



TESIS DOCTORAL

*Mecanismos de regulación de AmpC en
Pseudomonas aeruginosa: Evaluación de
nuevas dianas para evitar la resistencia a
 β -lactámicos.*

LAURA ZAMORANO PAEZ
2012

A mi hija Lucía

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría mencionar a tantas personas que me han apoyado desde un primer momento que quizás me resulta, de hecho me va a resultar, muy complicado acordarme de todas ellas.

En primer lugar, a mis padres, que en su momento me dieron la posibilidad de iniciar una carrera y me apoyaron, pese a todo, a acabar mis estudios en Barcelona. Junto a ellos no han de faltar mis hermanos, quienes han sufrido en sus carnes también mis momentos de tensión y agobio. Mi especial agradecimiento en esos momentos son para Hugo, que me ha tenido que soportar mis cambios de humor, mis nervios y demás cambios que he sufrido durante este largo camino, y que creo le tocará seguir aguantando.

Al Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Son Espases Dr. José Luis Pérez, quién me brindó la posibilidad de ponerme en contacto con el Dr. Antonio Oliver, director de esta Tesis Doctoral. No tengo palabras para agradecerle la confianza que ha depositado en mí, los conocimientos que me ha aportado, la paciencia que ha tenido conmigo (que no ha sido poca!!), la comprensión y el apoyo (también fuera del terreno laboral) obtenidos; y sobretodo por darme la oportunidad de realizar el *practicum* en su equipo y posteriormente, pertenecer a su grupo de Investigación que me ha abierto el camino para iniciar y finalizar esta Tesis.

A mis compañeros de laboratorio, Carlos, Tomeu, Biel y ahora Xavi, por vuestro apoyo y sobretodo por los buenisimos ratos que me haceis pasar los cuatro, que por muy malo que tenga el día siempre me haceis reir!!! Gracias a Carlos y Tomeu por su inestimable ayuda desde el primer día de trabajo hasta hoy y en cualquier momento; y a Biel por la “paliza” que le he dado estos últimos meses, con las PCRs y sus comprobaciones. Que sepais que no os cambio por nada, ¡sois geniales!

AGRADECIMIENTOS

A las Dras Nuria Borrell, Aina Mena y M^a Dolores Maciá, que me enseñaron a trabajar con modelos murinos. En especial a Aina, con la que además aprendí otras muchas cosas y, también, por la paciencia y confianza que puso en mí durante los meses que estuve de prácticas con ella.

Quiero hacer extensivo este agradecimiento a los antiguos y nuevos residentes del Servicio, por los buenos momentos que hemos pasado todos juntos en fiestas sorpresas y cenas varias.

INDICE

ABREVIATURAS

1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 ANTIBIÓTICOS B-LACTÁMICOS.....	3
1.1.1 Aspectos generales y mecanismos de acción.....	4
1.1.2 Clasificación de antibióticos β -lactámicos.....	5
1.1.3 Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos.....	10
1.1.3.1 Reducción de la permeabilidad bacteriana.....	11
1.1.3.2 Mecanismos de expulsión	12
1.1.3.3 Producción de β -lactamasas	14
1.1.3.4 Modificación de la diana del antibiótico.....	25
1.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	27
1.2.1 Importancia clínica.....	31
1.2.2 Factores de virulencia	31
1.2.3 Epidemiología de la resistencia a antibióticos.....	39
1.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA EN PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	43
1.3.1 Resistencia Intrínseca.....	44
1.3.2 Resistencia adquirida	45
1.3.2.1 Mutaciones en genes cromosómicos	46
1.3.2.2 Adquisición de determinantes de resistencia por transferencia horizontal.....	49
1.3.3 Mecanismos cromosómicos de resistencia a β -lactámicos en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53
1.3.3.1 OprD.....	53
1.3.3.2 Bombas de expulsión	54
1.3.3.3 Hiperproducción de AmpC.....	57

