Role of *Pseudomonas aeruginosa* AmpR on  $\beta$ -lactam and non- $\beta$ -lactam transient cross-resistance upon pre-exposure to subinhibitory concentrations of antibiotics. *Journal of Medical Microbiology*, 63(4), 544–555. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.070185-0>
- Kumari, H., Murugapiran, S. K., Balasubramanian, D., Schneper, L., Merighi, M., Sarracino, D., Lory, S. & Mathee, K.** (2014). LTQ-XL mass spectrometry proteome analysis expands the *Pseudomonas aeruginosa* AmpR regulon to include cyclic di-GMP phosphodiesterases and phosphoproteins, and identifies novel open reading frames. *Journal of Proteomics*, 96, 328–342. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.11.018>
- Kung, V.L., Ozer, E.A. & Hauser, A.R.** (2010). The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(4), 621–641. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00027-10>
- Kurz, C.L. & Ewbank, J.J.** (2000). *Caenorhabditis elegans* for the study of host-pathogen interactions. In *Trends in Microbiology* (Vol. 8, Issue 3, pp. 142–144). Elsevier Current Trends. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01691-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01691-1)
- Kus, J.V., Tullis, E., Cvitkovitch, D. G. & Burrows, L.L.** (2004). Significant differences in type IV pilin allele distribution among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis (CF) versus non-CF patients. *Microbiology*, 150(5), 1315–1326. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26822-0>
- Kwadha, C.A., Ong'amo, G.O., Ndegwa, P.N., Raina, S.K. & Fombong, A.T.** (2017). The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. *Insects*, 8(2), 61. <https://doi.org/10.3390/insects8020061>
- Lamont, I. L., Beare, P. A., Ochsner, U., Vasil, A. I. & Vasil, M. L.** (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.092016999>
- Lange, A., Beier, S., Huson, D. H., Parusel, R., Iglauer, F. & Frick, J. S.** (2018). Genome sequence of *Galleria mellonella* (greater wax moth). *Genome Announcements*, 6(2). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01220-17>
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P. & Lazdunski, A.** (1996). A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhlR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Molecular Microbiology*, 21(6), 1137–1146. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.00063.x>
- Lau, G.W., Goumnerov, B. C., Walendziewicz, C.L., Hewitson, J., Xiao, W., Mahajan-Miklos, S., Tompkins, R. G., Perkins, L. A. & Rahme, L. G.** (2003). The *Drosophila melanogaster* Toll Pathway Participates in Resistance to Infection by the Gram-Negative Human Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 71(7), 4059–4066. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.7.4059-4066.2003>

- Lau, G.W., Hassett, D.J., Ran, H. & Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine*, 10(12), 599–606. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.10.002>
- Lavine, M.D. & Strand, M.R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10), 1295–1309. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9)
- Le Gall, J. R., Loirat, P., Alperovitch, A., Glaser, P., Granthil, C., Mathieu, D., Mercier, P., Thomas, R. & Villers, D. (1984). A simplified acute physiology score for ICU patients. *Critical Care Medicine*, 12(11), 975–977. <https://doi.org/10.1097/00003246-198411000-00012>
- Lee, J., Wu, J., Deng, Y., Wang, J., Wang, C., Wang, J., Chang, C., Dong, Y., Williams, P. & Zhang, L.H. (2013). A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nature Chemical Biology*, 9(5), 339–343. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1225>
- Lee, J. & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, 6(1), 26–41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
- Lee, V.T., Smith, R.S., Tümmler, B. & Lory, S. (2005). Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the type III secretion system in vitro and during infection. *Infection and Immunity*, 73(3), 1695–1705. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.3.1695-1705.2005>
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/Cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86(6), 973–983. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80172-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80172-5)
- Leoni, L., Ciervo, A., Orsi, N. & Visca, P. (1996). Iron-regulated transcription of the *pvdA* gene in *Pseudomonas aeruginosa*: Effect of *fur* and *PvdS* on promoter activity. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/jb.178.8.2299-2313.1996>
- Li, X & Nikaido, H. (2004). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 64(2), 159–204. <https://doi.org/10.2165/00003495-200464020-00004>
- Li, X, Plésiat, P. & Nikaido, H. (2015). The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 337–418. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>
- Li, Xi, Poole, K. & Nikaido, H. (2003). Contributions of MexAB-OprM and an EmrE Homolog to Intrinsic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Aminoglycosides and Dyes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 27–33. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.27-33.2003>

- Linares, J.F., López, J.A., Camafeita, E., Albar, J.P., Rojo, F. & Martínez, J.L.** (2005). Overexpression of the Multidrug Efflux Pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN Is Associated with a Reduction of Type III Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Of Bacteriology*, 187(4), 1384–1391. <https://doi.org/10.1128/JB.187.4.1384-1391.2005>
- Lints, R. & Hall, D.H** (2009). Reproductive system. In *WormAtlas*. <https://www.wormatlas.org/>
- Lister, P.D., Wolter, D.J. & Hanson, N.D.** (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 582–610. <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>
- Liu, K.S. & Sternberg, P.W.** (1995). Sensory Regulation of Male Mating Behavior in *Caenorhabditis elegans*. In *Neuron* (Vol. 14).
- Livermore, D.** (1995).  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(4), 557–584. <https://doi.org/10.1128/cmr.8.4.557>
- Livermore, D.** (2002). Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? *Clinical Infectious Diseases*, 34(5), 634–640. <https://doi.org/10.1086/338782>
- Llanes, C., Hocquet, D., Vogne, C., Benali-Baitich, D., Neuwirth, C. & Plésiat, P.** (2004). Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Overproducing MexAB-OprM and MexXY Efflux Pumps Simultaneously. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.5.1797-1802.2004>
- Lodge, J., Busby, S. & Piddock, L.** (1993). Investigation of the *Pseudomonas aeruginosa* ampR gene and its role at the chromosomal ampC  $\beta$ -lactamase promoter. *FEMS Microbiology Letters*, 111(2–3), 315–319. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06404.x>
- Lodge, J., Minchin, S. D., Piddock, L. J. V & Busby, S. J. W.** (1990). Cloning, sequencing and analysis of the structural gene and regulatory region of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal ampC  $\beta$ -lactamase. *Biochemical Journal*, 272(3), 627–631. <https://doi.org/10.1042/bj2720627>
- López-Causapé, C., Cabot, G., del Barrio-Tofiño, E. & Oliver, A.** (2018). The Versatile Mutational Resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 9(APR), 685. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00685>
- López-Causapé, C., de Dios-Caballero, J., Cobo, M., Escribano, A., Asensio, Ó., Oliver, A., del Campo, R., Cantón, R., Solé, A., Cortell, I., Asensio, O., García, G., Martínez, M. T., Cols, M., Salcedo, A., Vázquez, C., Baranda, F., Girón, R., Quintana, E., ... Cantón, R.** (2017). Antibiotic resistance and population structure of cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a Spanish multi-centre study. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 50(3), 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.03.034>

- López-Causapé, C., Rojo-Moliner, E., Mulet, X., Cabot, G., Moyà, B., Figuerola, J., Togores, B., Pérez, J. L. & Oliver, A.** (2013). Clonal Dissemination, Emergence of Mutator Lineages and Antibiotic Resistance Evolution in *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Chronic Lung Infection. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071001>
- Lopez-Medina, E., Fan, D., Coughlin, L. A., Ho, E. X., Lamont, I. L., Reimann, C., Hooper, L. V. & Koh, A. Y.** (2015). *Candida albicans* Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Virulence through Suppression of Pyochelin and Pyoverdine Biosynthesis. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005129>
- López Hernández, Y., Yero, D., Pinos-Rodríguez, J. M. & Gibert, I.** (2015). Animals devoid of pulmonary system as infection models in the study of lung bacterial pathogens. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 6, Issue FEB). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00038>
- Lu, Q., Eggimann, P., Luyt, C. E., Wolff, M., Tamm, M., François, B., Mercier, E., Garbino, J., Laterre, P. F., Koch, H., Gafner, V., Rudolf, M. P., Mus, E., Perez, A., Lazar, H., Chastre, J. & Rouby, J. J.** (2014). *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: Prevalence and clinical outcomes. *Critical Care*, 18(1), R17. <https://doi.org/10.1186/cc13697>
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L. & Pier, G. B.** (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: Lessons from a versatile opportunist. In *Microbes and Infection* (Vol. 2, Issue 9, pp. 1051–1060). Elsevier Masson SAS. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01259-4](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01259-4)
- Lynch, J. P.** (2001). Hospital-acquired pneumonia: Risk factors, microbiology, and treatment. In *Chest* (Vol. 119, Issue 2 SUPPL., pp. 373S–384S). American College of Chest Physicians. [https://doi.org/10.1378/chest.119.2\\_suppl.373s](https://doi.org/10.1378/chest.119.2_suppl.373s)
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M. R., Bayles, K. & Wozniak, D. J.** (2009). Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *PLoS Pathogens*, 5(3), e1000354. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000354>
- Macía, M. D., Blanquer, D., Togores, B., Sauleda, J., Pérez, J. L. & Oliver, A.** (2005). Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3382-3386.2005>
- Maddocks, S. E. & Oyston, P. C. F.** (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*, 154(12), 3609–3623. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/022772-0>



- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T. & Monnet, D. L.** (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Mahajan-Miklos, S., Tan, M.-W., Rahme, L. G. & Ausubel, F. M.** (1999). Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence Elucidated Using a *Pseudomonas aeruginosa*–*Caenorhabditis elegans* Pathogenesis Model. *Cell*, 96(1), 47–56. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80958-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80958-7)
- Maldonado, R. F., Sá-Correia, I. & Valvano, M. A.** (2016). Lipopolysaccharide modification in gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), 480–493. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw007>
- Mandell, G., Dolin, R. & Bennett, J.** (2009). Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.*, Ed. 7.
- Mark, B. L., Vocadlo, D. J. & Oliver, A.** (2011). Providing beta-lactams a helping hand: targeting the AmpC beta-lactamase induction pathway. *Future Microbiol*, 6(12), 1415–1427. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.128>
- Martínez-Ramos, I., Mulet, X., Moyá, B., Barbier, M., Oliver, A. & Albertí, S.** (2014). Overexpression of MexCD-OprJ Reduces *Pseudomonas aeruginosa* Virulence by Increasing Its Susceptibility to Complement-Mediated Killing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(4), 2426–2429. <https://doi.org/10.1128/AAC.02012-13>
- Marvig, R. L., Sommer, L. M., Molin, S. & Johansen, H. K.** (2015). Convergent evolution and adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* within patients with cystic fibrosis. *Nature Genetics*, 47(1), 57–64. <https://doi.org/10.1038/ng.3148>
- Maseda, H., Sawada, I., Saito, K., Uchiyama, H., Nakae, T. & Nomura, N.** (2004). Enhancement of the mexAB-oprM Efflux Pump Expression by a Quorum-Sensing Autoinducer and Its Cancellation by a Regulator, MexT, of the mexEF-oprN Efflux Pump Operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(4), 1320–1328. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.4.1320-1328.2004>
- Masuda, N., Sakagawa, E. & Ohya, S.** (1995). Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.3.645>
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H. & Nishino, T.** (2000). Contribution of the MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(9), 2242–2246. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.9.2242-2246.2000>

- Mattick, J. S.** (2002). Type IV Pili and Twitching Motility. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 289–314. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160938>
- Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G. & Thomashow, L. S.** (2001). Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 183(21), 6454–6465. <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6454-6465.2001>
- McCaw, M. L., Lykken, G. L., Singh, P. K. & Yahr, T. L.** (2002). ExsD is a negative regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion regulon. *Molecular Microbiology*, 46(4), 1123–1133. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03228.x>
- McGrath, S., Wade, D. S. & Pesci, E. C.** (2004). Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *FEMS Microbiology Letters*, 230(1), 27–34. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00849-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00849-8)
- McManus, A. T., Mason, A. D., McManus, W. F. & Pruitt, B. A.** (1985). Twenty-five year review of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in a burn center. *European Journal of Clinical Microbiology*, 4(2), 219–223. <https://doi.org/10.1007/BF02013601>
- McMorran, B., Town, L., Costelloe, E., Palmer, J., Engel, J., Hume, D. & Wainwright, B.** (2003). Effector ExoU from the Type III Secretion System Is an Important Modulator of Gene Expression in Lung Epithelial Cells in Response to *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Infection and Immunity*, 71(10), 6035–6044. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.6035-6044.2003>
- Means, T. K. & Aballay, A.** (2011). Models to study ancient host-pathogen interactions: Lessons from Crete. *EMBO Reports*, 12(1), 5–7. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.205>
- Medina-Rojas, M., Stribling, W., Snesrud, E., Garry, B. I., Li, Y., Gann, P. M., Demons, S. T., Tyner, S. D., Zurawski, D. V. & Antonic, V.** (2020). Comparison of *Pseudomonas aeruginosa* strains reveals that Exolysin A toxin plays an additive role in virulence. *Pathogens and Disease*, 78(1). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftaa010>
- Mesquita, C. S., Soares-Castro, P. & Santos, P. M.** (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: phenotypic flexibility and antimicrobial resistance. In *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (pp. 650–665). <https://doi.org/10.13140/2.1.3099.2167>
- Meyer, J.M.** (2000). Proverdines: Pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent pseudomonas species. In *Archives of Microbiology* (Vol. 174, Issue 3, pp. 135–142). Arch Microbiol. <https://doi.org/10.1007/s002030000188>

- Meyer, J.M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C. & Holder, I. A.** (1996). Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/iai.64.2.518-523.1996>
- Meyer, J.M., Stintzi, A., De Vos, D., Cornelis, P., Tappe, R., Taraz, K. & Budzikiewicz, H.** (1997). Use of siderophores to type pseudomonads: The three *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine systems. *Microbiology*, 143(1), 35–43. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-1-35>
- Migula, N.** (1984). *Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe*. 1, 235–238.
- Millan, A. S., Toll-Riera, M., Qi, Q. & MacLean, R.C.** (2015). Interactions between horizontally acquired genes create a fitness cost in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Communications*, 6(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms7845>
- Miller, G. H., Sabatelli, F. J., Hare, R. S., Glupczynski, Y., Mackey, P., Shlaes, D., Shimizu, K. & Shaw, K.J.** (1997). The Most Frequent Aminoglycoside Resistance Mechanisms—Changes with Time and Geographic Area: A Reflection of Aminoglycoside Usage Patterns? In *Clinical Infectious Diseases* (Vol. 24, Issue 1). [https://academic.oup.com/cid/article-abstract/24/Supplement\\_1/S46/283544](https://academic.oup.com/cid/article-abstract/24/Supplement_1/S46/283544)
- Minandri, F., Imperi, F., Frangipani, E., Bonchi, C., Visaggio, D., Facchini, M., Pasquali, P., Bragonzi, A. & Visca, P.** (2016). Role of iron uptake systems in *Pseudomonas aeruginosa* virulence and airway infection. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.00098-16>
- Mitov, I., Strateva, T. & Markova, B.** (2010). Prevalence of virulence genes among bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3), 588–595. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000300008>
- Miyata, S., Casey, M., Frank, D. W., Ausubel, F. M. & Drenkard, E.** (2003). Use of the *Galleria mellonella* Caterpillar as a Model Host To Study the Role of the Type III Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenesis. *Infection and Immunity*, 71(5), 2404–2413. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2404-2413.2003>
- Bonten, M.J., Bergmans, D.C., Hoepelman, I.M., Stobberingh, E.E.** (1999). Ventilator-associated pneumonia; controversies with respect to diagnosis, pathogenesis, therapy and prevention. *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde*, 143(14), 726–730.
- Montie, T.C., Doyle-Huntzinger, D., Craven, R.C. & Holder, I.A.** (1982). Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of *Pseudomonas aeruginosa* in the burned-mouse model. *Infection and Immunity*, 38(3), 1296–1298. <https://doi.org/10.1128/IAI.38.3.1296-1298.1982>



- Morales-Espinosa, R., Delgado, G., Espinosa, L. F., Isselo, D., Méndez, J. L., Rodríguez, C., Miranda, G. & Cravioto, A.** (2017). Fingerprint Analysis and Identification of Strains ST309 as a Potential High Risk Clone in a *Pseudomonas aeruginosa* Population Isolated from Children with Bacteremia in Mexico City. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAR), 313. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00313>
- Morita, Y., Cao, L., Gould, V. C., Avison, M. B. & Poole, K.** (2006). nalD encodes a second repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.01342-06>
- Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C. A., Goodman, A. L., Joachimiak, G., Ordoñez, C. L., Lory, S., Walz, T., Joachimiak, A. & Mekalanos, J. J.** (2006). A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*, 312(5779), 1526–1530. <https://doi.org/10.1126/science.1128393>
- Moya, B., Dötsch, A., Juan, C., Blázquez, J., Zamorano, L., Haussler, S. & Oliver, A.** (2009).  $\beta$ -Lactam Resistance Response Triggered by Inactivation of a Nonessential Penicillin-Binding Protein. *PLoS Pathogens*, 5(3), e1000353. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000353>
- Moya, B., Juan, C., Albertí, S., Pérez, J. L. & Oliver, A.** (2008). Benefit of having multiple ampD genes for acquiring  $\beta$ -lactam resistance without losing fitness and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(10), 3694–3700. <https://doi.org/10.1128/AAC.00172-08>
- Mulet, X., Cabot, G., Ocampo-Sosa, A. A., Domínguez, M. A., Zamorano, L., Juan, C., Tubau, F., Rodríguez, C., Moyà, B., Peña, C., Martínez-Martínez, L. & Oliver, A.** (2013). Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(11), 5527–5535. <https://doi.org/10.1128/AAC.01481-13>
- Mulet, X., Maciá, M. D., Mena, A., Juan, C., Pérez, J. L. & Oliver, A.** (2009). Azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Bactericidal Activity and Selection of nfxB Mutants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(4), 1552–1560. <https://doi.org/10.1128/AAC.01264-08>
- Murray, T. S., Ledizet, M. & Kazmierczak, B.I.** (2010). Swarming motility, secretion of type 3 effectors and biofilm formation phenotypes exhibited within a large cohort of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.017715-0>
- Mylonakis, E., Ausubel, F. M., Perfect, J.R., Heitman, J. & Calderwood, S. B.** (2002). Killing of *Caenorhabditis elegans* by Cryptococcus neoformans as a model of yeast pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15675–15680. <https://doi.org/10.1073/pnas.232568599>
- Naito, Y., Moriyama, K. & Sawa, T.** (2017). Anti-PerV Immunization for *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia in Cystic Fibrosis. In *Progress in Understanding Cystic Fibrosis*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69767>

- Navas, A., Cobas, G., Talavera, M., Ayala, J. A., López, J. A. & Martínez, J. L. (2007). Experimental validation of Haldane's hypothesis on the role of infection as an evolutionary force for Metazoans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(34), 13728–13731. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704497104>
- Nguyen, D. & Singh, P.K. (2006). Evolving stealth: Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(22), 8305–8306. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602526103>
- O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Rasmussen, G. T., Abdalla, M. Y., Denning, G. M. & Britigan, B. E. (2003). The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285(5), L1077–L1086. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00198.2003>
- O'Toole, G. A. & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), 295–304. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x>
- Ocampo-Sosa, A. A., Cabot, G., Rodríguez, C., Roman, E., Tubau, F., Macia, M. D., Moya, B., Zamorano, L., Suárez, C., Peña, C., Domínguez, M. A., Moncalián, G., Oliver, A. & Martínez-Martínez, L. (2012). Alterations of OprD in Carbapenem-Intermediate and -Susceptible Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients with Bacteremia in a Spanish Multicenter Study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 1703–1713. <https://doi.org/10.1128/AAC.05451-11>
- Ochs, M.M., McCusker, M.P., Bains, M. & Hancock, R.E.W. (1999). Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/aac.43.5.1085>
- Ochsner, U.A., Johnson, Z., Lamont, I.L., Cunliffe, H.E. & Vasil, M.L. (1996). Exotoxin A production in *Pseudomonas aeruginosa* requires the iron-regulated pvdS gene encoding an alternative sigma factor. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.481425.x>
- Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F. & Blázquez, J. (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.288.5469.1251>
- Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C. & Juan, C. (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resistance Updates*, 21–22(22), 41–59. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.08.002>
- Olson, J.C. & Ohman, D.E. (1992). Efficient production and processing of elastase and LasA by *Pseudomonas aeruginosa* require zinc and calcium ions. *Journal of Bacteriology*, 174(12), 4140–4147. <https://doi.org/10.1128/jb.174.12.4140-4147.1992>