1.4	RECICLAJE DE LA PARED CELULAR Y REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE AMPC.....	58
1.4.1	Aspectos generales de la biosíntesis de la pared celular.....	58
1.4.2	Reciclaje de la pared celular.....	62
1.4.3	Inducción de AmpC.....	65
1.4.3.1	AmpG.....	67
1.4.3.2	NagZ.....	69
1.4.3.3	AmpD.....	71
1.4.3.4	AmpR.....	72
1.4.3.5	DacB.....	74
1.4.4	Sistema de regulación creBC/BlrAB.....	76
1.4.4.1	Sistema creBC en <i>Escherichia coli</i>	77
1.4.4.2	Sistema BlrAB y expresión de β -lactamasas en <i>Aeromonas</i>	79
1.4.4.3	Sistema creBC/BlrAB en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	81
 <u>2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS</u>		85
 <u>3 MATERIAL Y MÉTODOS</u>		91
3.1	CEPAS, PLÁSMIDOS Y CEBADORES.....	91
3.2	CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES NULOS.....	97
3.2.1	Procedimiento general utilizado para la inactivación de genes en esta memoria.....	97
3.2.2	Inactivación de genes <i>ampD</i> y <i>dacB</i> en cepas genéticamente diversas.....	101
3.2.3	Inactivación de <i>NagZ</i> en cepas de laboratorio y cepas clínicas panresistentes.....	101
3.2.4	Inactivación de la permeasa <i>AmpG</i> en cepas de laboratorio y cepas clínicas panresistentes.....	103

3.3	<i>CAPÍTULO 1: RESPUESTA DE RESISTENCIA A BETALACTÁMICOS PRODUCIDA POR MUTACIONES EN <i>dacB</i> O <i>ampD</i> EN CEPAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA GENETICAMENTE DIVERSAS.....</i>	105
3.3.1	<i>Cepas bacterianas.....</i>	105
3.3.2	<i>Estudios de sensibilidad.....</i>	107
3.3.3	<i>Cuantificación de la expresión de <i>ampC</i> y <i>creD</i>.....</i>	107
3.3.4	<i>Secuenciación de <i>ampC</i>.....</i>	108
3.3.5	<i>Estudio de otros mecanismos de resistencia.....</i>	108
3.4	<i>CAPÍTULO 2: INACTIVACIÓN DE <i>ampG</i> Y <i>nagZ</i> COMO DIANAS FRENTE A LA RESISTENCIA A B-LACTÁMICOS EN PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....</i>	110
3.4.1	<i>Mutantes de laboratorio y cepas clínicas usadas en el estudio.....</i>	110
3.4.2	<i>Estudios de sensibilidad</i>	110
3.4.3	<i>Determinación de los mecanismos de resistencia presentes en las cepas clínicas estudiadas.....</i>	111
3.4.4	<i>Cuantificación de expresión de <i>ampC</i> basal e inducida.....</i>	112
3.4.5	<i>Determinación inducibilidad de <i>AmpC</i> mediante ensayo de doble disco.....</i>	112
3.4.6	<i>Análisis poblacional de sensibilidad y desarrollo de resistencia.....</i>	113
3.4.7	<i>Estudio de sensibilidad a diferentes β-lactámicos en presencia de un inhibidor molecular de <i>nagZ</i>: PUGNAc.....</i>	114
3.5	<i>CAPÍTULO 3: SISTEMA CREBC: INTERCONEXIÓN CON LA VIA DE REGULACIÓN DE AMPC Y EFECTO SOBRE EL FITNES.....</i>	115
3.5.1	<i>Regulación de <i>creD</i>.....</i>	115
3.5.1.1	<i>Cuantificación de la expresión de <i>creD</i> en presencia de diferentes antibióticos.....</i>	115
3.5.1.2	<i>Cuantificación de la expresión de <i>creD</i> de los mutantes en los diferentes componentes de la vía de regulación de <i>AmpC</i>.....</i>	115
3.5.2	<i>Efecto de la inactivación de <i>creBC</i> y <i>creD</i>, sobre la eficacia biológica in vitro e in vivo.....</i>	116

3.5.2.1 Tiempo de duplicación de los mutantes *creBC* y *creD*.....116

3.5.2.2 Experimentos de competición *in vitro* en presencia de diferentes concentraciones de antibiótico.....117

3.5.2.3 Modelos murinos de infección aguda.....120

4 RESULTADOS **123**

4.1 **CAPÍTULO 1: RESPUESTA DE RESISTENCIA A B-LACTÁMICOS PRODUCIDA POR MUTACIONES EN *dacB* O *ampD* EN CEPAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA GENETICAMENTE DIVERSAS**.....123

4.1.1 Efecto de la inactivación de *ampD* y *dacB* en la CMI de los β -lactámicos y expresión de *ampC* en cepas genéticamente diversas.....123

4.1.2 Efecto de la inactivación de *ampD* y *dacB* en la expresión de *creD* (activación sistema *CreBC*), en cepas genéticamente diversas.....128

4.1.3 Papel de los mecanismos de resistencia adicionales y los polimorfismos de *AmpC* en la resistencia a β -lactámicos de las cepas originales y sus mutantes *ampD* y *dacB*.....129

4.2 **CAPÍTULO 2: INACTIVACIÓN DE *ampG* Y *nagZ* COMO DIANAS FRENTE A LA RESISTENCIA A β -LACTÁMICOS EN PSEUDOMONAS AERUGINOSA**.....130

4.2.1 Efecto de la inactivación de *NagZ* y *AmpG* en la resistencia a antibióticos β -lactámicos y en la expresión de *ampC* en mutantes isogénicos hiperproductores de *AmpC*.....130

4.2.2 Efecto de la inactivación de *nagZ* y *ampG* en la resistencia a carbapenémicos de los derivados de PAO1 deficientes en *OprD*.....136

4.2.3 Análisis poblacional de la sensibilidad y desarrollo de resistencia a diferentes concentraciones de antibióticos betalactámicos, en mutantes *nagZ* y *ampG*.....137

4.2.4	<i>Evaluación de ampG y nagZ como dianas para restablecer la sensibilidad en cepas clínicas panresistentes a β-lactámicos.....</i>	<i>141</i>
4.2.5	<i>Efecto del inhibidor molecular de nagZ, PUGNAc, en la actividad de los mutantes isogénicos hiperproductores de AmpC.....</i>	<i>144</i>
4.3	CAPÍTULO 3: SISTEMA creBC: INTERCONEXIÓN CON LA VIA DE REGULACIÓN DE ampC Y EFECTO SOBRE EL FITNES.....	146
4.3.1	<i>Regulación de creD.....</i>	<i>146</i>
4.3.1.1	<i>Inducibilidad del sistema CreBC en presencia de antibióticos β-lactámicos.....</i>	<i>146</i>
4.3.1.2	<i>Interconexión entre el sistema creBC y la vía de regulación de AmpC.....</i>	<i>148</i>
4.3.2	<i>Efecto de la inactivación de creBC y creD sobre la eficacia biológica in vitro e in vivo.....</i>	<i>152</i>
4.3.2.1	<i>Efecto sobre el crecimiento de las mutaciones en creBC y creD.....</i>	<i>152</i>
4.3.2.2	<i>Evaluación de la eficiencia biológica in vitro de los mutantes creBC y creD.....</i>	<i>153</i>
4.3.2.3	<i>Eficiencia biológica in vivo.....</i>	<i>155</i>
<u>5 CONCLUSIONES</u>		<u>163</u>
<u>6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>		<u>169</u>
<u>7 ANEXO I: Soluciones, reactivos y mezclas de PCR</u>		<u>199</u>
<u>8 ANEXO II: Artículos publicados</u>		<u>205</u>