- Overhage, J., Bains, M., Brazas, M. D. & Hancock, R.E.W.** (2008). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 190(8), 2671–2679. <https://doi.org/10.1128/JB.01659-07>
- Page, M.G.P.** (2019). The Role of Iron and Siderophores in Infection, and the Development of Siderophore Antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz825>
- Palleroni, N.** (1992). *Introduction to the Pseudomonadaceae*. In: *The Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria, Ecophysiology, Isolation, Identification and Applications (Vol. III, 2nd edn. pp. 3071–3085)* (N. Y. Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. (eds.) Springer (ed.)). <https://www.scienceopen.com/document?vid=f30f36f8-09d7-40af-bcd1-8c99ff5512fa>
- Palleroni, N., Kunisawa, R., Contopoulou, R. & Doudoroff, M.** (1973). Nucleic Acid Homologies in the Genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 23(4), 333–339. <https://doi.org/10.1099/00207713-23-4-333>
- Pan, Y., Xu, Y., Wang, Z., Fang, Y. & Shen, J.** (2016). Overexpression of MexAB-OprM efflux pump in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Microbiology*, 198(6), 565–571. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1215-7>
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B.R., Lin, T.J. & Cheng, Z.** (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Park, H.E.H., Jung, Y. & Lee, S.J.V.** (2017). Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. In *Molecules and Cells* (Vol. 40, Issue 2, pp. 90–99). Korean Society for Molecular and Cellular Biology. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0017>
- Parkins, M.D., Ceri, H. & Storey, D.G.** (2001). *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 40(5), 1215–1226. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02469.x>
- Parsot, C., Hamiaux, C. & Page, A. L.** (2003). The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. In *Current Opinion in Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00002-4)
- Pastrana, D.V, Hanson, A.J., Knisely, J., Bu, G. & Fitzgerald, D.J.** (2005). *Rapid report LRP1B functions as a receptor for Pseudomonas exotoxin*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.06.007>
- Paul, D., Dhar, D., Maurya, A. P., Mishra, S., Sharma, G. D., Chakravarty, A. & Bhattacharjee, A.** (2016). Occurrence of co-existing bla VIM-2 and bla NDM-1 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from India. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 15(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s12941-016-0146-0>

- Peabody, C. R., Chung, Y. J., Yen, M. R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A. P. & Saier, M. H. (2003). Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology*, 149(11), 3051–3072. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26364-0>
- Peek, M.E., Bhatnagar, A., McCarty, N.A. & Zughair, S.M. (2012). Pyoverdine, the Major Siderophore in *Pseudomonas aeruginosa*, Evades NGAL Recognition. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2012/843509>
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H. & Velázquez, E. (2009). Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. In *Infection, Genetics and Evolution* (Vol. 9, Issue 6, pp. 1132–1147). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.08.001>
- Peña, C., Cabot, G., Gomez-Zorrilla, S., Zamorano, L., Ocampo-Sosa, A., Murillas, J., Almirante, B., Pomar, V., Aguilar, M., Granados, A., Calbo, E., Rodríguez-Bano, J., Rodríguez-Lopez, F., Tubau, F., Martínez-Martínez, L., Oliver, A., Gurgui, M., Sorde, R., Larrosa, N., ... Rivero, A. (2015). Influence of Virulence Genotype and Resistance Profile in the Mortality of *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 60(4), 539–548. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu866>
- Peña, C., Suarez, C., Gozalo, M., Murillas, J., Almirante, B., Pomar, V., Aguilar, M., Granados, A., Calbo, E., Rodríguez-Baño, J., Rodríguez, F., Tubau, F., Martínez-Martínez, L. & Oliver, A. (2012). Prospective multicenter study of the impact of carbapenem resistance on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(3), 1265–1272. <https://doi.org/10.1128/AAC.05991-11>
- Peña, C., Suarez, C., Ocampo-Sosa, A., Murillas, J., Almirante, B., Pomar, V., Aguilar, M., Granados, A., Calbo, E., Rodríguez-Baño, J., Rodríguez, F., Tubau, F., Oliver, A. & Martínez-Martínez, L. (2013). Effect of Adequate Single-Drug vs Combination Antimicrobial Therapy on Mortality in *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections: A Post Hoc Analysis of a Prospective Cohort. *Clinical Infectious Diseases*, 57(2), 208–216. <https://doi.org/10.1093/cid/cit223>
- Peña, C., Suarez, C., Tubau, F., Gutierrez, O., Domínguez, A., Oliver, A., Pujol, M., Gudiol, F. & Ariza, J. (2007). Nosocomial spread of *Pseudomonas aeruginosa* producing the metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in a Spanish hospital: clinical and epidemiological implications. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(10), 1026–1029. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01784.x>
- Pereira, T.C., Barros, P. P. de, de Oliveira Fugisaki, L. R., Rossoni, R.D., Ribeiro, F. de C., Menezes, R.T. de, Junqueira, J.C. & Scorzoni, L. (2018). Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. In *Journal of Fungi* (Vol. 4, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/jof4040128>

- Pérez-Gallego, M., Torrens, G., Castillo-Vera, J., Moya, B., Zamorano, L., Cabot, G., Hultenby, K., Albertí, S., Mellroth, P., Henriques-Normark, B., Normark, S., Oliver, A. & Juan, C. (2016). Impact of AmpC Derepression on Fitness and Virulence: the Mechanism or the Pathway? *MBio*, 7(5), 01783–01716. <https://doi.org/10.1128/mBio.01783-16>
- Pérez-Varela, M., Corral, J., Vallejo, J. A., Rumbo-Feal, S., Bou, G., Aranda, J. & Barbé, J. (2017). Mutations in the  $\beta$ -subunit of the RNA polymerase impair the surface-associated motility and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.00327-17>
- Perron, G.G., Hall, A.R. & Buckling, A. (2010). Hypermutability and compensatory adaptation in antibiotic-resistant bacteria. *American Naturalist*. <https://doi.org/10.1086/655217>
- Pesci, E.C., Milbank, J.B.J., Pearson, J.P., Mcknight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P. & Iglewski, B.H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 11229–11234. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11229>
- Pesci, E.C., Pearson, J.P., Seed, P.C. & Iglewski, B.H. (1997). Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 179(10), 3127–3132. <https://doi.org/10.1128/jb.179.10.3127-3132.1997>
- Pessi, G., Williams, F., Hindle, Z., Heurlier, K., Holden, M. T. G., Cámara, M., Haas, D. & Williams, P. (2001). The global postranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 183(22), 6676–6683. <https://doi.org/10.1128/JB.183.22.6676-6683.2001>
- Phillips, R.M., Six, D. A., Dennis, E. A. & Ghosh, P. (2003). In Vivo Phospholipase Activity of the *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin ExoU and Protection of Mammalian Cells with Phospholipase A2 Inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302472200>
- Piddock, L.J.V. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 19, Issue 2, pp. 382–402). American Society for Microbiology Journals. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.382-402.2006>
- Pirnay, J.-P., Bilocq, F., Pot, B., Cornelis, P., Zizi, M., Van Eldere, J., Deschaght, P., Vanechoutte, M., Jennes, S., Pitt, T. & De Vos, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* Population Structure Revisited. *PLoS ONE*, 4(11), e7740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007740>
- Poirel, L., Weldhagen, G. F., Naas, T., De Champs, C., Dove, M. G. & Nordmann, P. (2001). GES-2, a class A  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(9), 2598–2603. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.9.2598-2603.2001>



- Pollack, M.** (1984). The virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Reviews of Infectious Diseases*, 6 Suppl 3, 617–626. [https://doi.org/10.1093/clinids/6.supplement\\_3.s617](https://doi.org/10.1093/clinids/6.supplement_3.s617)
- Poole, K.** (2001). Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3(2), 255–264. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11321581/>
- Poole, K** (2005). Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 49, Issue 2, pp. 479–487). American Society for Microbiology Journals. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.479-487.2005>
- Poole, K** (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to the Max. *Frontiers in Microbiology*, 2(APR), 65. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00065>
- Poole, K, Gotoh, N., Tsujimoto, H., Zhao, Q., Wada, A., Yamasaki, T., Neshat, S., Yamagishi, J., Li, X. & Nishino, T.** (1996). Overexpression of the mexC–mexD–oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 21(4), 713–725. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.281397.x>
- Poole, K, Tetro, K., Zhao, Q., Neshat, S., Heinrichs, D. E. & Bianco, N.** (1996). Expression of the multidrug resistance operon mexA-mexB-oprM in *Pseudomonas aeruginosa*: mexR encodes a regulator of operon expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(9), 2021–2028. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.9.2021>
- Potron, A., Poirel, L. & Nordmann, P.** (2015). Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. In *International Journal of Antimicrobial Agents*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001>
- Powell, J.R. & Ausubel, F.M.** (2008). Models of *Caenorhabditis elegans* infection by bacterial and fungal pathogens. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 415, 403–427. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-570-1\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-570-1_24)
- Prithviraj, B., Bais, H. P., Weir, T., Suresh, B., Najarro, E.H., Dayakar, B.V., Schweizer, H.P. & Vivanco, J.M.** (2005). Down regulation of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by salicylic acid attenuates its virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5319-5328.2005>
- Pritt, B., O'Brien, L. & Winn, W.** (2007). Mucoid *Pseudomonas* in Cystic Fibrosis. *American Journal of Clinical Pathology*, 128(1), 32–34. <https://doi.org/10.1309/KJRPC7DD5TR9NTDM>
- Rabin, S.D.P. & Hauser, A.R.** (2005). Functional regions of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU. *Infection and Immunity*, 73(1), 573–582. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.1.573-582.2005>

- Rada, B.** (2017). Neutrophil extracellular trap release driven by bacterial motility: Relevance to cystic fibrosis lung disease. *Communicative & Integrative Biology*, 10(2), e1296610. <https://doi.org/10.1080/19420889.2017.1296610>
- Rahme, L. G., Stevens, E. J., Wolfort, S. F., Shao, J., Tompkins, R. G. & Ausubel, F. M.** (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*, 268(5219), 1899–1902. <https://doi.org/10.1126/science.7604262>
- Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C. & Lereclus, D.** (2012). The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 70(70), e4392. <https://doi.org/10.3791/4392>
- Ran, H., Hassett, D.J. & Lau, G.W.** (2003). Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(SUPPL. 2), 14315–14320. <https://doi.org/10.1073/pnas.2332354100>
- Rang, H.P. & Hill, R.G.** (2012). Assessing drug safety. In *Drug Discovery and Development: Technology in Transition* (pp. 211–225). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4299-7.00015-9>
- Rangel, S. M., Diaz, M.H., Knoten, C.A., Zhang, A. & Hauser, A.R.** (2015). The Role of ExoS in Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* during Pneumonia. *PLoS Pathogens*, 11(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004945>
- Rashid, M.H. & Kornberg, A.** (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), 4885–4890. <https://doi.org/10.1073/pnas.060030097>
- Rashid, M.I., Andleeb, S. & Ali, A.** (2020). Evaluation of Pyocyanin induced systemic pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33(3), 915–922. <https://doi.org/10.36721/PJPS.2020.33.3.REG.915-922.1>
- Read, R. C., Roberts, P., Munro, N., Rutman, A., Hastie, A., Shryock, T., Hall, R., McDonald-Gibson, W., Lund, V., Taylor, G., Cole, P. J. & Wilson, R.** (1992). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *Journal of Applied Physiology*, 72(6), 2271–2277. <https://doi.org/10.1152/jappl.1992.72.6.2271>
- Recio, R., Mancheño, M., Viedma, E., Villa, J., Orellana, M. a. A., Lora-Tamayo, J. & Chaves, F.** (2020). Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and impact of antimicrobial resistance and bacterial virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(2). <https://doi.org/10.1128/AAC.01759-19>
- Recio, R., Sánchez-Diener, I., Viedma, E., Meléndez-Carmona, M. Á., Villa, J., Orellana, M. Á., Mancheño, M., Juan, C., Zamorano, L., Lora-Tamayo, J., Chaves, F. & Oliver, A.** (2020). Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia isolates in a high-endemicity setting for ST175 and ST235 high-risk clones. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 39(4), 671–678. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03780-z>

- Recio, R., Villa, J., Viedma, E., Orellana, M. Á., Lora-Tamayo, J. & Chaves, F.** (2018). Bacteraemia due to extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 high-risk clone: Facing the perfect storm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(2), 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.018>
- Reid, D. W., Lam, Q. T., Schneider, H. & Walters, E. H.** (2004). Airway iron and iron-regulatory cytokines in cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*. <https://doi.org/10.1183/09031936.04.00104803>
- Reid, D. W., Withers, N. J., Francis, L., Wilson, J. W. & Kotsimbos, T. C.** (2002). Iron deficiency in cystic fibrosis: Relationship to lung disease severity and chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Chest*. <https://doi.org/10.1378/chest.121.1.48>
- Renwick, J., Reeves, E. P., Wientjes, F. B. & Kavanagh, K.** (2007). Translocation of proteins homologous to human neutrophil p47phox and p67phox to the cell membrane in activated hemocytes of *Galleria mellonella*. *Developmental and Comparative Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2006.06.007>
- Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J. & Priess, J. R.** (1997). Introduction to *C. elegans*. In *C. elegans II* (p. Chapter 1). Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21413243/>
- Riera, E., Cabot, G., Mulet, X., García-Castillo, M., del Campo, R., Juan, C., Cantón, R. & Oliver, A.** (2011). *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: Impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(9), 2022–2027. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr232>
- Rietsch, A., Vallet-Gely, I., Dove, S. L. & Mekalanos, J. J.** (2005). ExsE, a secreted regulator of type III secretion genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(22), 8006–8011. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503005102>
- Robertson, L.A., Cornelisse, R., De Vos, P., Hadjioetomo, R. & Kuenen, J.G.** (1989). Aerobic denitrification in various heterotrophic nitrifiers. *Antonie van Leeuwenhoek*, 56(4), 289–299. <https://doi.org/10.1007/BF00443743>
- Rocha, A. J., De Oliveira Barsottini, M.R., Rocha, R.R., Laurindo, M. V., De Moraes, F.L.L. & Da Rocha, S.L.** (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: Virulence factors and antibiotic resistance Genes. In *Brazilian Archives of Biology and Technology* (Vol. 62, pp. 1–15). Instituto de Tecnologia do Parana. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180503>
- Rodríguez-Rojas, A., Mena, A., Martín, S., Borrell, N., Oliver, A. & Blázquez, J.** (2009). Inactivation of the hmgA gene of *Pseudomonas aeruginosa* leads to pyomelanin hyperproduction, stress resistance and increased persistence in chronic lung infection. *Microbiology*, 155(4), 1050–1057. <https://doi.org/10.1099/mic.0.024745-0>



- Rosado, D., Natera, C., Rivero, A., & Torre-Cisneros, A.J** (2010). Infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* Infecciones por bacilos gramnegativos no fermentadores (II): *Pseudomonas aeruginosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*. In *Medicine* (Vol. 10, Issue 52). [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(10\)70067-6](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(10)70067-6)
- Ross-Gillespie, A., Weigert, M., Brown, S. P. & Kümmerli, R.** (2014). Gallium-mediated siderophore quenching as an evolutionarily robust antibacterial treatment. *Evolution, Medicine and Public Health*. <https://doi.org/10.1093/emph/eou003>
- Rossi Gonçalves, I., Dantas, R. C. C., Ferreira, M. L., Batistão, D. W. da F., Gontijo-Filho, P. P. & Ribas, R.M.** (2017). Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(2), 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.11.004>
- Roy-Burman, A., Savel, R. H., Racine, S., Swanson, B. L., Revadigar, N.S., Fujimoto, J., Sawa, T., Frank, D. W. & Wiener-Kronish, J. P.** (2001). Type III Protein Secretion Is Associated with Death in Lower Respiratory and Systemic *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(12), 1767–1774. <https://doi.org/10.1086/320737>
- Rubin, J. & Yu, V.L.** (1988). Malignant external otitis: Insights into pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and therapy. In *The American Journal of Medicine* (Vol. 85, Issue 3 C, pp. 391–398). *Am J Med*. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(88\)90592-X](https://doi.org/10.1016/0002-9343(88)90592-X)
- Saiga, H., Nishimura, J., Kuwata, H., Okuyama, M., Matsumoto, S., Sato, S., Matsumoto, M., Akira, S., Yoshikai, Y., Honda, K., Yamamoto, M. & Takeda, K.** (2008). Lipocalin 2-Dependent Inhibition of Mycobacterial Growth in Alveolar Epithelium. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8521>
- Saito, K., Yoneyama, H. & Nakae, T.** (1999). *nalB* -type mutations causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the *mexR* gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *FEMS Microbiology Letters*, 179(1), 67–72. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08709.x>
- Saliba, A.M., Nascimento, D.O., Silva, M.C.A., Assis, M.C., Gayer, C.R.M., Raymond, B., Coelho, M.G.P., Marques, E.A., Touqui, L., Albano, R.M., Lopes, U.G., Paiva, D.D., Bozza, P.T. & Plotkowski, M.C.** (2005). Eicosanoid-mediated proinflammatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. *Cellular Microbiology*, 7(12), 1811–1822. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00635.x>
- San Millan, A., Toll-Riera, M., Qi, Q., Betts, A., Hopkinson, R. J., McCullagh, J. & MacLean, R. C.** (2018). Integrative analysis of fitness and metabolic effects of plasmids in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *ISME Journal*. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0224-8>

- Sánchez, P., Linares, J. F., Ruiz-Díez, B., Campanario, E., Navas, A., Baquero, F. & Martínez, J. L.** (2002). Fitness of in vitro selected *Pseudomonas aeruginosa* nalB and nfxB multidrug resistant mutants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(5), 657–664. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf185>
- Sato, H. & Frank, D.W.** (2004). ExoU is a potent intracellular phospholipase. In *Molecular Microbiology* (Vol. 53, Issue 5, pp. 1279–1290). Mol Microbiol. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04194.x>
- Sato, H. & Frank, D.W.** (2014). Intoxication of Host Cells by the T3SS Phospholipase ExoU: PI(4,5)P<sub>2</sub>-Associated, Cytoskeletal Collapse and Late Phase Membrane Blebbing. *PLoS ONE*, 9(7), e103127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103127>
- Sato, H., Frank, D.W., Hillard, C. J., Feix, J. B., Pankhaniya, R.R., Moriyama, K., Finck-Barbançon, V., Buchaklian, A., Lei, M., Long, R.M., Wiener-Kronish, J. & Sawa, T.** (2003). The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO Journal*, 22(12), 2959–2969. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg290>
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A. & Charlier, P.** (2008). The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 32, Issue 2, pp. 234–258). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x>
- Sawa, T., Shimizu, M., Moriyama, K. & Wiener-Kronish, J.P.** (2014). Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: A review. *Critical Care*, 18(1), 668. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0668-9>
- Schalk, I.J. & Guillon, L.** (2013). Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: Implications for metal homeostasis. In *Environmental Microbiology* (Vol. 15, Issue 6, pp. 1661–1673). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12013>
- Schauer, J., Gatermann, S.G., Hoffmann, D., Hupfeld, L. & Pfennigwerth, N.** (2020). GPC-1, a novel class A carbapenemase detected in a clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(4), 911–916. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz536>
- Schedl, T., Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J. & Priess, J.R.** (1997). Developmental Genetics of the Germ Line. In *C. elegans II* (2nd editio). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413236>
- Schell, M.** (1993). Molecular Biology of the LysR Family of Transcriptional Regulators. *Annual Review of Microbiology*, 47(1), 597–626. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.47.1.597>
- Schulenburg, H. & Ewbank, J.J.** (2007). The genetics of pathogen avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Microbiology*, 66(3), 563–570. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05946.x>