ABREVIATURAS

3-AMA: 3-aminomonobactámico

6-APA: 6-aminopenicilánico

A: Adenina

AACs: acetiltransferasas

ABC: ATB-binding cassette

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Ala: alanina

ANTs: nucleotidiltransferasas

APHs: fosfotransferasas

ARNr: Acido ribonucleico ribosomal

ATM: aztreonam

ATP: Adenosín trifosfato

BHI: Brain heart Infusion

BLEEs: β -lactamasas de espectro extendido

BlrAB: beta lactamase regulation

C: Citosina

CAZ: ceftazidima

CCP: carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone

CFP: cyan fluorescence protein

CFTR: Regulador de conductancia transmembrana de la Fibrosis Quística

CIP: ciprofloxacino

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI: concentración mínima inhibitoria

DAP: ácido diaminopimérico

***dsbA*:** factor de virulencia

EDTA: Ácido etileno-diamino-tetra-acético

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

ESAC: AmpC de espectro extendido

EtBuPUG: *O*-(2-deoxy-2-*N*-2-ethylbutyryl-*D*-glucopyranosylidene)amino *N*-phenylcarbamate

FEP: cefepime

FOX: cefoxitina

FQ: Fibrosis quística

G: Guanina

GFP: green fluorescence protein

Glu: glutamina

IMP: imipenem

LB/LBA: Luria Bertuni/ agar

LPS: Lipopolisacárido

MATE: Multiple antibiotic and toxin intrusion

MBLs: Metallo- β -lactamasa

MER: meropenem

MFS: Major facilitator superfamily

MH/ MHA: Mueller Hinton/ agar

NAG: N-acetilglucosamina

nagZ: N-acetilglucosaminidasa

NAM: N-acetilmurámico

NAV: Neumonía asociada a ventilación

ORFs: Marcos abiertos de lectura

PAGI: *Pseudomonas aeruginosa genomic islands*

PAPI: *Pseudomonas aeruginosa pathogenicity islands*

PBPs: Proteínas de unión a penicilinas

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PEP: fosfoenolpiruvato

PIC: Fosfolipasa C

PQS: *Pseudomonas Quinolone Signal*

PTZ: piperacilina-tazobactam

PUGNAc: O-(2-acetamido-2-deoxy-d-glucopiranosilideno) amino-N-fenilcarbamato

Rhl: Rhamnolípido

RND: Resistance nodulation division

RT-PCR: PCR retrotranscriptasa

SMR: Small multidrug resistance

T: Timina

T3SS/T2SS/T5aSS/T5bSS/T6SS: Sistemas de secreción tipo 2/3/5/6

TCR: regulador de dos componentes

UCI: unidad de cuidados intensivos

UDP: uridín difosfato

UDP-NAM: difosfato de uridina-ácido-N-acetilmutámico

UFC: unidades formadoras de colonias

UMP: monofosfato de uridina

UPD-NAG: difosfato de uridina-ácido-N-acetilglucosamina

UTP: trifosfato de uridina

UV: ultravioleta

YFP: yellow fluorescence protein

1 INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 *Antibióticos β -lactámicos.*

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias que ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo. Pueden dividirse en a) bactericidas: su acción es letal, ya que conduce a la lisis de la bacteria; y b) bacteriostáticos: impiden el desarrollo y la multiplicación de la bacteria sin llegar a su destrucción. La clasificación de los antibióticos se realiza en función de su espectro de acción, mecanismo de actuación y sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas. En este trabajo nos vamos a centrar principalmente en los antibióticos β -lactámicos.

Los β -lactámicos son los antibióticos más prescritos tanto en atención primaria como en hospitales. A pesar de que no se dispone de ningún β -lactámico realmente nuevo desde hace más de dos décadas, el incesante aumento de las resistencias y los avances en el conocimiento de sus mecanismos moleculares, han condicionado que exista una gran cantidad de información en la literatura sobre cada uno de los componentes de esta familia de antibióticos.

La presencia de un anillo β -lactámico o azetidín-2-ona, define químicamente a esta familia, de la que se han originado diversos grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos e inhibidores de las β -lactamasas. Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana y constituyen la familia más numerosa y más utilizada de antibióticos. Este anillo, carece de actividad antibiótica por sí solo, con lo que necesita estar activado por otros radicales para ejercer su acción antimicrobiana (*Neuhaus FC, Georgopapadakou N. 1992*), estos radicales son los que determinan las características farmacocinéticas y el espectro de acción del antibiótico (*García-Sánchez JE et al 1999*).

1.1.1 Aspectos generales y mecanismos de acción

Los antibióticos β -lactámicos son agentes bactericidas que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana. La destrucción de la pared celular bacteriana se produce como consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglicano. El peptidoglicano está constituido por largas cadenas de glúcidos (-glucano), formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acilmurámico y N-acetilglucosamina.

El ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos (péptido-) que se unen entre sí para formar una malla directamente, como en el caso de gram-negativos (Figura 1.1) o mediante un pentapéptido de glicina (gram-positivos).

Los componentes del peptidoglicano se sintetizan en el citoplasma y son transportados a través de la membrana citoplasmática al espacio (periplásmico) que existe entre ésta y la pared celular. A este nivel existen unas proteínas con actividad enzimática (transpeptidasas y carboxipeptidasas), también llamadas proteínas de unión a las penicilinas (PBPs), encargadas de formar los tetrapéptidos y fijar a las penicilinas.

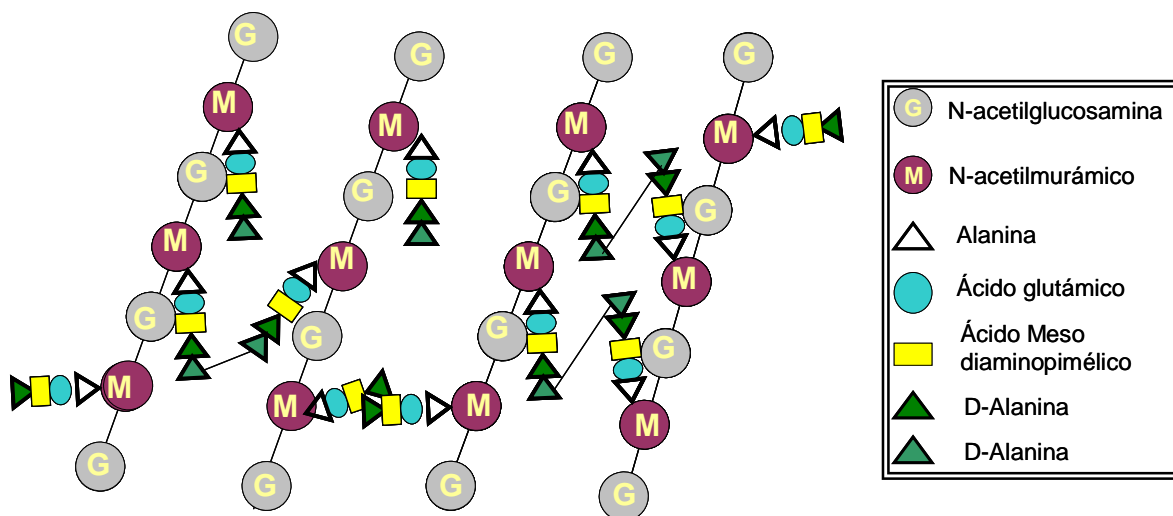


Figura 1.1 Esquema composición y estructura del peptidoglicano en bacterias Gram negativas.

Los β -lactámicos inhiben la unión o transpeptidación, ya que los anillos poseen una estructura similar a los dos últimos aminoácidos del tetrapéptido (D-alanina-D-alanina), permitiendo la unión covalente en el lugar activo de la transpeptidasa. De este modo, la pared queda debilitada y puede romperse por la presión osmótica intracelular.

1.1.2 Clasificación de antibióticos β -lactámicos

La presencia o no de anillos adyacentes al anillo β -lactámico y la naturaleza de los mismos, determina las distintas clases de antibióticos β -lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenémicos e inhibidores de β -lactamasas (Marín M et al 2003; García-Sánchez JE et al 1999).

Penicilinas: Son un grupo de antibióticos de origen natural y semisintético que contienen el núcleo de ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), consistente en un anillo β -lactámico unido a un anillo tiazolidínico. Esta estructura deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico.