- Schulert, G.S., Feltman, H., Rabin, S. D. P., Martin, C.G., Battle, S.E., Rello, J. & Hauser, A.R. (2003). Secretion of the Toxin ExoU Is a Marker for Highly Virulent *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Obtained from Patients with Hospital-Acquired Pneumonia . *The Journal of Infectious Diseases*, 188(11), 1695–1706. <https://doi.org/10.1086/379372>
- Schuster, M. & Greenberg, E.P. (2006). A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(2–3), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.036>
- Scott-Thomas, A.J., Syhre, M., Pattemore, P.K., Epton, M., Laing, R., Pearson, J. & Chambers, S.T. (2010). 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *BMC Pulmonary Medicine*, 10(1), 56. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-10-56>
- Scott, E., Holden-Dye, L., O'Connor, V. & Wand, M.E. (2020). Intra Strain Variation of the Effects of Gram-Negative ESKAPE Pathogens on Intestinal Colonization, Host Viability, and Host Response in the Model Organism *Caenorhabditis elegans*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3113. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03113>
- Scott, F.W. & Pitt, T.L. (2004). Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales. *Journal of Medical Microbiology*, 53(7), 609–615. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.45620-0>
- Sevillano, E., Gallego, L. & García-Lobo, J.M. (2009). First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A.baumannii*. *Pathologie Biologie*, 57(6), 493–495. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.05.002>
- Shortridge, D., Gales, A.C., Streit, J. M., Huband, M.D., Tsakris, A. & Jones, R.N. (2019). Geographic and temporal patterns of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* over 20 years from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–2016. *Open Forum Infectious Diseases*, 6, S63–S68. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy343>
- Silva, F.M., Carmo, M.S., Silbert, S. & Gales, A.C. (2011). SPM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa*: Analysis of the Ancestor Relationship Using Multilocus Sequence Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Automated Ribotyping. *Microbial Drug Resistance*, 17(2), 215–220. <https://doi.org/10.1089/mdr.2010.0140>
- Singh, G., Srinivasan, R., Cheng, J., Peng, Z., Fujimura, K., Baek, M. S., Panzer, A. R., Tringe, S. G., Chen, F., Sorek, R., Weng, L., Bristow, J., Wiener-Kronish, J. P. & Lynch, S.V. (2014). Rearrangement of a large novel *Pseudomonas aeruginosa* gene island in strains isolated from a patient developing ventilator-associated pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7), 2430–2438. <https://doi.org/10.1128/JCM.01626-13>

- Siryaporn, A., Kuchma, S. L., O'Toole, G. A., Gitai, Z. & Ausubel, F. M. (2014). Surface attachment induces *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415712111>
- Skiebe, E., de Berardinis, V., Morczinek, P., Kerrinnes, T., Faber, F., Lepka, D., Hammer, B., Zimmermann, O., Ziesing, S., Wichelhaus, T. A., Hunfeld, K. P., Borgmann, S., Gröbner, S., Higgins, P. G., Seifert, H., Busse, H. J., Witte, W., Pfeifer, Y. & Wilharm, G. (2012). Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, depends on 1,3-diaminopropane. *International Journal of Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.03.003>
- Skurnik, D., Roux, D., Cattoir, V., Danilchanka, O., Lu, X., Yoder-Himes, D. R., Han, K., Guillard, T., Jiang, D., Gaultier, C., Guerin, F., Aschard, H., Leclercq, R., Mekalanos, J. J., Lory, S. & Pier, G.B. (2013). Enhanced in vivo fitness of carbapenem-resistant oprD mutants of *Pseudomonas aeruginosa* revealed through high-throughput sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221552110>
- Smith, E.E., Buckley, D.G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., Miller, S. I., Ramsey, B. W., Speert, D.P., Moskowitz, S. M., Burns, J.L., Kaul, R. & Olson, M.V. (2006). Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(22), 8487–8492. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602138103>
- Smith, R.S. & Iglewski, B.H. (2003). *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Current Opinion in Microbiology*, 6(1), 56–60. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00008-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00008-0)
- Sobel, M. L., Hocquet, D., Cao, L., Plesiat, P. & Poole, K. (2005). Mutations in PA3574 (nalD) Lead to Increased MexAB-OprM Expression and Multidrug Resistance in Laboratory and Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(5), 1782–1786. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1782-1786.2005>
- Sobel, M.L., Neshat, S. & Poole, K. (2005). Mutations in PA2491 (mexS) Promote MexT-Dependent mexEF-oprN Expression and Multidrug Resistance in a Clinical Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 187(4), 1246–1253. <https://doi.org/10.1128/JB.187.4.1246-1253.2005>
- Soberón-Chávez, G., Lépine, F. & Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 68, Issue 6, pp. 718–725). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0150-3>
- Söderhäll, K. & Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10(1), 23–28. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80026-5](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80026-5)

- Sonnleitner, E., Hagens, S., Rosenau, F., Wilhelm, S., Habel, A., Jäger, K. E. & Bläsi, U.** (2003). Reduced virulence of a hfq mutant of *Pseudomonas aeruginosa* O1. *Microbial Pathogenesis*, 35(5), 217–228. [https://doi.org/10.1016/S0882-4010\(03\)00149-9](https://doi.org/10.1016/S0882-4010(03)00149-9)
- Sorensen, R.U. & Klinger, J. D.** (1987). Biological Effects of *Pseudomonas aeruginosa* Phenazine Pigments. In *Antibiotics and chemotherapy* (Vol. 39, pp. 113–124). Karger Publishers. <https://doi.org/10.1159/000414339>
- Spencer, D.H., Kas, A., Smith, E.E., Raymond, C.K., Sims, E.H., Hastings, M., Burns, J.L., Kaul, R. & Olson, M.V.** (2003). Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 185(4), 1316–1325. <https://doi.org/10.1128/JB.185.4.1316-1325.2003>
- Srikumar, R., Kon, T., Gotoh, N. & Poole, K.** (1998). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps mexA-mexB- OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(1), 65–71. <https://doi.org/10.1128/aac.42.1.65>
- Srikumar, R., Paul, C.J. & Poole, K.** (2000). Influence of Mutations in the mexR Repressor Gene on Expression of the MexA-MexB-OprM Multidrug Efflux System of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 182(5), 1410–1414. <https://doi.org/10.1128/JB.182.5.1410-1414.2000>
- Stead, D.E.** (1992). Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42(2), 281–295. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-2-281>
- Stevens, A.M., Schuster, M. & Rumbaugh, K.P.** (2012). Working together for the common good: Cell-cell communication in bacteria. *Journal of Bacteriology*, 194(9), 2131–2141. <https://doi.org/10.1128/JB.00143-12>
- Stites, S.W., Walters, B., O'Brien-Ladner, A.R., Bailey, K. & Wesselius, L.J.** (1998). Increased Iron and Ferritin Content of Sputum From Patients With Cystic Fibrosis or Chronic Bronchitis. *Chest*, 114(3), 814–819. <https://doi.org/10.1378/chest.114.3.814>
- Storey, D.G., Ujack, E.E., Rabin, H.R. & Mitchell, I.** (1998). *Pseudomonas aeruginosa* lasR transcription correlates with the transcription of lasA, lasB, and toxA in chronic lung infections associated with cystic fibrosis. *Infection and Immunity*, 66(6), 2521–2528. <https://doi.org/10.1128/iai.66.6.2521-2528.1998>
- Stover, C., Pham, X., Erwin, A., Mizoguchi, S., Warrener, P., Hickey, M., Brinkman, F., Hufnagle, W., Kowalk, D., Lagrou, M., Garber, R., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L., Coulter, S., Folger, K., Kas, A., ... Olson, M.** (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959–964. <https://doi.org/10.1038/35023079>



- Stryjewski, M.E. & Sexton, D.J.** (2003). *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Specific Types of Patients and Clinical Settings. In A.R. Hauser & J. Rello (Eds.), *Severe Infections Caused by Pseudomonas aeruginosa. Perspectives on Critical Care Infectious Diseases, vol 7* (pp. 1–15). Springer, Boston, MA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0433-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0433-7_1)
- Sugawara, E., Nagano, K. & Nikaido, H.** (2012). Alternative folding pathways of the major porin OprF of *Pseudomonas aeruginosa*. In *FEBS Journal* (Vol. 279, Issue 6, pp. 910–918). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08481.x>
- Sugawara, E., Nestorovich, E. M., Bezrukov, S. M. & Nikaido, H.** (2006). *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF exists in two different conformations. *Journal of Biological Chemistry*, 281(24), 16220–16229. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600680200>
- Sullivan, E., Bensman, J., Lou, M., Agnello, M., Shriner, K. & Wong-Beringer, A.** (2014). Risk of developing pneumonia is enhanced by the combined traits of fluoroquinolone resistance and type III secretion virulence in respiratory isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical Care Medicine*, 42(1), 48–56. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318298a86f>
- Takata, I., Yamagishi, Y. & Mikamo, H.** (2018). Association of the *exoU* genotype with a multidrug non-susceptible phenotype and mRNA expressions of resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 24(1), 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2017.08.018>
- Takesue, Y., Yokoyama, T., Akagi, S., Ohge, H., Imamura, Y., Murakami, Y. & Sueda, T.** (2002). Changes in the intestinal flora after the administration of prophylactic antibiotics to patients undergoing a gastrectomy. *Surgery Today*, 32(7), 581–586. <https://doi.org/10.1007/s005950200105>
- Tan, M.W., Mahajan-Miklos, S. & Ausubel, F.M.** (1999). Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(2), 715–720. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.715>
- Tan, M.W., Rahme, L.G., Sternberg, J.A., Tompkins, R.G. & Ausubel, F.M.** (1999). *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(5), 2408–2413. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2408>
- Tang, H.** (2009). Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. In *Fly* (Vol. 3, Issue 1, pp. 105–111). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/fly.3.1.7747>
- Team, R.C.** (2017). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.r-project.org/>
- Tissenbaum, H.A.** (2015). Using *C. elegans* for aging research. *Invertebrate Reproduction & Development*, 59(sup1), 59–63. <https://doi.org/10.1080/07924259.2014.940470>

- Toder, D.S.** (1994). Gene replacement in *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods in Enzymology*, 235(C), 466–474. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)35162-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35162-7)
- Tomás, M., Doumith, M., Warner, M., Turton, J.F., Beceiro, A., Bou, G., Livermore, D.M. & Woodford, N.** (2010). Efflux pumps, OprD porin, AmpC  $\beta$ -lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(5), 2219–2224. <https://doi.org/10.1128/AAC.00816-09>
- Tramper-Stranders, G.A., van der Ent, C. K. & Wolfs, T.F.W.** (2005). Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 4(2 SUPPL.), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2005.05.009>
- Treepong, P., Kos, V.N., Guyeux, C., Blanc, D. S., Bertrand, X., Valot, B. & Hocquet, D.** (2018). Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(3), 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.018>
- Tremblay, J. & Déziel, E.** (2008). Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *Journal of Basic Microbiology*, 48(6), 509–515. <https://doi.org/10.1002/jobm.200800030>
- Trias, J. & Nikaido, H.** (1990). Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(26), 15680–15684. <https://www.jbc.org/content/265/26/15680.short>
- Tsai, C.J.Y., Loh, J.M. & Proft, T.** (2016). *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, 7(3), 214–229. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135289>
- Tümmler, B.** (2019). Emerging therapies against infections with *Pseudomonas aeruginosa* [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research*, 8. <https://doi.org/10.12688/f1000research.19509.1>
- Turton, J.F., Wright, L., Underwood, A., Witney, A.A., Chan, Y.T., Al-Shahib, A., Arnold, C., Doumith, M., Patel, B., Planche, T.D., Green, J., Holliman, R. & Woodford, N.** (2015). High-resolution analysis by whole-genome sequencing of an international lineage (Sequence Type 111) of *Pseudomonas aeruginosa* associated with metallo-carbapenemases in the United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(8), 2622–2631. <https://doi.org/10.1128/JCM.00505-15>
- Urbanowski, M.L., Brutinel, E. D. & Yahr, T.L.** (2007). Translocation of ExsE into Chinese hamster ovary cells is required for transcriptional induction of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Infection and Immunity*, 75(9), 4432–4439. <https://doi.org/10.1128/IAI.00664-07>
- Urbanowski, M.L., Lykken, G.L. & Yahr, T.L.** (2005). A secreted regulatory protein couples transcription to the secretory activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(28), 9930–9935. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504405102>

- Urzedo, J. E., de Paula Menezes, R., Porto, J.P., Ferreira, M.L., Gonçalves, I. R., de Brito, C.S., Gontijo-Filho, P.P. & Ribas, R.M.** (2020). High mortality by nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* in a referral hospital in Brazil: Facing the perfect storm. *Journal of Medical Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001273>
- Usher, L.R., Lawson, R. A., Geary, I., Taylor, C.J., Bingle, C.D., Taylor, G.W. & Whyte, M.K.B.** (2002). Induction of Neutrophil Apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin Pyocyanin: A Potential Mechanism of Persistent Infection. *The Journal of Immunology*, 168(4), 1861–1868. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.4.1861>
- Vahaboglu, H., Coskuncan, F., Tansel, O., Ozturk, R., Sahin, N., Koksali, I., Kocazeybek, B., Tatman-Otkun, M., Leblebicioglu, H., Ozinel, M., Akalin, H., Kocagoz, S. & Korten, V.** (2001). Clinical importance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Journal of Medical Microbiology*, 50(7), 642–645. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-7-642>
- Vallet, I., Olson, J.W., Lory, S., Lazdunski, A. & Filloux, A.** (2001). The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), 6911–6916. <https://doi.org/10.1073/pnas.111551898>
- Vallis, A.J., Yahr, T.L., Barbieri, J.T. & Frank, D.W.** (1999). Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions. *Infection and Immunity*, 67(2), 914–920. <https://doi.org/10.1128/iai.67.2.914-920.1999>
- Van Hoek, A. H.A.M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P. & Aarts, H.J.M.** (2011). Acquired antibiotic resistance genes: An overview. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 2, Issue SEP). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203>
- Vareechon, C., Zmina, S.E., Karmakar, M., Pearlman, E. & Rietsch, A.** (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Effector ExoS Inhibits ROS Production in Human Neutrophils. *Cell Host and Microbe*, 21(5), 611–618.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.04.001>
- Vatansever, C., Menekse, S., Dogan, O., Gucer, L. S., Ozer, B., Ergonul, O. & Can, F.** (2020). Co-existence of OXA-48 and NDM-1 in colistin resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST235. In *Emerging Microbes and Infections*. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1713025>
- Vatcheva-Dobrevska, R., Mulet, X., Ivanov, I., Zamorano, L., Dobрева, E., Velinov, T., Kantardjiev, T. & Oliver, A.** (2013). Molecular epidemiology and multidrug resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgarian hospitals. *Microbial Drug Resistance*, 19(5), 355–361. <https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0004>



- Veesenmeyer, J.L., Hauser, A.R., Lisboa, T. & Rello, J.** (2009). *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and therapy. *Critical Care Medicine*, 37(5), 1777–1786. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31819ff137.Pseudomonas>
- Viedma, E., Juan, C., Acosta, J., Zamorano, L., Otero, J.R., Sanz, F., Chaves, F. & Oliver, A.** (2009). 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(11), 4930–4933. <https://doi.org/10.1128/AAC.00900-09>
- Viedma, E., Juan, C., Villa, J., Barrado, L., Ángeles Orellana, M., Sanz, F., Otero, J.R., Oliver, A. & Chaves, F.** (2012). VIM-2-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 clone, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 18(8), 1235–1241. <https://doi.org/10.3201/eid1808.111234>
- Villegas, M.V., Lolans, K., Correa, A., Kattan, J.N., Lopez, J.A. & Quinn, J.P.** (2007). First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1553–1555. <https://doi.org/10.1128/AAC.01405-06>
- Vilmos, P. & Kurucz, É.** (1998). Insect immunity: Evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters*, 62(2), 59–66. [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(98\)00023-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(98)00023-6)
- Vincent, J.L.** (2003). Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet*, 361(9374), 2068–2077. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13644-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13644-6)
- Visca, P., Imperi, F. & Lamont, I.L.** (2007). Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends in Microbiology*, 15(1), 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.11.004>
- Vogel, S.N.** (2012). How Discovery of Toll-Mediated Innate Immunity in Drosophila Impacted Our Understanding of TLR Signaling (and Vice Versa) . *The Journal of Immunology*, 188(11), 5207–5209. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201050>
- Walker, T.S., Bais, H.P., Déziel, E., Schweizer, H.P., Rahme, L.G., Fall, R. & Vivanco, J.M.** (2004). *Pseudomonas aeruginosa*-Plant Root Interactions. Pathogenicity, Biofilm Formation, and Root Exudation. *Plant Physiology*, 134(1), 320–331. <https://doi.org/10.1104/pp.103.027888>
- Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L. & Nordmann, P.** (2005). Metallo- $\beta$ -lactamases: The quiet before the storm? In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 18, Issue 2, pp. 306–325). American Society for Microbiology Journals. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.306-325.2005>
- Wand, M.E., McCowen, J.W.I., Nugent, P.G. & Sutton, J.M.** (2013). Complex interactions of *Klebsiella pneumoniae* with the host immune system in a *Galleria mellonella* infection model. *Journal of Medical Microbiology*, 62(PART 12), 1790–1798. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.063032-0>

- Wang, X., Kleerekoper, Q., Revtovich, A. V., Kang, D. & Kirienko, N.V. (2020). Identification and validation of a novel anti-virulent that binds to pyoverdine and inhibits its function. *Virulence*, 11(1), 1293–1309. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1819144>
- Waterfield, N.R., Wren, B.W. & French-Constant, R.H. (2004). Invertebrates as a source of emerging human pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 2(10), 833–841. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1008>
- Weigert, M., Ross-Gillespie, A., Leinweber, A., Pessi, G., Brown, S. P. & Kümmerli, R. (2017). Manipulating virulence factor availability can have complex consequences for infections. *Evolutionary Applications*, 10(1), 91–101. <https://doi.org/10.1111/eva.12431>
- Weldhagen, G.F., Poirel, L. & Nordmann, P. (2003). Ambler class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel developments and clinical impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(8), 2385–2392. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.8.2385-2392.2003>
- Weller-Stuart, T., Toth, I., De Maayer, P. & Coutinho, T. (2017). Swimming and twitching motility are essential for attachment and virulence of *Pantoea ananatis* in onion seedlings. *Molecular Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1111/mpp.12432>
- Whiley, R.A., Sheikh, N.P., Mushtaq, N., Hagi-Pavli, E., Personne, Y., Javaid, D. & Waite, R.D. (2014). Differential potentiation of the virulence of the *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis liverpool epidemic strain by oral commensal streptococci. *Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit568>
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C. & Mattick, J.S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295(5559), 1487. <https://doi.org/10.1126/science.295.5559.1487>
- Whiteley, M., Lee, K. M. & Greenberg, E. P. (1999). Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 13904–13909. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13904>
- Wilderman, P. J., Vasil, A.I., Johnson, Z., Wilson, M. J., Cunliffe, H. E., Lamont, I. L. & Vasil, M. L. (2001). Characterization of an endoprotease (PrpL) encoded by a PvdS-regulated gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5385-5394.2001>
- Wilhelm, S., Gdynia, A., Tielen, P., Rosenau, F. & Jaeger, K.E. (2007). The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 189(18), 6695–6703. <https://doi.org/10.1128/JB.00023-07>
- William Costerton, J., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. & Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49, 711–745. [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)