Las penicilinas difieren unas de otras por sustituciones en la posición 6 del anillo, donde cambios en la cadena lateral pueden inducir modificaciones en la actividad antibacteriana y en las propiedades farmacocinéticas.

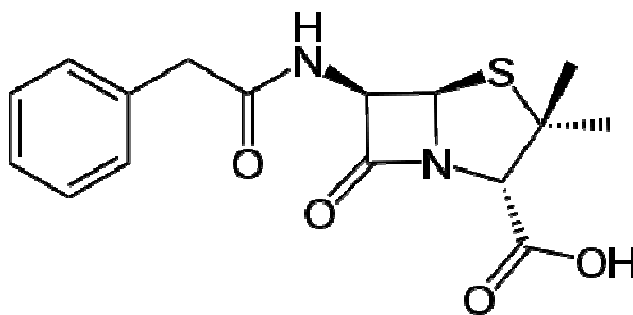


Figura 1.2. Estructura química de la penicilina G (bencilpenicilina).

De acuerdo a su origen y espectro de acción, las penicilinas pueden clasificarse en: penicilinas naturales (G y V), penicilinas resistentes a las penicilinasas estafilocócicas (oxacilina, meticilina, dicloxacilina), aminopenicilinas (ampicilina, amoxicilina), carboxipenicilinas (carbenicilina, ticarcilina) y ureidopenicilinas (piperacilina).

La producción de derivados semisintéticos del ácido 6-aminopenicilánico permitió disponer de preparados activos por vía oral, con mayor resistencia a las β -lactamasas y mayor capacidad de penetración en las bacterias gramnegativas, un ejemplo de ello son las aminopenicilinas y las penicilinas antiestafilocócicas. Las penicilinas antipseudomónicas (carboxi y ureidopenicilinas) son estables frente a las β -lactamasas cromosómicas propias de *Pseudomonas* pero no ante la presencia de β -lactamasas plasmídicas.

Cefalosporinas: Son antibióticos semisintéticos, derivados del ácido 7-cefalosporánico, que consiste en la fusión de un anillo dihidrothiacínico (en lugar del anillo tiazolidínico característico de las penicilinas) y un anillo β -lactámico. Son derivados de la cefalosporina C, fármaco natural derivado de productos de la fermentación del hongo *Cephalosporium acremonium*. La introducción de modificaciones en las cadenas laterales, al igual que ocurre en las penicilinas, origina las diversas cefalosporinas. Se definen cuatro generaciones de cefalosporinas.

Cabe destacar en la primera generación la cefalotina, una de las primeras cefalosporinas; en la segunda, la cefuroxima, con actividad antimicrobiana frente a *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Borrelia burgdorferi*; cefotaxima y ceftazidima como cefalosporinas de tercera generación, siendo esta última (ceftazidima) la cefalosporina con gran actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*, usada en infecciones nosocomiales. Finalmente cefepime y cefpiroma, que pertenecen a las cefalosporinas de cuarta generación y tienen una buena penetración en gram-negativos.

Cabe destacar el desarrollo de una nueva cefalosporina llamada Ceftolozane (anteriormente conocida con el nombre de CXA-101), más activa que ceftazidima frente a *Pseudomonas aeruginosa* y con una buena actividad contra los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Helio S Sader et al 2011). Esta nueva cefalosporina se encuentra en fase 2 del desarrollo clínico, es estable frente a mecanismos de resistencia conducidos por mutaciones, incluyendo la hiperexpresión de *ampC*, bombas de expulsión, o la represión de la porina OprD (Juan C et al 2010; Moya B, et al 2010; Riera E et al 2010; Zamorano et al 2010); pero no frente a β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs). Para mejorar su espectro, también está en desarrollo la combinación con tazobactam (Ceftolozane+tazobactam).

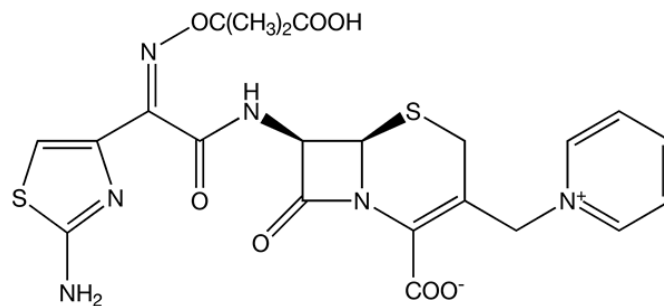


Figura 1.3 Estructura química de la cefalosporina de tercera generación, ceftazidima.

Las cefalosporinas de primera generación son muy activas frente a los cocos gram-positivos; en líneas generales, las sucesivas generaciones han perdido parte de esa actividad, en beneficio de una mayor actividad frente a bacilos gram-negativos, con algunas excepciones. Todas las cefalosporinas son inactivas frente a enterococos, estafilococos resistentes a meticilina y *Listeria monocytogenes*.

Monobactámicos: Son derivados del ácido 3-aminomonobactámico (3-AMA). Tienen una estructura β -lactámica sencilla con una estructura monocíclica en la que el anillo β -lactámico no está fusionado a otro secundario. Aztreonam, es el único monobactámico disponible para uso clínico, posee una excelente actividad sobre bacterias gram-negativas aerobias y facultativas. Por el contrario, carece de actividad frente a gram-positivos y bacterias anaerobias.

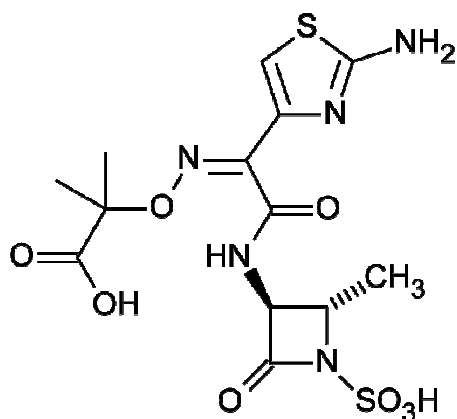


Figura 1.4 Estructura química de aztreonam.

Carbapenémicos: Son una clase única de β -lactámicos que presentan el mayor espectro de actividad conocido dentro de este grupo de antibióticos. Es un derivado semisintético producido por *Streptomyces cattleya*. La estructura básica de los carbapenémicos consiste en un anillo β -lactámico fusionado a uno pirrolidínico compartiendo un nitrógeno. Estas modificaciones y las cadenas laterales, así como su posición espacial, condiciona: una mayor afinidad por las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) y un incremento de la potencia, del espectro antibacteriano y de la resistencia a las β -lactamasas.

Uno de los primeros carbapenémicos desarrollados para uso clínico fue Imipenem, que posee un gran espectro antibacteriano, especialmente potente contra *Pseudomonas aeruginosa*; aunque actualmente, meropenem y doripenem son más potentes frente a esta bacteria.

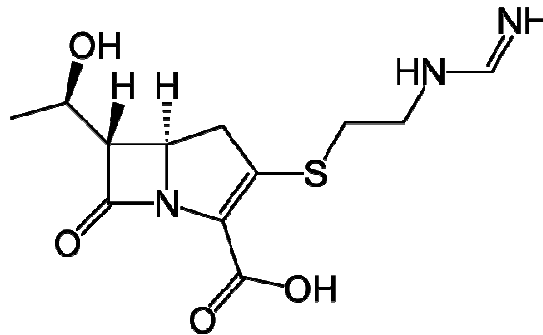


Figura 1.5 Estructura química de Imipenem

β-lactámicos asociados a inhibidores de las β-lactamasas: son moléculas que contienen en su estructura un anillo β-lactámico y presentan una gran afinidad por las β-lactamasas. Estas β-lactamasas, son enzimas producidas por las bacterias que destruyen la actividad de determinados β-lactámicos. Hay tres inhibidores en uso clínico: ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, y su importancia radica en su uso combinado, ya que amplía el espectro de algunos antibióticos β-lactámicos.