- Williams, D., Evans, B., Haldenby, S., Walshaw, M.J., Brockhurst, M.A., Winstanley, C. & Paterson, S.** (2015). Divergent, coexisting *Pseudomonas aeruginosa* lineages in chronic cystic fibrosis lung infections. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 191(7), 775–785. <https://doi.org/10.1164/rccm.201409-1646OC>
- Williams, P. & Cámara, M.** (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current Opinion in Microbiology*, 12(2), 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.01.005>
- Wojda, I.** (2017). Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Science*, 24(3), 342–357. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12325>
- Wolter, D.J., Kurpiel, P.M., Woodford, N., Palepou, M.F.I., Goering, R.V. & Hanson, N.D.** (2009). Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 557–562. <https://doi.org/10.1128/AAC.00734-08>
- Woodford, N., Turton, J.F. & Livermore, D.M.** (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 35, Issue 5, pp. 736–755). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>
- Wu, M. & Li, X.** (2014). *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. In *Molecular Medical Microbiology: Second Edition* (Vol. 3, pp. 1547–1564). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00087-1>
- Wu, W., Jin, Y., Bai, F. & Jin, S.** (2015). *Pseudomonas aeruginosa*. In *Molecular Medical Microbiology* (Vol. 60, Issue 11, pp. 753–767). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00041-X>
- Xiao, R. & Kisaalita, W.S.** (1997). Iron acquisition from transferrin and lactoferrin by *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdinin. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-7-2509>
- Yahr, T.L., Goranson, J. & Frank, D.W.** (1996). Exoenzyme of S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway. *Molecular Microbiology*, 22(5), 991–1003. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.01554.x>
- Yahr, T. L. & Wolfgang, M. C.** (2006). Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Molecular Microbiology*, 62(3), 631–640. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05412.x>
- Yong, D., Toleman, M.A., Giske, C.G., Cho, H.S., Sundman, K., Lee, K. & Walsh, T.R.** (2009). Characterization of a New Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), 5046–5054. <https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>

- Yuen, G. J. & Ausubel, F. M.** (2014). Enterococcus infection biology: Lessons from invertebrate host models. *Journal of Microbiology*, 52(3), 200–210. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4011-6>
- Zafer, M.M., Amin, M., El Mahallawy, H., Ashour, M.S.E.D. & Al Agamy, M.** (2014). First report of NDM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Egypt. *International Journal of Infectious Diseases*, 29, 80–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.07.008>
- Zamorano, L., Mulet, X., Garau, M., Gallegos, C., Juan, C., Pérez, J. L. & Oliver, A.** (2016). VIM-47, a new variant of the autochthonous metallo- $\beta$ -lactamase VIM-13 from the balearic islands in Spain. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 60, Issue 5, pp. 3251–3252). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AAC.03081-15>
- Zamorano, L., Reeve, T.M., Juan, C., Moyá, B., Cabot, G., Voadlo, D.J., Mark, B.L. & Oliver, A.** (2011). AmpG inactivation restores susceptibility of pan- $\beta$ -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(5), 1990–1996. <https://doi.org/10.1128/AAC.01688-10>
- Zarza, V.M.P., Mordani, S. M., Maldonado, A.M., Hernández, D.Á., Georgina, S.G.S. & Vázquez-López, R.** (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenicity and antimicrobial resistance in urinary tract infection. *Revista Chilena de Infectología*, 36(2), 180–189. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182019000200180>
- Zhang, W., Lee, M., Heseck, D., Lastochkin, E., Boggess, B. & Mobashery, S.** (2013). Reactions of the Three AmpD Enzymes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the American Chemical Society*, 135(13), 4950–4953. <https://doi.org/10.1021/ja400970n>
- Zhang, Y., Lu, H. & Bargmann, C.I.** (2005). Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature04216>
- Zolfaghar, I., Evans, D.J. & Fleiszig, S.M.J.** (2003). Twitching motility contributes to the role of pili in corneal infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 71(9), 5389–5393. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.5389-5393.2003>

Imágenes de la portada:

**Macrosoul (20 de agosto de 2021):** <http://macrosul.com/fosfomicina-e-meropenem-no-combate-pseudomonas/>

**Rhoads, Dan (28 de enero de 2008).** Bite Size Bio: <https://bitesizebio.com/352/worms-models-of-development/>

**Rogers, Aric; Matteson, Stefanie (20 de diciembre de 2016).** MDI Biological Laboratories: <https://mdibl.org/press-release/research-at-mdi-biological-laboratory-sheds-light-on-mechanisms-underlying-aging/>

**Yokoyama, Maho** (27 de mayo de 2020). News medical life Science [https://www.news-medical.net/life-sciences/C-elegans-as-a-Model-Organism-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/C-elegans-as-a-Model-Organism-(Spanish).aspx)



# **ANEXO I**

## **Medios de cultivo y tampones**



## ANEXO I. Medios de cultivo, reactivos de laboratorio y tampones

Todos los medios se autoclavaron a 121°C durante 21 min.

### 1. Medios de cultivo

#### A. Medios de cultivo bacterianos

**Luria-Bertani Broth (LB):** 10 g triptona, 5 g NaCl, 5 g extracto de levadura por litro de agua destilada.

**Luria-Bertani Agar (LBA):** 10 g triptona, 5 g NaCl, 5 g extracto de levadura, 15 g de agar bacteriológico por litro de agua destilada.

#### B. Medios utilizados para los ensayos de motilidad bacteriana.

**Swimming:** 10 g triptona, 5 g NaCl, 0.3 g de agarosa de resolución media por litro de agua destilada.

**Twitching:** 10 g triptona, 5 g extracto de levadura, 10 g NaCl, 10 g de agar bacteriológico por litro de agua destilada.

**Swarming:** Medio mínimo M8 1X suplementado con 1 mM MgSO<sub>4</sub> (a partir de un stock de 5X: 64 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 15 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 g de NaCl por litro de agua destilada; ajustado a un pH de 7.4), 2 g de glucosa, 5 g Bacto-casaminoácidos, 5 g de agar bacteriológico, CaCl<sub>2</sub> 100 μM por litro de agua destilada.

#### C. Medio utilizado para la producción de pigmentos

**Medio AAC:** 20 g proteosa peptona, 1.2 ml glicerol, 1.5 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.5 g MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O por litro de agua destilada.

#### D. Medio utilizado para el crecimiento y mantenimiento de *C. elegans*

**Potato Dextrose Agar (PDA):** 39 g Potato Dextrose Agar por litro de agua destilada.

### 2. Tampones

**Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS):** Solución salina tamponada con fosfato 1X sin calcio ni magnesio. Tampón comercial de Biowest®.



**TBE (Tris-Borato-EDTA) 5X:** 54 g de TRIS, 27.5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0.5 M (pH 7.6), por litro de agua destilada. Para preparar TBE 0.5X se diluyeron 100 ml de TBE 5X en 900 ml de agua destilada.

### 3. Reactivos PCR convencional

#### Master Mix PCR (100 µl de reacción)

Reactivos	Volumen (µl)
Agua destilada	69
DMSO	10
Buffer II (10X)	10
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	6
dNTPs (10 mM)	2
AmpliTaq Gold™ (5U/µl)	1
DNA molde	1
Cebador F (100 µM)	1
Cebador R (100 µM)	1







**ANEXO II**  
**Publicaciones derivadas**





# Interplay among Resistance Profiles, High-Risk Clones, and Virulence in the *Caenorhabditis elegans Pseudomonas aeruginosa* Infection Model

Irina Sánchez-Diener,<sup>a</sup> Laura Zamorano,<sup>a</sup> Carla López-Causapé,<sup>a</sup>  Gabriel Cabot,<sup>a</sup> Xavier Mulet,<sup>a</sup>  Carmen Peña,<sup>b</sup>  Rosa del Campo,<sup>c</sup> Rafael Cantón,<sup>c</sup> Antonio Doménech-Sánchez,<sup>d</sup> Luis Martínez-Martínez,<sup>e,f,g</sup> Susana C. Arcos,<sup>h</sup> Alfonso Navas,<sup>h</sup>  Antonio Oliver<sup>a</sup>

Servicio de Microbiología and Unidad de Investigación, Hospital Son Espases, Instituto de Investigación Sanitaria de Palma (IdISPa), Palma, Majorca, Spain<sup>a</sup>; Servicio de Medicina Interna, Hospital Virgen de los Lirios, Alcoy, Spain<sup>b</sup>; Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain<sup>c</sup>; Saniconsult Ibérica SL, Área de Microbiología and Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS), Universidad de las Islas Baleares, Palma, Majorca, Spain<sup>d</sup>; Unidad de Gestión Clínica de Microbiología, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain<sup>e</sup>; Departamento de Microbiología, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain<sup>f</sup>; Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMBIC), Córdoba, Spain<sup>g</sup>; Museo Nacional de Ciencias Naturales, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma, Madrid, Spain<sup>h</sup>

**ABSTRACT** The increasing prevalence of nosocomial infections produced by multidrug-resistant (MDR) or extensively drug-resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa* is frequently linked to widespread international strains designated high-risk clones. In this work, we attempted to decipher the interplay between resistance profiles, high-risk clones, and virulence, testing a large ( $n = 140$ ) collection of well-characterized *P. aeruginosa* isolates from different sources (bloodstream infections, nosocomial outbreaks, cystic fibrosis, and the environment) in a *Caenorhabditis elegans* infection model. Consistent with previous data, we documented a clear inverse correlation between antimicrobial resistance and virulence in the *C. elegans* model. Indeed, the lowest virulence was linked to XDR profiles, which were typically linked to defined high-risk clones. However, virulence varied broadly depending on the involved high-risk clone; it was high for sequence type 111 (ST111) and ST235 but very low for ST175. The highest virulence of ST235 could be attributed to its *exoU*<sup>+</sup> type III secretion system (TTSS) genotype, which was found to be linked with higher virulence in our *C. elegans* model. Other markers, such as motility or pigment production, were not essential for virulence in the *C. elegans* model but seemed to be related with the higher values of the statistical normalized data. In contrast to ST235, the ST175 high-risk clone, which is widespread in Spain and France, seems to be associated with a particularly low virulence in the *C. elegans* model. Moreover, the previously described G154R AmpR mutation, prevalent in ST175, was found to contribute to the reduced virulence, although it was not the only factor involved. Altogether, our results provide a major step forward for understanding the interplay between *P. aeruginosa* resistance profiles, high-risk clones, and virulence.

**KEYWORDS** *Pseudomonas aeruginosa*, *Caenorhabditis elegans*, virulence, multidrug resistant, extensively drug resistant, high-risk clones

*Pseudomonas aeruginosa*, a ubiquitous microorganism, is one of the most relevant pathogens causing human opportunistic infections (1). Due to its impressive metabolic plasticity and versatility, *P. aeruginosa* is capable of infecting/colonizing a wide

**Received** 1 August 2017 **Returned for modification** 25 August 2017 **Accepted** 15 September 2017

**Accepted manuscript posted online** 18 September 2017

**Citation** Sánchez-Diener I, Zamorano L, López-Causapé C, Cabot G, Mulet X, Peña C, del Campo R, Cantón R, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Arcos SC, Navas A, Oliver A. 2017. Interplay among resistance profiles, high-risk clones, and virulence in the *Caenorhabditis elegans Pseudomonas aeruginosa* infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e01586-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01586-17>.

**Copyright** © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Laura Zamorano, [laura.zamorano@ssib.es](mailto:laura.zamorano@ssib.es), or Antonio Oliver, [antonio.oliver@ssib.es](mailto:antonio.oliver@ssib.es).

range of ecological niches, including aquatic and soil habitats, animals, and plants (2). Moreover, *P. aeruginosa* is a leading cause of severe nosocomial infections, particularly in critically ill and immunocompromised patients, and is the most frequent driver of chronic respiratory infections in patients suffering from cystic fibrosis (CF) or other chronic underlying diseases (3, 4).

Multiple virulence factors contribute to the pathogenesis of acute and chronic *P. aeruginosa* infections (1), and many of them are found to be located in the accessory genome as part of pathogenicity (PAPI) or genomic (PAGI) islands (5). One of the most relevant *P. aeruginosa* virulence factors is the type III secretion system (TTSS), of which ExoU determines a greater impact in bacterial virulence. In a recent multicenter study of *P. aeruginosa*, we showed that the TTSS genotype is a major differential factor that needs to be considered when analyzing the clinical outcome of *P. aeruginosa* bacteremia (6). Motility systems and pigment production are also well established as virulence determinants of *P. aeruginosa* (7–9).

The increasing prevalence of nosocomial infections produced by multidrug-resistant (MDR) or extensively drug-resistant (XDR) *P. aeruginosa* strains severely compromises the selection of appropriate treatments and is therefore associated with significant morbidity and mortality (10–12). This growing threat results from the extraordinary capacity of this pathogen for developing resistance to nearly all available antibiotics by the interplay of the selection of mutations in chromosomal genes and the increasing prevalence of transferable resistance determinants, particularly those encoding class B carbapenemases (metallo- $\beta$ -lactamases [MBLs]) or extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs), which are frequently cotransferred with genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes (13). Even more concerning are recent reports which have provided evidence of the existence of MDR/XDR clones of *P. aeruginosa* disseminated in multiple institutions worldwide, denominated epidemic high-risk clones (14). Among them, sequenced type 1111 (ST111), ST175, and ST235 are those likely to be most widespread (15–18).

Understanding the interplay between high-risk clones, antimicrobial resistance, and virulence is of paramount relevance for the analysis of the outcomes of *P. aeruginosa* infections (6, 18, 19). Indeed, resistance profiles, high-risk clones, and TTSS genotype were significantly interconnected in a previous study, having a major impact in the mortality of *P. aeruginosa* bloodstream infections (6). Moreover, in a recent study, we showed that the 3 likely more worldwide-relevant *P. aeruginosa* high-risk clones (ST111, ST175, and ST235) were associated with a defined set of biological markers that included decreased motility, pigment production, and *in vitro* fitness but increased biofilm formation and spontaneous mutant frequencies (20). The interplay between resistance and virulence has also been recently evaluated for a few isolates in a murine model of *P. aeruginosa* bacteremia (21). However, the usefulness of murine models for the analysis of large collections of isolates with different traits is limited by cost, workload, and ethical constraints. In this sense, *P. aeruginosa* causes lethal infections not only to mammals, but also to invertebrates, such as the nematode *Caenorhabditis elegans*, a powerful model organism for studying developmental biology and host-pathogen interactions (22–24). *C. elegans* is often used as a host due to its deep characterization and experimental simplicity (25–27). Moreover, this infection model has many practical advantages, such as being low cost, being amenable to large-scale *in vivo* screening, and not raising any of the ethical concerns for drug testing at the early stages of development (22, 28–31). Thus, the objective of this work was to decipher the interplay among resistance profiles, high-risk clones, and virulence, testing a large collection of well-characterized *P. aeruginosa* isolates from different sources (bloodstream infections, nosocomial outbreaks, CF, and the environment) in a *C. elegans* infection model.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Inverse correlation between resistance and virulence in the *C. elegans* model.

The characteristics of the 140 *P. aeruginosa* isolates studied are listed in Data Set S1 in

**TABLE 1** *Caenorhabditis elegans* virulence scoring

CEVS <sup>a</sup>	No. of live nematodes at 168 h
Nonvirulent	
1	>50
2	>5–50
Virulent	
3	1–5
4	≤1
5	0 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>CEVS, *Caenorhabditis elegans* virulence score. Nonvirulent score indicates the growth of nematodes is allowed. Virulent indicates nematodes are killed.

<sup>b</sup>Recorded at 72 h.

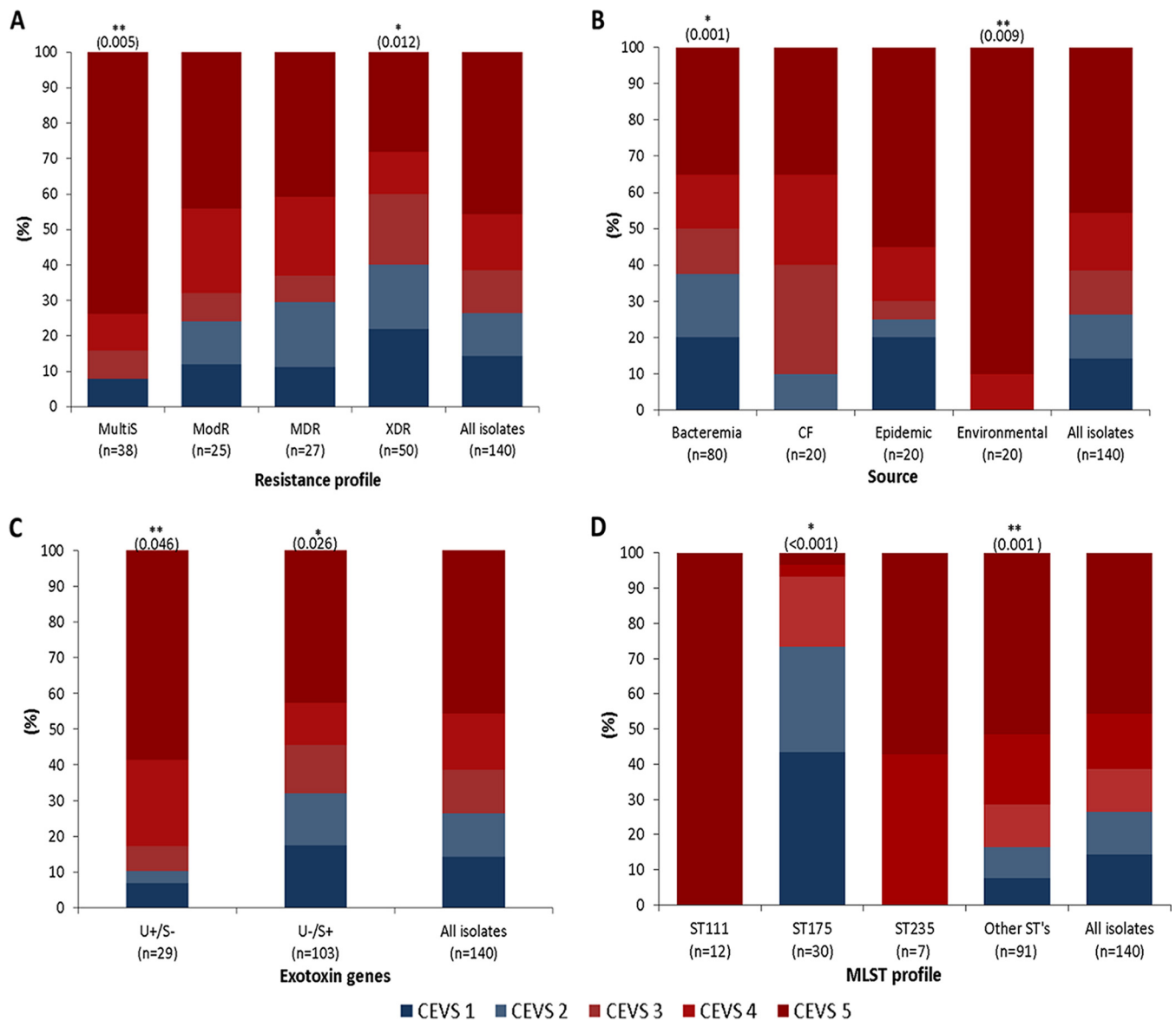
the supplemental material. To establish a comparative analysis of lethality of the clinical isolates studied, we established a *C. elegans* virulence score (CEVS), as described in Table 1 and Materials and Methods. As shown in Fig. 1, 103 (73.6%) of the 140 studied strains were virulent (*C. elegans* virulence score [CEVS], 3 to 5) in the *C. elegans* model, whereas 37 (26.4%) were not (CEVS, 1 to 2). However, as documented in Fig. 1A, the proportion of nonvirulent strains dramatically increased according to the resistance profile, from 7.9% for isolates that were susceptible to all tested antipseudomonals (MultiS), 24% for isolates resistant to 1 or 2 antipseudomonal families (ModR), 29.6% for isolates resistant to 3 or more families (MDR), to 40% for XDR isolates (resistant to all but 1 or 2 families). Therefore, these results support previous studies suggesting that the acquisition of resistance is associated with a fitness cost and reduction in virulence (32, 33).

With regard to the source (Fig. 1B), the highest virulence was documented among the environmental isolates, most of which (90%) were MultiS and none were MDR/XDR. Intriguingly, virulence in the *C. elegans* model was lower in blood isolates than in CF isolates. The high proportion of MDR/XDR profiles (50%) among the studied blood isolates could have partially explained these findings, but the proportion was not lower for CF isolates (85% were MDR/XDR).

**exoU<sup>+</sup> TTSS genotype is associated with enhanced virulence in the *C. elegans* model.** One of the most relevant virulence determinants of *P. aeruginosa* is the TTSS (34). This secretion system injects potent cytotoxins, including ExoS, ExoT, ExoU, or ExoY, into eukaryotic cells (35). Previous studies have indicated that *exoS* is present in 58 to 72% of the isolates and is typically associated with an invasive phenotype, while *exoU* is less frequent (28% to 42% of isolates) but associated with a highly cytotoxic phenotype (35).

The TTSS genotype was characterized for all studied isolates. The presence of *exoT* and *exoY* genes was documented in the vast majority of the isolates, in 139 (99%) and 130 (93%) isolates, respectively. Additionally, all of them were positive for either *exoU* (29 isolates [20.7%]) or *exoS* (103 isolates [73.6%]), except for 1 (0.7%) and 7 (5%) isolates that were positive or negative for both genes, respectively. As shown in Fig. 1C, *exoU*<sup>+</sup> *exoS*-negative isolates were significantly more virulent than *exoU*-negative *exoS*<sup>+</sup> isolates in the *C. elegans* model. Therefore, these results were in agreement with our previous data indicating that the *exoU*<sup>+</sup> *exoS*-negative genotype was associated with increased early mortality in *P. aeruginosa* bloodstream infections (6).

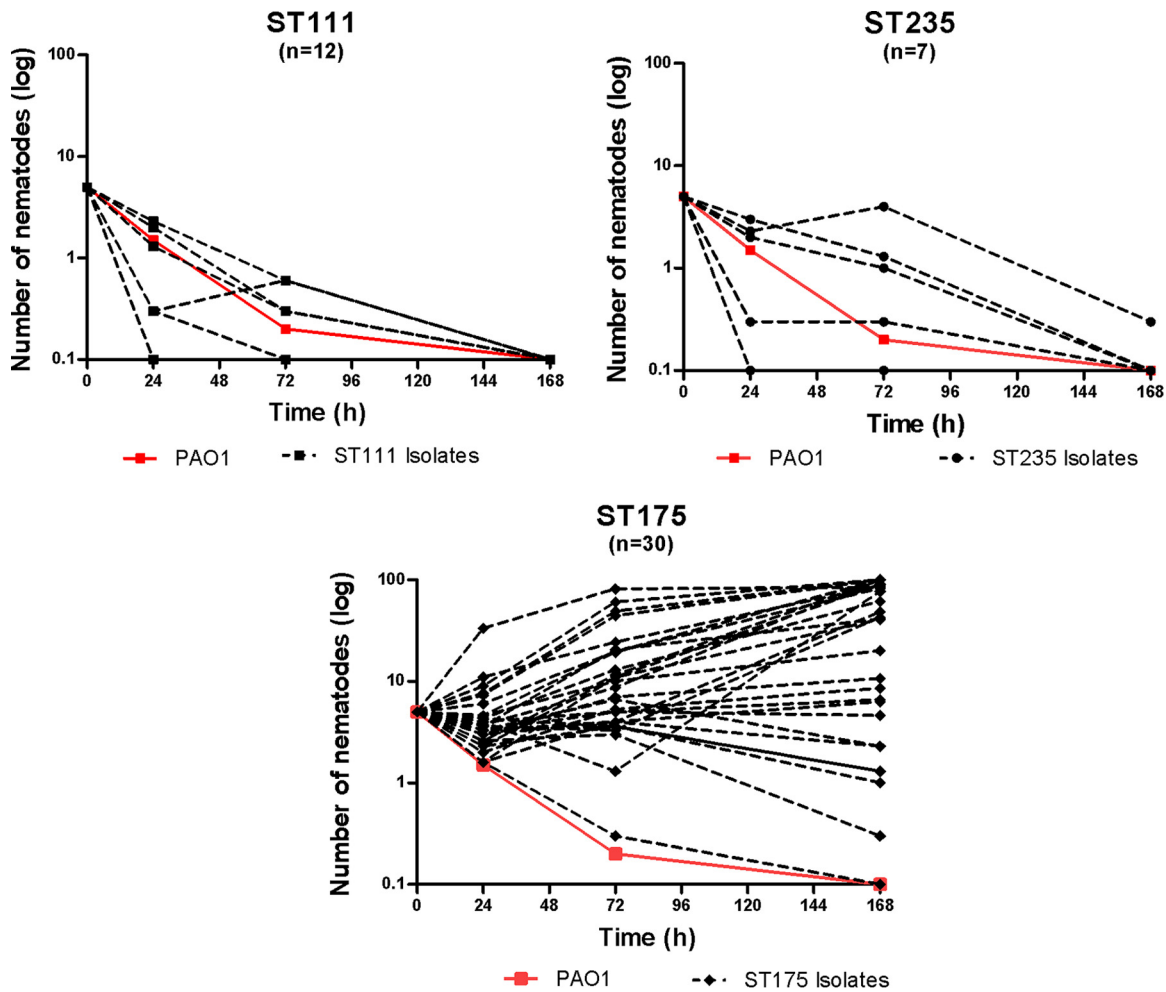
**ST175 high-risk clone is associated with reduced virulence in the *C. elegans* model.** Forty-nine of the 140 isolates studied belonged to classical high-risk clones (18), including 30 ST175, 12 ST111, and 7 ST235 isolates. Figure 1D shows the association between each of the high-risk clones and CEVS. As shown, all isolates belonging to ST111 and ST235 high-risk clones were highly virulent (CEVS, 4 to 5). In contrast, 73% of ST175 isolates were nonvirulent (CEVS, 1 to 2). Moreover, most of the remaining ST175 isolates showed only moderate virulence (CEVS, 3). Figure 2 shows the dynamics of *C. elegans* over time in the presence of the isolates belonging to the 3 major high-risk



**FIG 1** Impact on *C. elegans* virulence score (CEVS) of resistance profiles (A), source of isolation (B), TTSS genotype (C), and MLST genotype (D). Nonvirulent strains, with a CEVS of 1 to 2, are shown in Blue tones, and virulent strains, belonging to CEVS 3 to 5, are shown in red tones. \*, significantly lower virulence ( $P < 0.05$ ); \*\*, significantly higher virulence ( $P < 0.05$ ).

clones, clearly illustrating the reduced virulence of ST175 isolates compared to that of ST235 or ST111.

**Motility and pigment production does not significantly impact virulence in the *C. elegans* model.** The motility systems and pigment production are also well established as virulence determinants of *P. aeruginosa*. It is widely accepted that the diverse repertoire of bacterial motility systems (swimming, twitching, and swarming) plays a pivotal role in the invasion of fluids and surfaces, including those found in the nosocomial environment or the patient’s epithelial tissues (7, 36). Likewise, pyocyanin (a redox-active phenazine toxin) and pyoverdine (a siderophore) are well known to play a major role in bacterial physiology and pathogenesis (8, 9). We have previously described that *P. aeruginosa* high-risk clones (ST175, ST111, and ST235) were associated with a defined set of biological parameters, which included reduced motility (twitching, swimming, and swarming) and pigment production (pyoverdine and pyocyanin) (20). Therefore, we analyzed the correlations between



**FIG 2** Lethality of *P. aeruginosa* ST111 ( $n = 12$ ), ST175 ( $n = 30$ ), and ST235 ( $n = 7$ ) high-risk clone isolates in the *C. elegans* model. The mean numbers of surviving nematodes at 0, 24, 72, and 168 h are shown. PAO1 strain values (in red) are included for comparative purposes.

motility and pigment production and virulence in the *C. elegans* model. However, statistically significant differences between virulent (CEVS, 3 to 5) and nonvirulent (CEVS, 1 to 2) isolates were not observed for any of the motility types or pigments analyzed (see Fig. S1). Thus, our results indicate that none of these factors are individually essential for virulence in the *C. elegans* model.

Further univariate logistic regression analysis showed that there was a real and significant association of virulence or nonvirulence (CEVS, 3 to 5 and 1 to 2, respectively) with TTSS genotype, XDR and MultiS profiles, and the ST175 high-risk clone (Table 2). So, the *exoU* gene (odds ratio [OR] = 4.03) and MultiS resistance profile (OR =

**TABLE 2** Univariate logistic regression analysis of predictive factors for *P. aeruginosa* virulence in *C. elegans* infection model<sup>a</sup>

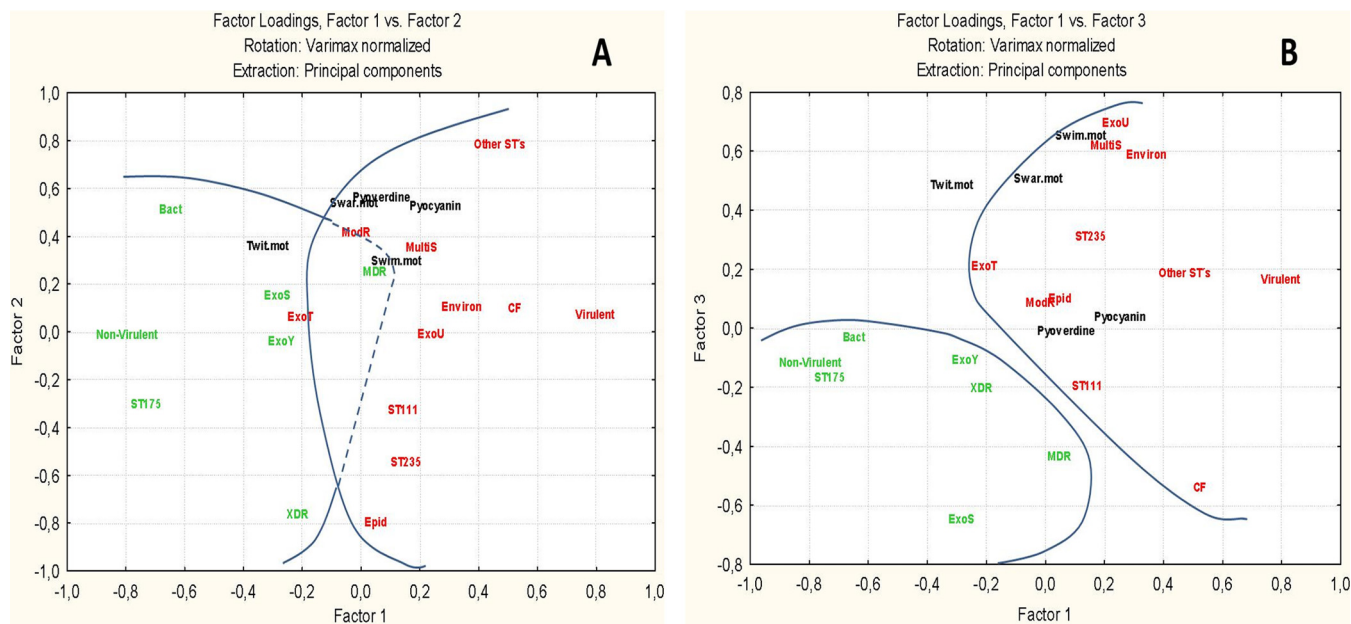
Variable	OR <sup>b</sup>	95% CI <sup>c</sup>	P value
ST175	0.06	0.02–0.15	≤0.001
<i>exoS</i>	0.27	0.09–0.82	0.021
<i>exoU</i>	4.03	1.14–14.19	0.030
XDR	0.35	0.16–0.76	0.008
MultiS	5.83	1.67–20.34	0.006

<sup>a</sup>Virulence determined as a CEVS of 3 to 5.

<sup>b</sup>OR, odds ratio.

<sup>c</sup>CI, confidence interval.





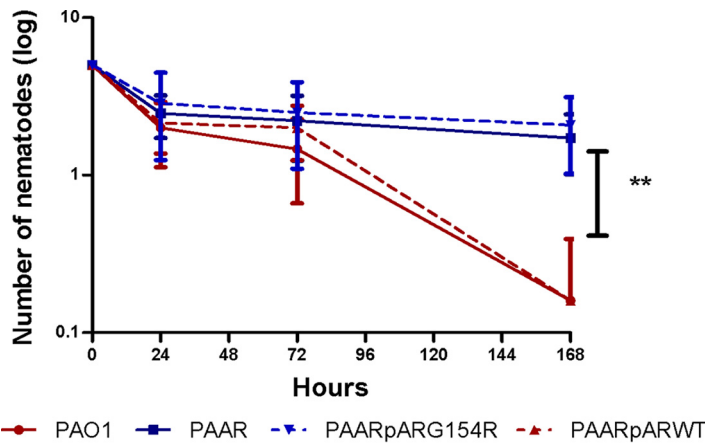
**FIG 3** Relationships among variables explaining the overall differences between virulent and nonvirulent strains. (A) Defined structure according to factors 1 to 2; differences in quantitative variables are also expressed by means and standard deviations. (B) The same structure as defined by factors 1 to 3.

5.83) were positively associated with virulence, whereas the *exoS* gene (OR = 0.27), XDR profile (OR = 0.35), and the ST175 high-risk clone (OR = 0.06) were negatively associated with virulence. We also performed a multiple logistic regression analysis to identify factors that were independently associated with virulence. All previously identified factors were initially included in the model, and after adjustment for significant variables, the ST175 high-risk clone was the only factor that demonstrated an independent association (OR = 0.68,  $P \leq 0.001$ ) with a lack of virulence in the *C. elegans* model.

A combined analysis showed the general structure of the interrelationships among quantitative and qualitative variables in association with the virulence and nonvirulence of clones against *C. elegans*. Variables are well represented in the factorial space (see Table S1) despite the differences in representation in the general matrix (Data Set S1).

Figure 3 depicts the general geometric relationships established between the different studied variables, represented in a virulence gradient. Factor 1 would order the samples in a gradient according to virulence against *C. elegans* defined by high-risk clone ST175 and the origin (bacteremia or CF) as the main markers. Factor 2 is mainly explained by an important variation on other STs, ST235, and extensively drug-resistant (XDR) isolates; there is also an important contribution to this factor of the swarming motility and pyoverdine production. Finally, factor 3 represents mainly the variation of origin (CF or environmental), resistance profile (MultiS), secretion system (ExoU and ExoS), and the swimming motility. In this factorial space, the analysis confirms that nonvirulent strains are statistically associated with ST175, bacteremia, XDR, MDR, ExoS and ExoY secretion, and lower values of swimming and swarming motility, pyoverdine, and pyocyanin. Virulent strains are associated mainly with “other STs,” ST111, ST235, epidemic, CF, and environmental origins, ModR and MultiS profiles, ExoU and ExoT secretion (as a spurious variable), and higher values for swimming and swarming motility, pyoverdine, and pyocyanin.

**Characteristic G154R AmpR mutation decreases the killing of *C. elegans* but does not fully explain the reduced virulence of ST175.** Previous works by Balasubramanian et al. (37) and Kong et al. (38) showed that AmpR is a global transcriptional regulator connected not only to the expression of the  $\beta$ -lactamase AmpC but also to



**FIG 4** Virulence on *C. elegans* of strain PAO1 and *ampR* mutants. The mean numbers of surviving nematodes at 0, 24, 72, and 168 h are shown. Values are means  $\pm$  SDs (error bars) from at least three independent experiments. A Mann-Whitney U test was performed to analyze the differences between the different mutants and PAO1. \*\*,  $P < 0.001$ ; PAAR, *ampR* knockout mutant of PAO1.

quorum sensing, alginate production, biofilm formation, and the expression of several other virulence factors. In this work, we analyzed whether AmpR affects bacterial virulence in the *C. elegans* model. Moreover, we have previously described a mutation in AmpR (G154R), detected in widespread ST175 isolates, which causes its activation as an *ampC* positive regulator and thus drives the hyperproduction of AmpC and  $\beta$ -lactam resistance (39, 40). Thus, in this work, we explored whether this specific mutation may have an impact on virulence in the *C. elegans* model. As shown in Fig. 4, the inactivation of AmpR significantly reduced the ability of *P. aeruginosa* strain PAO1 to kill *C. elegans*. Moreover, whereas complementation assays with wild-type *ampR* fully restored wild-type PAO1 virulence, complementation with the G154R *ampR* mutant did not. Therefore, these results indicate that AmpR is relevant for *P. aeruginosa* virulence in the *C. elegans* model and that the G154R mutation impairs this effect. We then examined the distribution of this specific mutation among the studied ST175 isolates. The G154R mutation was detected in 22 of 30 ST175 isolates studied (Data Set S1). However, the presence or absence of this mutation did not explain the within clone differences in CEVS, since the few ST175 isolates showing a higher virulence (CEVS, 4 or 5) also presented the mutation.

To search for potential mutations involved in the reduced virulence documented for most ST175 isolates, we compared the genomes of 2 nonvirulent ST175 isolates (CEVS, 1) with those of the only 2 highly virulent ST175 isolates (CEVS, 4 or 5). Up to 70 mutations present only in isolates (at least one) from one of the groups (virulent/nonvirulent) were detected (see Data Set S2). None of the mutations detected were exclusive of both nonvirulent isolates. However, 11 of them were present in both virulent isolates and neither of the nonvirulent isolates. Future studies are therefore needed to determine the potential implication of each of these 11 mutations, which include those for the pyocin S2 and the extracellular protease LepA, on the gain of virulence, if any. Likewise, further studies are needed for a full understanding of the frequent lack of virulence of ST175 isolates.

**Concluding remarks.** Consistent with previous data, we documented a clear inverse correlation between antimicrobial resistance and virulence for *P. aeruginosa* in the *C. elegans* model. Indeed, the lowest virulence was linked to XDR profiles, which are typically linked to defined high-risk clones. However, virulence varied broadly depending on the involved high-risk clone; it was high for ST111 and ST235 but very low for ST175. The highest virulence of ST235 could well be attributed to its *exoU*<sup>+</sup> TTSS genotype, found to be linked with higher virulence in our *C. elegans* model as well as in previous clinical studies (6). Moreover, ST235 appears to be associated with a

particularly poor clinical outcome compared to that from other MDR/XDR strains (15, 41). In contrast to ST235, ST175 seems to be associated with a particularly low virulence in the *C. elegans* model. Moreover, the obtained results suggest that a specific mutation in the transcriptional regulator AmpR contributes to the reduced virulence (39). Therefore, our results are in agreement with existing data suggesting that AmpR is a global transcriptional regulator involved not only in the regulation of antibiotic resistance but also in modulating bacterial pathogenicity (37, 38). However, the presence or absence of this mutation did not explain the within clone differences in virulence. In any case, a functional analysis of the multiple ST175 genomes available will provide further insights into the drivers of the reduced virulence of the ST175 clone, despite its wide dissemination in countries such as Spain or France (40). Altogether, our results provide a major step forward for understanding the interplay between *P. aeruginosa* resistance profiles, high-risk clones, and virulence.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, susceptibility testing, and molecular typing.** A total of 140 *P. aeruginosa* isolates were evaluated. The collection comprised 80 bloodstream isolates from a Spanish multicenter study, including 20 isolates per resistance profile (XDR, MDR, ModR, and MultiS), as well as 20 epidemic XDR isolates recovered from several different outbreaks and producing diverse chromosomal and/or horizontally acquired resistance mechanisms (20). Susceptibility profiles, multilocus sequence typing (MLST) genotypes, motility, and pigment production had been already assessed in a previous study for those isolates (20). The studied collection additionally included 20 isolates from CF patients recovered during a recent multicenter study from Spain (42) and 20 environmental isolates provided by Saniconsult (Palma, Spain) recovered in 2010 from diverse sources. MICs of ticarcillin (TIC), piperacillin plus tazobactam (PIP-Tz), aztreonam (AZT), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), imipenem (IMP), meropenem (MER), ciprofloxacin (CIP), tobramycin (TOB), ceftolozane plus tazobactam (TOL-TAZ), amikacin (AMI), and colistin (COL) were determined by broth microdilution following CLSI guidelines and breakpoints (43). The genotypes were documented through MLST using previously described schemes, protocols, available databases, and tools (<http://pubmlst.org/paeruginosa>) (44). Whole-genome sequences from selected ST175 isolates were obtained from previous studies (40). Likewise, *ampR* sequences for all ST175 isolates were obtained either from previous works (39, 40) or, if not available, by PCR amplification and Sanger sequencing in this study.

**TTSS PCR genotyping.** The detection of *exoS*, *exoT*, *exoY*, and *exoU* genes was performed with primers and the protocol described by Feltman et al. (45). PCR assays to detect the presence of *exo* genes were performed on whole-DNA extracts (DNeasy tissue kit; Qiagen, Hilden, Germany) under the following conditions: denaturation for 12 min at 94°C, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 30 s, and a final extension step of 10 min at 72°C.

**Motility assays. (i) Swimming motility.** Swimming medium plates (10 g/liter tryptone, 5 g/liter NaCl, and 0.3% [wt/vol] mid-resolution agarose) were inoculated with isolated colonies from an overnight culture in LB agar (10 g/liter tryptone, 5 g/liter yeast extract, 10 g/liter NaCl, and 1% agar) at 37°C by use of a sharp sterile toothpick, introducing it to up to half the thickness of the medium (46).

**(ii) Swarming motility.** Strains were spot inoculated on swarm agar plates (M8 minimal medium supplemented with 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.2% glucose, 0.5% Bacto Casamino Acids, and 0.5% agar), using 2.5- $\mu$ l aliquots taken from overnight LB broth cultures (47).

**(iii) Twitching motility.** Isolated colonies were inoculated with a sharp sterile toothpick inserted to the bottom of twitching medium (LB agar) plates (46). In all cases, 90-mm plates were filled with 30 ml of medium, briefly dried for 2 h, and inoculated in triplicate experiments. The plates were then wrapped with Parafilm M to prevent dehydration and incubated at 37°C for 16 h. After incubating, the zone of motility was measured. In the case of twitching medium, the agar-petri dish interface was measured. If the area to be measured was irregular, two perpendicular diameters were measured and the result was expressed as the mean of the two values.

**Pigment production.** Production of pyocyanin and pyoverdine was quantified as described previously (48). Briefly, bacterial strains were grown at 37°C in *Pseudomonas* ACC broth for 40 h. At this time, bacteria were pelleted by centrifugation, and the amount of the blue pigment pyocyanin was evaluated by measuring the absorbance of the supernatants at 690 nm. The amount of pyoverdine was measured by fluorescence emission, by exciting the supernatants at 400 nm and measuring the emission at 460 nm. Each experiment was performed in triplicate.

***C. elegans* killing assay.** The assay for studying bacterial killing of *C. elegans* was performed as described previously (49). Briefly, a fresh culture of each bacterial strain to be tested was layered on a 55-mm-diameter plate containing 5 ml of potato dextrose agar. After spreading the bacterial culture, the plates were incubated at 37°C for 24 h to form bacterial lawns. The bacterial plates were kept overnight, and 5 worms per plate were poured on top of these bacterial lawns. The plates were incubated at 24°C and scored to detect the presence of living worms at 0 h, 24 h, 72 h, and 168 h. The nematodes were examined at  $\times 20$  and  $\times 40$  magnifications, and a worm was considered dead if it did not move spontaneously. At least three independent replicate experiments per bacterial strain were performed and the means and standard deviations (SDs) were recorded. Additionally, to determine the effect of the G154R AmpR mutation on virulence, we performed *C. elegans* killing assays in the wild-type PAO1 strain,

the *ampR* knockout mutant of PAO1 (PAΔR), and the PAΔR strain complemented with either the cloned wild-type *ampR* (pARWT) or its G154R mutant (pARG154R). These strains were constructed in a previous study (39). To establish a comprehensive comparative analysis of the lethality of the large collection of clinical isolates tested, a *C. elegans* virulence score (CEVS) was developed. As described in Table 1, the isolates were classified into 5 virulence levels depending on the effect on the growth of the nematodes, including two (CEVS, 1 to 2) in which the strains were considered nonvirulent (do not kill the nematode) and three (CEVS, 3 to 5) in which the strains were considered virulent (kill the nematode).

**Statistical analysis.** Quantitative variables were compared using the Mann-Whitney U test or the Student *t* test, as appropriate. Chi-square ( $\chi^2$ ) and Fisher's exact tests were used to determine the association between factors and virulence. In all cases, a *P* value of  $\leq 0.05$  was considered statistically significant. Multivariate analyses were performed by logistic regression; variables were introduced in the models and selected using a stepwise backward process, where 0.15 was set as the limit for removal of terms. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 or IBM SPSS Statistics v22 software. Factorial analysis was performed using principal components as the method of extraction after the data were varimax normalized. The general structure of clones and variables was tested by correspondence analysis. For both factorial and correspondence analyses, the Statistica software package was used (Statistica data analysis software system, version 6; Tibco Software, Inc.).

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/AAC.01586-17>.

**SUPPLEMENTAL FILE 1**, PDF file, 0.3 MB.

**SUPPLEMENTAL FILE 2**, XLSX file, 2.7 MB.

**SUPPLEMENTAL FILE 3**, XLSX file, 0.1 MB.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the clinical microbiologists and clinicians participating in the REIPI multicenter study of *P. aeruginosa* bloodstream infections (PI08/0276) and the multicenter study of cystic fibrosis respiratory infections (PI12/00734). We also thank Pilar Sanchis and Guillem Frontera from IdisBa for statistical support.

This work was supported by the Planes Nacionales de I+D+i 2008-2011/2013-2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015/0006, RD12/0015/004, RD16/0016/0004, RD16/0016/008, and RD16/0016/0011) and grants PI15/00088 and PI12/00734. This work was cofinanced by grants from the European Development Regional Fund "A way to achieve Europe" and operative program Intelligent Growth (2014-2020). I.S.-D. is the recipient of a P-FIS fellowship from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad.

We declare no conflict of interests.

## REFERENCES

- Gellatly SL, Hancock RE. 2013. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* 67:159–173. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>.
- Silby MW, Winstanley C, Godfrey SA, Levy SB, Jackson RW. 2011. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* 35: 652–680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>.
- López-Causapé C, Rojo-Molinero E, Macià MD, Oliver A. 2015. The problems of antibiotic resistance in cystic fibrosis and solutions. *Expert Rev Respir Med* 9:73–88. <https://doi.org/10.1586/17476348.2015.995640>.
- Vincent JL. 2003. Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet* 361:2068–2077. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13644-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13644-6).
- Battle SE, Meyer F, Rello J, Kung VL, Hauser AR. 2008. Hybrid pathogenicity island PAGI-5 contributes to the highly virulent phenotype of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in mammals. *J Bacteriol* 190:7130–7140. <https://doi.org/10.1128/JB.00785-08>.
- Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, Almirante B, Pomar V, Aguilar M, Granados A, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Rodríguez-López F, Tubau F, Martínez-Martínez L, Oliver A, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). 2015. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Infect Dis* 60:539–548. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu866>.
- Feinbaum RL, Urbach JM, Liberati NT, Djonovic S, Adonizio A, Carvunis AR, Ausubel FM. 2012. Genome-wide identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence-related genes using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *PLoS Pathog* 8:e1002813. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002813>.
- Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. 2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* 10:599–606. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.10.002>.
- Visca P, Imperi F, Lamont IL. 2007. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol* 15:22–30. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.11.004>.
- Leibovici L, Shraga I, Drucker M, Konigsberger H, Samra Z, Pitliks SD. 1998. The benefit of appropriate empirical antibiotic treatment in patients with bloodstream infection. *J Intern Med* 244:379–386. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.1998.00379.x>.
- Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, Van Laethem Y, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A, Tulkens PM, Van Bambeke F. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutics options in the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* 13:560–578. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01681.x>.
- Peña C, Suarez C, Ocampo-Sosa A, Murillas J, Almirante B, Pomar V, Aguilar M, Granados A, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Rodríguez F, Tubau F,



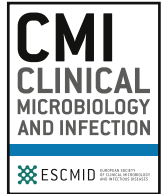
- Oliver A, Martínez-Martínez L, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). 2013. Effect of adequate single-drug vs combination antimicrobial therapy on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: a post hoc analysis of a prospective cohort. *Clin Infect Dis* 57:208–216. <https://doi.org/10.1093/cid/cit223>.
13. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 22:582–610. <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>.
  14. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 35:736–755. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>.
  15. Viedma E, Juan C, Acosta J, Zamorano L, Otero JR, Sanz F, Chaves F, Oliver A. 2009. 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* 53:4930–4933. <https://doi.org/10.1128/AAC.00900-09>.
  16. Suarez C, Peña C, Arch O, Dominguez MA, Tubau F, Juan C, Gavalda L, Sora M, Oliver A, Pujol M, Ariza J. 2011. A large sustained endemic outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*: a new epidemiological scenario for nosocomial acquisition. *BMC Infect Dis* 11:272. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-272>.
  17. Viedma E, Juan C, Villa J, Barrado L, Orellana MA, Sanz F, Otero JR, Oliver A, Chaves F. 2012. VIM-2-producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST175 clone, Spain. *Emerg Infect Dis* 18:1235–1241. <https://doi.org/10.3201/eid1808.111234>.
  18. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. 2015. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat* 21–22: 41–59. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.08.002>.
  19. Juan C, Peña C, Oliver A. 2017. Host and pathogen biomarkers for severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* 215:S44–S51. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw299>.
  20. Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Zamorano L, Juan C, Tubau F, Rodríguez C, Moyà B, Peña C. 2013. Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* 57:5527–5535. <https://doi.org/10.1128/AAC.01481-13>.
  21. Gómez-Zorrilla S, Juan C, Cabot G, Camoez M, Tubau F, Oliver A, Domínguez MA, Ariza J, Peña C. 2016. Impact of multidrug resistance on the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*: in vitro and in vivo studies. *Int J Antimicrob Agents* 47:368–374. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.02.010>.
  22. Tan MW, Rahme LG, Sternberg JA, Tompkins RG, Ausubel FM. 1999. *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2408–2413. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2408>.
  23. Silverman GA, Luke CJ, Bhatia SR, Long OS, Vetica AC, Perlmutter DH, Pak SC. 2009. Modeling molecular and cellular aspects of human disease using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Pediatr Res* 65:10–18. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819009b0>.
  24. Tan MW, Shapira M. 2011. Genetic and molecular analysis of nematode-microbe interactions. *Cell Microbiol* 13:497–507. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01570.x>.
  25. Lakshmanan U, Yap A, Fulwood J, Yichun L, Hoon SS, Lim J, Ting A, Sem XH, Kreisberg JF, Tan P, Tan G, Flotow H. 2014. Establishment of a novel whole-animal HTS technology platform for melioidosis drug discovery. *Comb Chem High Throughput Screen* 17:790–803. <https://doi.org/10.2174/1386207317666141019195031>.
  26. Moy TI, Conery AL, Larkins-Ford J, Wu G, Mazitschek R, Casadei G, Lewis K, Carpenter AE, Ausubel FM. 2009. High-throughput screen for novel antimicrobials using a whole animal infection model. *ACS Chem Biol* 4:527–533. <https://doi.org/10.1021/cb900084v>.
  27. O'Reilly LP, Benson JA, Cummings EE, Perlmutter DH, Silverman GA, Pak SC. 2014. Worming our way to novel drug discovery with the *Caenorhabditis elegans* proteostasis network, stress response and insulin-signaling pathways. *Expert Opin Drug Discov* 9:1021–1032. <https://doi.org/10.1517/17460441.2014.930125>.
  28. Mahajan-Miklos S, Tan MW, Rahme LG, Ausubel FM. 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa* *Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96:47–56. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80958-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80958-7).
  29. Tan MW, Mahajan-Miklos S, Ausubel FM. 1999. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:715–720. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.715>.
  30. Kurz CL, Ewbank JJ. 2000. *Caenorhabditis elegans* for the study of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol* 8:142–144. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01691-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01691-1).
  31. Tan MW, Ausubel FM. 2000. *Caenorhabditis elegans*: a model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 3:29–34. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)00047-8](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)00047-8).
  32. Abdelraouf K, Kabbara S, Ledesma KR, Poole K, Tam VH. 2011. Effect of multidrug resistance-conferring mutations on the fitness and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 66:1311–1317. <https://doi.org/10.1093/jac/ckr105>.
  33. Sun Z, Jiao Peng XQ, Jiang F, Huang Y, Zhang J, Yao F. 2013. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is associated with decreased fitness. *Cell Physiol Biochem* 31:347–354. <https://doi.org/10.1159/000343372>.
  34. Engel J, Balachandran P. 2009. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* 12:61–66. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.12.007>.
  35. Hauser AR. 2009. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 7:654–665. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2199>.
  36. Jarrell KF, McBride MJ. 2008. The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol* 6:466–476. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1900>.
  37. Balasubramanian D, Schnepfer L, Merighi M, Smith R, Narasimhan G, Lory S, Mathee K. 2012. The regulatory repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β-lactamase regulator AmpR includes virulence genes. *PLoS One* 7:e34067. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034067>.
  38. Kong KF, Jayawardena SR, Indulkar SD, Del Puerto A, Koh CL, Hoiby N, Mathee K. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB beta-lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4567–4575. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.11.4567-4575.2005>.
  39. 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). 2012. Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* 56:6349–6357. <https://doi.org/10.1128/AAC.01388-12>.
  40. Cabot G, López-Causapé C, Ocampo-Sosa AA, Sommer LM, Domínguez MÁ, Zamorano L, Juan C, Tubau F, Rodríguez C, Moyà B, Peña C, Martínez-Martínez L, Plesiat P, Oliver A. 2016. Deciphering the resistance of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 175 international high-risk clone through whole-genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 60:7415–7423. <https://doi.org/10.1128/AAC.02676-15>.
  41. Edelstein VM, Skleenova EN, Shevchenko OV, D'souza JW, Tapalski DV, Azizov IS, Sukhorukova MV, Pavlukov RA, Kozlov RS, Toleman MA, Walsh TR. 2013. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study. *Lancet Infect Dis* 13:867–876. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70168-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70168-3).
  42. López-Causapé C, de Dios-Caballero J, Cobo M, Escribano A, Asensio O, Oliver A, del Campo R, Cantón R, Spanish Group for the Study of Bronchopulmonary Colonisation/Infection in Cystic Fibrosis. 2017. Antibiotic resistance and population structure of cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a Spanish multicentre study. *Int J Antimicrob Agents* 50:334–341. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.03.034>.
  43. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI document M07-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
  44. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. 2004. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 42:5644–5649. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004>.
  45. Feltman H, Schulert G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR. 2001. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 147:2659–2669. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-10-2659>.
  46. Rashid MH, Kornberg A. 2000. Inorganic polyphosphate is needed for

- swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A 97:4885–4890. <https://doi.org/10.1073/pnas.060030097>.
47. Caiazza NC, Shanks RM, O'Toole GA. 2005. Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 187: 7351–7361. <https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7351-7361.2005>.
48. Sánchez P, Linares JF, Ruiz-Díez B, Campanario E, Navas A, Baquero F, Martínez JL. 2002. Fitness of in vitro selected *Pseudomonas aeruginosa* *nalB* and *nfxB* multidrug-resistant mutants. J Antimicrob Chemother 50:657–664. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf185>.
49. Navas A, Cobas G, Talavera M, Ayala JA, López JA, Martínez JL. 2007. Experimental validation of Haldane's hypothesis on the role of infection as an evolutionary force for metazoans. Proc Natl Acad Sci U S A 104:13728–13731. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704497104>.



Contents lists available at ScienceDirect

## Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: [www.clinicalmicrobiologyandinfection.com](http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com)

## Original Article

Weighting the impact of virulence on the outcome of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections

I. Sánchez-Diener<sup>1</sup>, L. Zamorano<sup>1,\*</sup>, C. Peña<sup>2</sup>, A. Ocampo-Sosa<sup>3</sup>, G. Cabot<sup>1</sup>,  
S. Gómez-Zorrilla<sup>4</sup>, B. Almirante<sup>5</sup>, M. Aguilar<sup>6</sup>, A. Granados<sup>7</sup>, E. Calbo<sup>8</sup>,  
J. Rodríguez-Baño<sup>9</sup>, F. Rodríguez-López<sup>10,11,12</sup>, F. Tubau<sup>13,14</sup>,  
L. Martínez-Martínez<sup>10,11,12</sup>, A. Navas<sup>15</sup>, A. Oliver<sup>1,\*\*</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Microbiología and Unidad de Investigación, Hospital Son Espases, Instituto de Investigación Sanitaria de les Illes Balears, Palma de Mallorca, Spain

<sup>2</sup> Servicio de Medicina Interna, Hospital Virgen de los Lirios, Alcoy, Spain

<sup>3</sup> Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, Spain

<sup>4</sup> Hospital del Mar, Servicio de Enfermedades Infecciosas, Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas, Barcelona, Spain

<sup>5</sup> Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Vall d'Hebrón, Barcelona, Spain

<sup>6</sup> Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

<sup>7</sup> Sección de Enfermedades Infecciosas, Consorci Hospitalari Parc Taulí, Sabadell, Spain

<sup>8</sup> Sección de Enfermedades Infecciosas Hospital Mutua de Terrassa, Barcelona, Spain

<sup>9</sup> Unidad de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva, Hospital Universitario Virgen Macarena and Departamento de Medicina, Universidad de Sevilla-IBiS, Sevilla, Spain

<sup>10</sup> Unidad de Gestión Clínica de Microbiología, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain

<sup>11</sup> Departamento de Microbiología, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

<sup>12</sup> Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba, Córdoba, Spain

<sup>13</sup> Hospital de Bellvitge, Bellvitge Biomedical Research Institute, Universidad de Barcelona L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>14</sup> CIBER de Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>15</sup> Departamento de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 15 April 2019

Received in revised form

25 June 2019

Accepted 27 June 2019

Available online xxx

Editor: L Leibovici

## Keywords:

Bloodstream infections

*Caenorhabditis elegans*

*Pseudomonas aeruginosa*

Virulence

## ABSTRACT

**Objectives:** We assessed the association between the lethality of *Pseudomonas aeruginosa* in a *Caenorhabditis elegans* model and outcomes of *P. aeruginosa* bloodstream infections.

**Methods:** A total of 593 *P. aeruginosa* bloodstream isolates recovered from a prospective Spanish multicentre study were analysed. Clinical variables, susceptibility profiles and Type III Secretion System (TTSS) genotypes (*exoU/exoS* genes) were available from previous studies. A *C. elegans* virulence score (CEVS) was used, classifying the isolates into high (CEVS 4–5), intermediate (CEVS 3) and low (CEVS 1–2) virulence. The main outcome analysed was 30-day mortality.

**Results:** Up to 75% (446/593) of the isolates showed a high-virulence phenotype, and 17% (101/593) a low-virulence one. No association between virulence phenotype and the main outcome variable (30-day mortality) was found (29/101 (28.7%) versus 127/446 (28.5%), *p* 1). However, an inverse association between *C. elegans* virulence and multidrug-resistant and extensively drug-resistant profiles was documented (OR 0.655 (95% CI 0.571–0.751) and OR 0.523 (95% CI 0.436–0.627), *p* <0.001, respectively), whereas the *exoU* genotype was significantly more frequent among isolates showing high virulence (10/101 (9.9%) versus 112/446 (25.1%), *p* <0.001). Moreover, although significance was not reached, strains showing a high-virulence phenotype tended to be associated with community-acquired infections (1/101 (1%) versus 25/446 (5.6%), *p* 0.065), whereas low-virulence phenotypes tended to be associated with a higher illness severity (such as higher median Pitt score: 2 (1–4) versus 1 (0–3), *p* 0.036, or initial multiorgan dysfunction: 17/101 (16.8%) versus 41/446 (9.2%), *p* 0.024), with some underlying conditions

\* Corresponding authors. L. Zamorano and A. Oliver, Servicio de Microbiología and Unidad de Investigación, Hospital Universitario Son Espases, Instituto de Investigación Sanitaria de les Illes Balears (IdisBa), Crtra Valldemossa 79, 07120, Palma de Mallorca, Spain.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [laura.zamorano@ssib.es](mailto:laura.zamorano@ssib.es) (L. Zamorano), [antonio.oliver@ssib.es](mailto:antonio.oliver@ssib.es) (A. Oliver).

(such as chronic renal failure 24/101 (23.8%) versus 59/446 (13.2%),  $p$  0.013), and with the respiratory source of infections (17/101 (16.8%) versus 45/446 (10.1%),  $p$  0.058).

**Conclusions:** Our results indicate that the *P. aeruginosa* virulence phenotype in a *C. elegans* model correlates with virulence genotype (TTSS) and resistance profile, but it is a poor prognostic marker of mortality in bloodstream infections. **I. Sánchez-Diener, Clin Microbiol Infect 2019;•••**

© 2019 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* is one of the most frequent and severe causes of nosocomial infections, particularly in intensive care and immunocompromised patients, and is the main cause of chronic respiratory infections in cystic fibrosis (CF) [1,2]. The growing prevalence of infections produced by multidrug-resistant (MDR) or extensively drug-resistant (XDR) *P. aeruginosa* strains compromises the selection of appropriate treatments [3–5]. Moreover, recent works have evidenced the existence of MDR/XDR clones of *P. aeruginosa* disseminated in many hospitals worldwide, denominated epidemic high-risk clones [6]. Among them, sequence types ST111, ST175 and ST235 are the most widespread [7].

Multiple virulence factors contribute to the pathogenesis of *P. aeruginosa* infections, including multiple toxins, motile systems and pigments [8–12]. One of the most relevant *P. aeruginosa* virulence factors is the Type III Secretion System (TTSS), which directly injects effector toxins (ExoT, ExoY, ExoS and ExoU) into the host cells [13]. Among them, ExoU is associated with a highly virulent phenotype and poor prognosis in patients with pneumonia and bacteraemia [14–16].

Understanding the interplay between antimicrobial resistance and virulence is of paramount relevance for the analysis of the outcomes of *P. aeruginosa* infections [7,16,17]. Indeed, resistance profiles and TTSS genotype were significantly interconnected in a previous study, having a major impact on the mortality of *P. aeruginosa* bloodstream infections [16]. However, although the effect of the expression of some specific virulence determinants has been assessed, to our knowledge, the impact of the degree of virulence on the outcome of *P. aeruginosa* infections has not yet been analysed. Therefore, in this work, we used a previously described virulence score in the *Caenorhabditis elegans* infection model [18] to analyse a large multicentre prospective cohort of *P. aeruginosa* bacteraemia [19], with the main objective of investigating the impact of the virulence phenotype on mortality, to assess the predictive value of *C. elegans* lethality as a prognostic marker in *P. aeruginosa* bloodstream infections.

## Methods

### Bacterial strains and susceptibility testing

A total of 593 well-characterized *P. aeruginosa* bloodstream isolates recovered from a prospective Spanish multicentre study performed between January 2008 and December 2009 [19] were evaluated. All patients older than 18 years with *P. aeruginosa* bacteraemia were recruited and monitored for 30 days after the first positive blood culture; only those with polymicrobial bacteraemia were excluded from the study. For the present study, only the first bacteraemia episode for each patient was included (593 of a total of 632 isolates). The MICs of ticarcillin, piperacillin plus tazobactam, aztreonam, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, ciprofloxacin, tobramycin, ceftolozane plus tazobactam, amikacin and colistin were determined by broth microdilution in previous works

following CLSI guidelines and breakpoints [5]. Resistance phenotype stratification of *P. aeruginosa* isolates was made in accordance with Magiorakos et al. [20]. An MDR *P. aeruginosa* was defined as a strain non-susceptible to at least one agent in three or more antipseudomonal antimicrobial categories. An XDR *P. aeruginosa* was defined as non-susceptible to at least one agent in all but up to two antipseudomonal antimicrobial categories; hence, an XDR isolate was also included in the MDR category. Information on the TTSS genotype (presence of *exoU* and/or *exoS* genes) was also available from a previous work [16]. Likewise, information on clonal types (multilocus sequence typing) was also available for XDR isolates [16]. This study was approved by the local ethics committees of the participating centres.

### Variables and definitions

The following variables, available from previous works [5,16,19] were considered: age and sex; underlying diseases and severity of illness estimated by the Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) in intensive care unit patients; presence of neutropenia and use of immunosuppressive therapy; origin of bacteraemia (low and high risk) according to Kang et al. [21]; severity of acute illness at presentation according to the Pitt Score; presence of septic shock and multiorgan dysfunction syndrome (MODS) at presentation and at 48 h; resistance profile and presence of *exoS/U* genes.

### *Caenorhabditis elegans* killing assay

The assay for studying bacterial killing of *C. elegans* was performed as described previously [22]. Briefly, a fresh culture of each bacterial strain to be tested was layered on a 55-mm-diameter plate containing 5 mL of potato dextrose agar. After spreading the bacterial culture, the plates were incubated at 37°C for 24 h to form bacterial lawns. The bacterial plates were kept overnight, and five adult hermaphrodite worms per plate were poured on top of these bacterial lawns. The plates were incubated at 22°C and scored to detect the presence of living worms at 0, 24, 72 and 168 h. The nematodes were examined at  $\times 20$  and  $\times 40$  magnifications, and a worm was considered dead if it did not move spontaneously. At least three independent replicate experiments per bacterial strain were performed and the means and standard deviations were recorded. A *C. elegans* virulence score (CEVS) slightly modified from a previous work, in which the virulence of 80 isolates from the same collection was evaluated [18], was used to establish a comprehensive comparative analysis of lethality for the large collection of clinical isolates tested. As described in the previous work [18], the isolates were classified into five virulence levels depending on the effect on the growth of the nematodes during the 7 days of the experiment, including two (CEVS 1–2) in which the strains were considered of low virulence (allow the multiplication of the nematode), one (CEVS 3) was of intermediate virulence (inhibit multiplication of the nematode) and two (CEVS 4–5) were of high virulence (kill the nematode).



### Statistical analysis

Data are presented as means and standard deviations, medians and interquartile ranges or numbers and percentages. The different variables were analysed using Mann–Whitney *U* test or the Student's *t* test, as appropriate. Chi-squared and Fisher's exact tests were used to determine the association between factors and virulence or mortality. In all cases, a *p* value of <0.05 was considered statistically significant. Univariate logistic regression analysis was used to show an inverse or direct association between CEVS as an independent variable and resistance profile (susceptible (S), MDR and XDR) and presence of *exoS/U* genes as a dependent variable. Univariate and multivariate logistic regression analyses were performed to identify variables associated with virulence using dependent variables categorized as high virulence (CEVS 4–5) and low virulence (CEVS1–2). In the binary logistic regression analysis, we initially included all variables with *p* value <0.1 in the corresponding univariate analysis. All statistical analyses were performed using GRAPHPAD PRISM 5 or IBM SPSS Statistics v22 software.

### Results

#### Virulence of *P. aeruginosa* bloodstream isolates in *C. elegans* model

We determined the virulence of 593 isolates from individuals with a single episode of *P. aeruginosa* bacteraemia, using the *C. elegans* infection model. The nematode killing dynamics and distribution of CEVS values are shown in Fig. 1. Up to 254 (42.9%) and 192 (32.4%) of the isolates were classified as CEVS 4 and CEVS 5, respectively. Hence, up to 446 (75.3%) of the isolates were considered of high virulence. On the other hand, 45 (7.6%) and 56 (9.5%) of the isolates were classified as CEVS 1 and CEVS 2, respectively, yielding a 17.1% rate of low-virulence isolates. Finally, 45 (7.6%) of the isolates were classified as CEVS 3 (intermediate virulence).

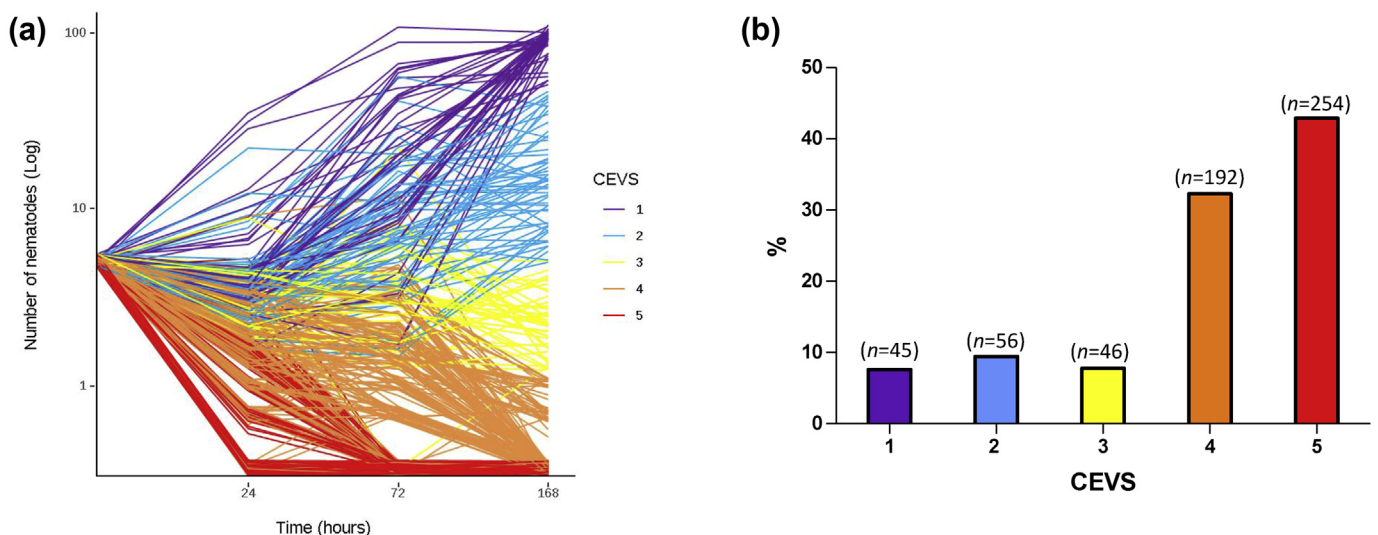
#### Association of TTSS genotype and resistance profile with virulence in *C. elegans* model

Two hundred (33.7%) isolates showed an MDR phenotype, and 68 of them (34.0% of MDR isolates, 11.5% of all isolates) an XDR

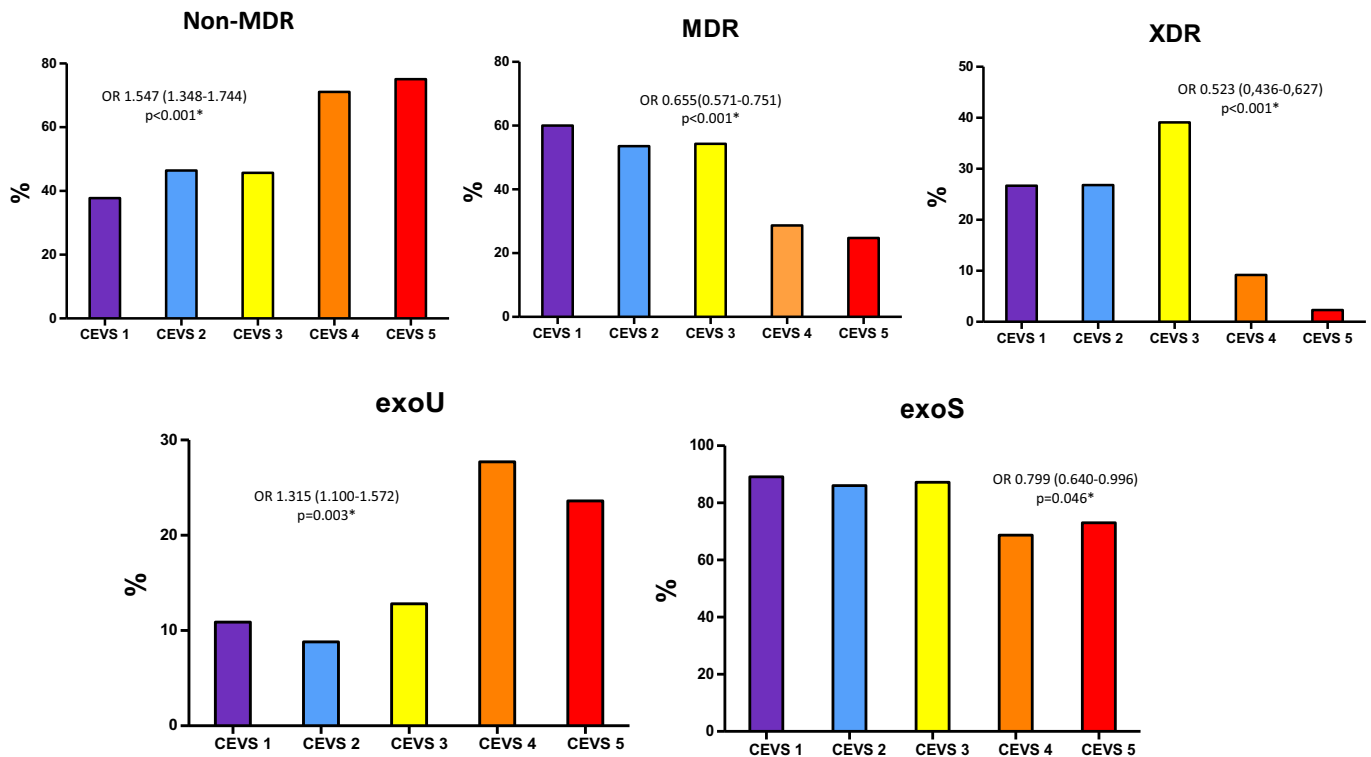
phenotype. As shown in Fig. 2, an inverse association between CEVS and MDR and XDR profiles was documented (OR 0.655 (95% CI 0.571–0.751) and OR 0.523 (95% CI 0.436–0.627), respectively). Moreover, isolates showing a low-virulence phenotype (CEVS 1–2) were more frequently MDR (56/101 (56%) versus 118/446 (26.5%), *p* < 0.0001) and XDR (27 (27%) versus 24 (5.4%), *p* < 0.0001) than those showing a high-virulence (CEVS 4–5) phenotype (Table 1). Regarding TTSS genotype, *exoS* was detected in 406 isolates (68.4%), whereas *exoU* was found in 122 (20.6%). As shown in Fig. 2, CEVS were associated with *exoU* (OR 1.315, 95% CI 1.100–1.572). Likewise, the *exoU* genotype was significantly more frequent among isolates showing high virulence (CEVS 4–5) than those showing low virulence (CEVS 1–2) (25/446 (25.1%) versus 10/101 (9.9%), respectively, *p* < 0.001), whereas the opposite effect was documented for the *exoS* genotype (318 (71.3%) versus 88 (87%), respectively, *p* < 0.001) (Table 1).

#### Impact of virulence phenotype in the characteristics and outcome of *P. aeruginosa* bloodstream infections

The associations between clinical features of patients with *P. aeruginosa* bacteraemia and virulence in a *C. elegans* model are summarized in Table 1. Statistically significant differences were not observed for most of the studied parameters, including 30-day (late) and 5-day (early) mortality. However, the low-virulence phenotype was associated with a higher Pitt Score (2 (1–4) versus 1 (0–3), *p* 0.036], initial MODS (17/101 (16.8%) versus 41/446 (9.2%), *p* 0.024), shock/MODS at 48 (29 (28.7%) versus 87 (20.0%), *p* 0.047), chronic renal failure (24 (23.8%) versus 59 (13.2%), *p* 0.013) and immunosuppression (33 (32.7%) versus 102 (22.9%), *p* 0.042). Moreover, even if statistical significance was not reached, a tendency was documented for an association between community-acquired infections and high-virulence phenotype (*p* 0.065) and between respiratory infections and low-virulence phenotype (*p* 0.058). Likewise, univariate logistic regression analysis showed that the *exoU* gene (OR 3.05, 95% CI 1.53–6.07) and non-MDR susceptibility profile (OR 3.66, 95% CI 2.34–5.73) were positively associated with virulence whereas the *exoS* gene (OR 0.37, 95% CI 0.20–0.69), MDR phenotype (OR 0.28, 95% CI 0.18–0.44), XDR phenotype (OR 0.15, 95% CI 0.08–0.28), Pitt Score  $\geq 2$  (OR 0.62, 95%



**Fig. 1.** Virulence of the 593 *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream isolates in the *Caenorhabditis elegans* model. (a) Nematode lethality/multiplication dynamics in the presence of *P. aeruginosa* isolates over 7 days. The *P. aeruginosa* isolates were classified into five virulence levels (*C. elegans* virulence scores (CEVS) 1–5) depending on the effect on the growth of the nematodes, and each one is indicated with a different colour. They include two (CEVS 1–2) in which the strains were considered of low virulence (allow the multiplication of the nematode), one (CEVS 3) of intermediate virulence (inhibit multiplication of the nematode) and two (CEVS 4–5) of high virulence (kill the nematode). (b) Prevalence of each CEVS category among the 593 bloodstream isolates studied. Absolute numbers are indicated.



**Fig. 2.** Distribution of *Caenorhabditis elegans* virulence score (CEVS) categories according to susceptibility profiles (non-multidrug-resistant (Non-MDR), MDR, extensively drug-resistant (XDR)) and Type III Secretion System (TTSS) genotype (presence of *exoU* and *exoS* genes). Odds ratios (95% CI) of CEVS using susceptibility profiles and presence of *exoU/S* as dependent variable were determined. Statistical significance indicated (\*p < 0.05).

CI 0.40–0.95), initial MODS (OR 0.50, 95% CI 0.27–0.92), chronic renal failure (OR 0.49, 95% CI 0.29–0.83) and immunosuppression (OR 0.61, 95% CI 0.38–0.98) were negatively associated with virulence (Fig. 3). However, after adjusting for underlying conditions and bacteraemia origin, the predictive factors that were independently associated with virulence were TTSS genotype, *exoS* and *exoU* genes (OR 0.35 (95% CI 0.19–0.66) and OR 3.38 (95% CI 1.66–6.90), respectively) and susceptibility profiles S/MDR/XDR (OR 3.81 (95% CI 2.36–6.16), OR 0.27 (95% CI 0.17–0.44) and OR 0.15 (95% CI 0.078–0.30), respectively).

Virulence in *C. elegans* model was also included as a variable in the analysis of the factors associated with mortality in *P. aeruginosa* bloodstream infections (see Supplementary material, Table S1). As already evidenced in the previous analysis [5,16], age of patients, immunosuppression, neutropenia, haematological malignancy, cirrhosis, respiratory or unknown bacteraemia source, intensive care unit stay, Pitt Score and MDR/XDR strains, were statistically linked to mortality (p < 0.05). On the other hand, others parameters, such as vascular catheter and urinary origin as source of bacteraemia and non-MDR profiles, were negatively associated with mortality. As shown in Table S1 (see Supplementary material), the overall 30-day mortality rate was 29% (175 individuals) and 53.3% (88 individuals) of them died in the first 5 days of bacteraemia (early mortality). Infection with strains showing a high-virulence phenotype in the *C. elegans* model was not associated with 30-day mortality (29 (28.7%) versus 127 (28.5%) p 1) and nor with 5-day mortality (18 (17.8%) versus 70 (15.7%), p 0.653). Moreover, Fig. 4 shows the correlation between mortality (dependent variable) in bloodstream infections and CEVS (Fig. 4a), as well as a 30-day cumulative survival for *P. aeruginosa* bacteraemia according to virulence phenotype (Fig. 4b), showing no association.

#### XDR high-risk clones, virulence and outcome of bloodstream infections

Finally, we analysed the impact of XDR high-risk clones on *C. elegans* virulence and the outcome of bloodstream infections. As revealed in previous work [16], 81 of the 593 isolates were classified as XDR and belonged to sequence types ST175 (n = 61), ST111 (n = 9), ST235 (n = 2) and ST244 (n = 2). As documented previously [18], ST175 more frequently showed a low-virulence phenotype than the other XDR clones (31 (70.5%) versus 0 (0%), p < 0.0001). However, 30-day mortality tended to be higher in individuals infected with ST175 than in those infected with other high-risk clones (27 (44.3%) versus 3 (15%), p 0.031).

#### Discussion

Understanding the underlying host and pathogen factors responsible for the severity and mortality of *P. aeruginosa* infections is of paramount relevance [17]. In this work, we determined the impact of bacterial virulence phenotype in the characteristics and outcome of *P. aeruginosa* bloodstream infections. For this purpose, we used a previously described virulence score in the *C. elegans* infection model [18] to analyse a large multicentre prospective cohort of *P. aeruginosa* bacteraemia [19], to assess the predictive value of *C. elegans* lethality as a prognostic marker in *P. aeruginosa* bloodstream infections. In agreement with previous data [18], we confirmed a positive correlation of *exoU*<sup>+</sup> TTSS genotype with high-virulence phenotype; as well as an inverse correlation between high-virulence and MDR/XDR phenotypes. Hence, our results support the dogma that antibiotic resistance is frequently associated with a reduction of fitness and

**Table 1**  
Characteristics of patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia according to virulence in *Caenorhabditis elegans* model

	Low virulence (CEVS 1–2) (n = 101)	High virulence (CEVS 4–5) (n = 446)	p value
Male sex	76 (75.2)	291 (65.2)	0.078
Age (mean ± SD)	64 ± 16	65 ± 17	0.624
Mortality, 30 days	29 (28.7)	127 (28.50)	1
Early mortality, 5 days	18 (17.8)	70 (15.7)	0.653
<i>exoU</i>	10 (9.9)	112 (25.1)	<0.001*
<i>exoS</i>	88 (87.0)	318 (71.3)	0.004*
Acquisition			
Nosocomial/healthcare-related	100 (99.0)	421 (94.4)	0.065
Community	1 (1.0)	25 (5.6)	
<i>P. aeruginosa</i> phenotype			
Susceptible (non-MDR)	43 (43)	326 (73.4)	
Multidrug-resistant	56 (56)	118 (26.5)	<0.001*
Extensively drug-resistant	27 (27)	24 (5.4)	
ICU stay	31 (30.7)	116 (26)	0.384
SAPS score, mean ± SD	44 ± 19	43 ± 17	0.269
Charlson index, median (IQR)	2 (1–4)	3 (1–4.25)	0.603
Underlying conditions			
Diabetes	31 (30.1)	112 (25.1)	0.260
Chronic lung disease	10 (9.9)	68 (15.2)	0.207
Heart disease	15 (14.9)	82 (18.4)	0.472
Solid malignancy	32 (31.7)	128 (28.7)	0.547
Haematological malignancy	16 (15.8)	65 (14.6)	0.787
Chronic renal failure	24 (23.8)	59 (13.2)	0.013*
Chronic neurological disease	3 (3.0)	35 (7.8)	0.086
Cirrhosis	4 (4.0)	21 (4.7)	1
Immunosuppression	33 (32.7)	102 (22.9)	0.042*
Neutropenia	7 (6.9)	23 (5.2)	0.470
Origin of bacteraemia—high risk	57 (56.4)	235 (52.7)	0.510
Unknown	28 (27.7)	121 (27.1)	0.902
Respiratory tract	17 (16.8)	45 (10.1)	0.058
Abdominal	3 (3.0)	21 (4.7)	0.595
Soft tissue	1 (1.0)	16 (3.6)	0.335
Other(s)	2 (2.0)	9 (2.0)	1
Origin of bacteraemia—low risk	44 (43.6)	211 (47.3)	0.510
Vascular catheter	17 (16.8)	92 (20.6)	0.490
Urinary tract	27 (26.7)	119 (26.7)	1
Pancreaticobiliary	6 (5.9)	23 (5.2)	0.805
Clinical presentation			
Pitt Score, median (IQR)	2 (1–4)	1 (0–3)	0.036*
Shock initial	24 (23.8)	84 (18.8)	0.261
MODS initial	17 (16.8)	41 (9.2)	0.024*
Shock/MODS at 48 h	29 (28.7)	87 (20.0)	0.047*

Abbreviations: ICU, intensive care unit; IQR, interquartile range; non-MDR, not multidrug-resistant; MODS, multiorgan dysfunction syndrome; SAPS, Simplified Acute Physiology Score.

Data are presented as n (%) unless otherwise specified.

\* Statistically significant (p < 0.05).

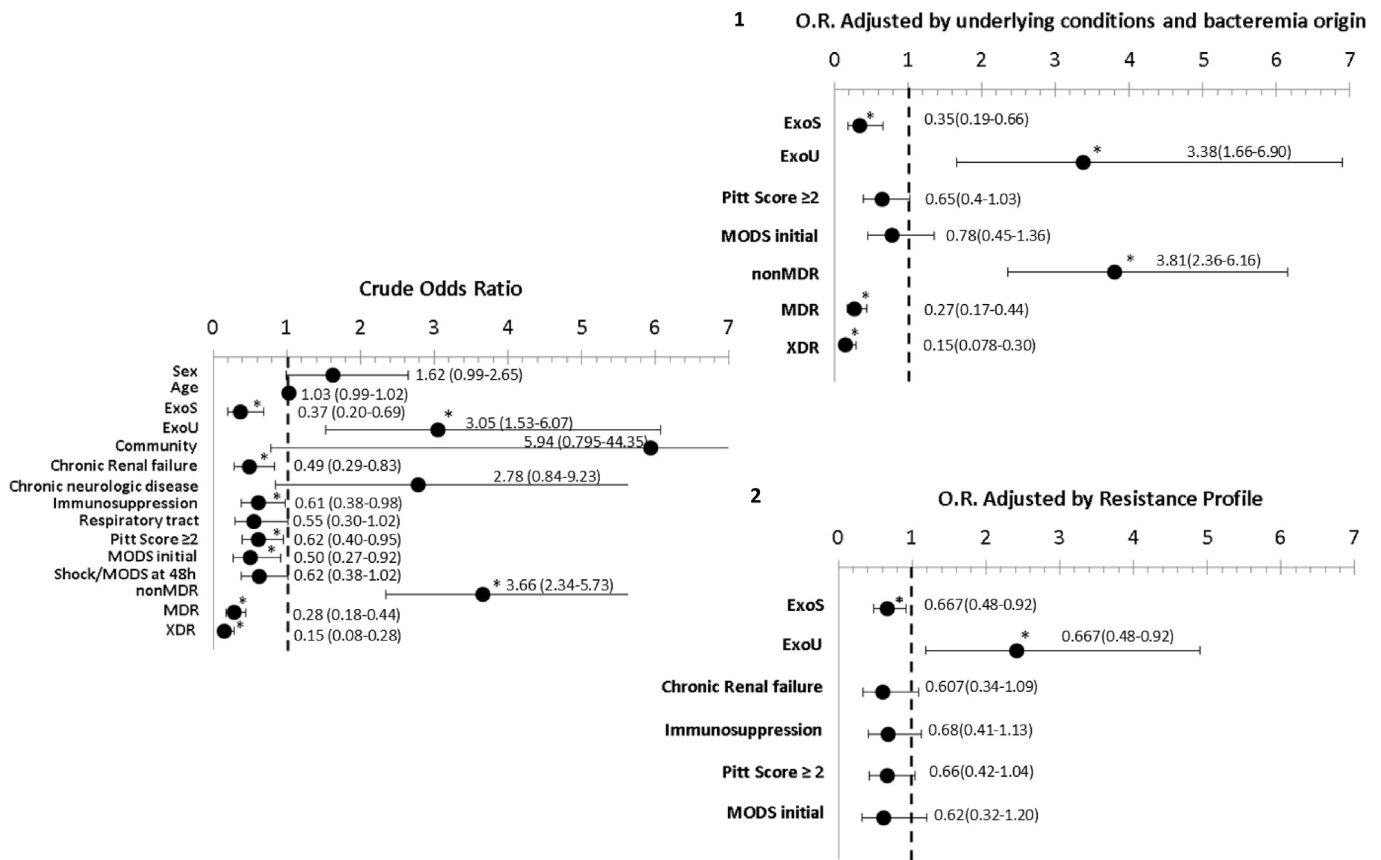
virulence, and that *ExoU* is a key driver of *P. aeruginosa* pathogenicity [16,23].

Strains showing a high-virulence phenotype tended to be associated with community-acquired infections, whereas low-virulence phenotypes tended to be associated with a higher illness severity, with some underlying conditions and with the respiratory source of infections. However, the analysis of this large multicentre cohort revealed that bacterial virulence itself was not a major player driving mortality in *P. aeruginosa* bloodstream infections. Several factors could explain this lack of impact. First, the inverse correlation between virulence and MDR phenotypes, because MDR phenotypes are associated with higher 30-day mortality, probably due to delayed appropriate therapy [5,16,19]. However, an impact of virulence on 30-day mortality was not shown, even when adjusting for the susceptibility profile, ruling out this possibility. Moreover, an association between virulence and early (5-day) mortality was not documented, even considering that the strains showing a high-virulence phenotype were enriched in the *exoU*<sup>+</sup> TTSS genotype, which is associated with early mortality [16]. The finding that the strains showing a low-virulence phenotype were associated with a higher illness severity (higher Pitt

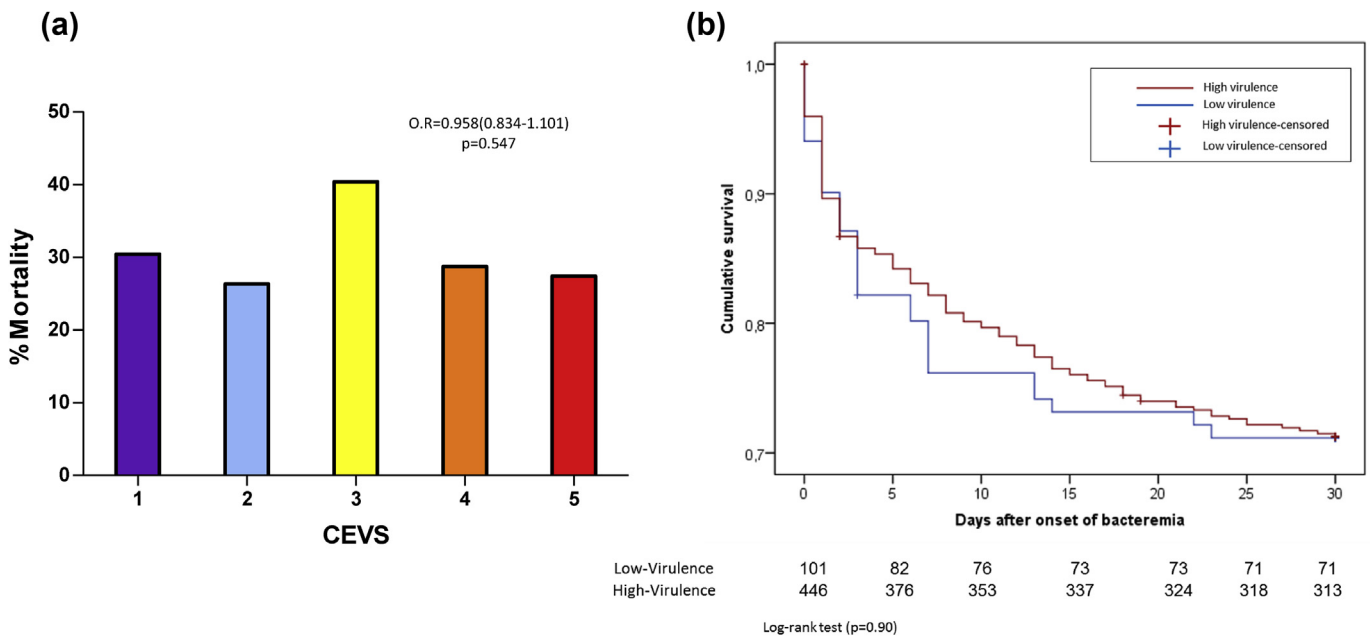
Score and more frequent MODS) and some underlying conditions such as immunosuppression is also noteworthy, because it suggest that strains with high-virulence phenotype infect healthier individuals. Also supporting this hypothesis, the most prevalent XDR high-risk clone (ST175) was associated with low-virulence phenotypes but with higher mortality from bloodstream infections.

Regarding limitations, the fact that only a low proportion of the bloodstream isolates (20%) showed a low-virulence phenotype also probably reduced the possibility of demonstrating a major impact of virulence in the outcome. Another possible factor to consider is the infection model itself, even if the *C. elegans* model has been proved to be useful to identify *P. aeruginosa* virulence factors [10]. Indeed, invertebrate infection models represent a simple, cheap and ethical alternative to mammal models, but are necessarily imperfect [24].

In summary, our results indicate that the *P. aeruginosa* virulence phenotype in a *C. elegans* model, correlates with virulence genotype (TTSS) and resistance profile, but is a poor prognostic marker of mortality in bloodstream infections. A future comparative analysis of virulence with strains from other infection sources could be useful to determine if bloodstream infections are already enriched



**Fig. 3.** Representation of crude and adjusted OR values for variables associated with virulence in *Caenorhabditis elegans* model. Dependent variable was categorized as high virulence (*Caenorhabditis elegans* virulence score (CEVS) 4–5) and low virulence (CEVS 1–2). (1) OR adjusted by underlying conditions and bacteraemia origin; (2) OR adjusted by resistance profile. \*Statistically significant ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4.** (a) Correlation between mortality in bloodstream infections and *Caenorhabditis elegans* virulence score (CEVS). Odds ratios (95% CI) of mortality (dependent variable) and statistical significance are indicated. (b) Cumulative survival for 30 days for *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia according to virulence. Survival curves were constructed by means of the Kaplan–Meier method and log-rank test to estimate the risk of death according to virulence phenotype. The outcome evaluated was death, and the date of the initial isolate was considered as time 0. Patients were monitored until day 30 after bacteraemia; cases were censored from analysis either because of death or transfer to another hospital (those lost to follow up were censored on the last follow-up day on which they were known to be alive).



of particularly virulent strains. Likewise another comparative analysis with different invertebrate models, such as *Galleria mellonella* or *Drosophila melanogaster* [25,26], would provide further clues on the potential usefulness of invertebrate infection models as prognostic markers in *P. aeruginosa* infections.

### Transparency declaration

The authors have no conflicts of interest to declare.

### Funding

This work was supported by Planes Nacionales de I+D+I 2008–2011/2013–2016 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD16/0016) and grants PI12/00734, PI15/00088 and PI18/00076, co-financed by the European Development Regional Fund 'A way to achieve Europe' and operative programme Intelligent Growth 2014–2020. Sánchez-Diener I is the recipient of a P-FIS fellowship from Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad.

### Acknowledgements

We are grateful to all the clinical microbiologists and clinicians participating in the REIPI multicentre study of *P. aeruginosa* bloodstream infections (PI08/0276), including Mercedes Gurgui (Hospital Universitari de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona), Roger Sorde and Nieves Larrosa (Hospital Universitario Vall d'Hebrón), Cecilia Martín (Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla), Dionisia Fontanals (Consorti Hospitalari Parc Taulí, Sabadell, Barcelona), Marina de Cueto and Maria Dolores Navarro (Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla), and Julian Torre-Cisneros, Manuel Casal, Rosario Lara, Clara Natera and Antonio Rivero (Hospital Universitario Reina Sofía-IMIBIC, Córdoba). We are also thankful to Dr Pilar Sanchis from IdisBa for statistical support.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.06.034>.

### References

- [1] Lopez-Causape C, Rojo-Molinero E, Macia MD, Oliver A. The problems of antibiotic resistance in cystic fibrosis and solutions. *Exp Rev Respir Med* 2015;9:73–88.
- [2] Vincent JL. Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet* 2003;361:2068–77.
- [3] Leibovici L, Shraga I, Drucker M, Konigsberger H, Samra Z, Pitliks SD. The benefit of appropriate empirical antibiotic treatment in patients with bloodstream infection. *J Intern Med* 1998;244:379–86.
- [4] Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutics options in the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:560–78.
- [5] Peña C, Suarez C, Ocampo-Sosa A, Murillas J, Almirante B, Pomar V, et al. Effect of adequate single-drug vs combination antimicrobial therapy on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: a post hoc analysis of a prospective cohort. *Clin Infect Dis* 2013;57:208–16.
- [6] Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35:736–55.
- [7] Oliver A, Mulet X, Lopez-Causape C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updates* 2015;21–22:41–59.
- [8] Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* 2013;67:159–73.
- [9] Battle SE, Meyer F, Rello J, Kung VL, Hauser AR. Hybrid pathogenicity island PAGI-5 contributes to the highly virulent phenotype of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in mammals. *J Bacteriol* 2008;190:7130–40.
- [10] Feinbaum RL, Urbach JM, Liberati NT, Djonovic S, Adonizio A, Carvunis AR, et al. Genome-wide identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence-related genes using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *Plos Pathog* 2012;8:e1002813.
- [11] Lau GW, Hasset DJ, Ran H, Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* 2004;10:599–606.
- [12] Visca P, Imperi F, Lamont IL. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol* 2007;15:22–30.
- [13] Hauser AR, et al. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection and injection. *Nat Rev Microbiol* 2009;7:654–65. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2199>.
- [14] Lu Q, Eggimann P, Luyt C-E, Wolff M, François B, et al. *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes. genes using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *Crit Care* 2014. <https://doi.org/10.1186/cc13697>.
- [15] El-Solh AA, Hattemer A, Hauser AR, Alhajhusain A, Vora H. Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Crit Care Med* 2012;40:599–606. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3182377906>.
- [16] Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, et al. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Infect Dis* 2015;60:539–48. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu866>.
- [17] Juan C, Peña C, Oliver A. Host and pathogen biomarkers for severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* 2017;215:S44–51.
- [18] Sánchez-Diener I, Zamorano L, López-Causapé C, Cabot G, Mulet X, Peña C, et al. Interplay among resistance profiles, high-risk clones, and virulence in the *Caenorhabditis elegans Pseudomonas aeruginosa* infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61:e01586–17.
- [19] Peña C, Suárez C, Gonzalo M, Murillas J, Almirante B, Pomar V, et al. Prospective multicenter study of the impact of carbapenem resistance on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:1256–72.
- [20] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268–81.
- [21] Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, et al. Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:760–6.
- [22] Navas A, Cobas G, Talavera M, Ayala JA, López JA, Martínez JL. Experimental validation of Haldane's hypothesis on the role of infection as an evolutionary force for metazoans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:13728–31.
- [23] Recio R, Villa J, Viedma E, Orellana MÁ, Lora-Tamayo J, Chaves F. Bacteraemia due to extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 high-risk clone: facing the perfect storm. *Int J Antimicrob Agents* 2018;52:172–9.
- [24] López Hernández Y, Yero D, Pinos-Rodríguez JM, Gibert I. Animals devoid of pulmonary system as infection models in the study of lung bacterial pathogens. *Front Microbiol* 2015;6:38.
- [25] Jander G, Rahme LG, Ausubel FM. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol* 2000;182:3843–5.
- [26] Lee YJ, Jang HJ, Chung IY, Cho YH. *Drosophila melanogaster* as a polymicrobial infection model for *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol* 2018;56:534–41.