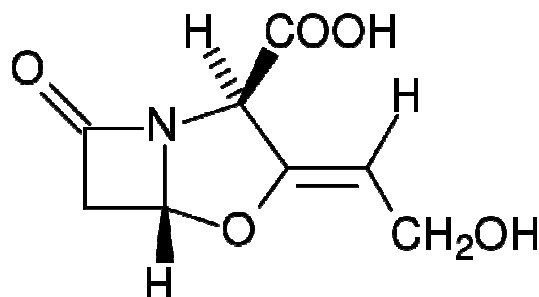


Figura 1.6 Estructura química del ácido clavulánico.

Sin embargo, estos antibióticos no inhiben las betalactamasas cromosómicas producidas por diferentes especies como la cefalosporinasa cromosómica AmpC de *Pseudomonas aeruginosa*. Un ejemplo de inhibidor molecular de la expresión de esta β -lactamasa es PUGNAc (O-(2-acetamido-2-deoxy-d-glucopiranosilideno) amino-N-fenilcarbamato); esta molécula en *Pseudomonas aeruginosa*, como veremos más adelante, se une a *nagZ* bloqueando la formación de la molécula inductora de *ampC*, y evitando la resistencia mediada por AmpC. Este inhibidor por sí solo no posee actividad antimicrobiana, pero al coadministrarse con ceftazidima, piperacilina o tazobactam potencia la eficacia de estos (Mark B et al 2011; Stubbs, K. A et al 2007)

1.1.3 Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos

El uso y abuso de los antibióticos en los últimos años junto con la capacidad que tienen las bacterias para desarrollar mecanismos de resistencia, ha ocasionado la emergencia de un buen número de bacterias resistentes a estos antibióticos.

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los β -lactámicos por varios mecanismos independientes entre sí pero que en ocasiones se asocian. El control de estos mecanismos puede ser cromosómico, plasmídico o mediante transposones. La resistencia cromosómica puede darse de manera intrínseca (inducible o constitutiva) y/o debido a mutaciones; mientras que los plásmidos y los transposones pueden ser autotransferibles entre bacterias.

Entre los mecanismos implicados destacan por su importancia: reducción de la permeabilidad bacteriana, mecanismos de expulsión de antibióticos, producción de β -lactamasas y modificación de la diana del antibiótico.

1.1.3.1 Reducción de la permeabilidad bacteriana

La membrana celular bacteriana es la primera barrera que debe superar el antibiótico para ejercer su acción. La diferencia estructural de la membrana de las bacterias gram-positivas y gram-negativas explica ya las diferencias de actividad de algunos antibióticos frente a estos microorganismos.

Por otra parte, los antibióticos pueden penetrar al interior celular por difusión pasiva, por transporte específico, por transporte activo dependiente de energía o a través de canales llamados porinas, en las bacterias gram-negativas; y cualquier alteración en estos mecanismos puede conducir a resistencia.

En los microorganismos gram-negativos la entrada de algunos antibióticos se facilita por la presencia de canales específicos denominados porinas, canales utilizados por los β -lactámicos. Una reducción de la permeabilidad bacteriana es provocada por la pérdida, modificación o reducción del número de porinas, causado por mutaciones en genes cromosómicos. En las enterobacterias, la pérdida o disminución del número de copias de la porina OmpF reduce la sensibilidad a ciertos β -lactámicos (*Martinez-Martinez L et al 1996; Jaffe A, et al 1982*), mientras que en *Pseudomonas aeruginosa*, la pérdida de la porina OprD, conduce a una resistencia a imipenem (*Köhler T et al 1999; Livermore DM. 2002*).

Las bacterias gram-positivas suelen estar rodeadas de una capa externa constituida por peptidoglicanos. Aunque esta estructura es mecánicamente resistente ofrece sólo una pequeña resistencia a la difusión de pequeñas moléculas como los antibióticos.

1.1.3.2 Mecanismos de expulsión

Las bombas de expulsión se encuentran tanto en bacterias gram-negativas como gram-positivas, y son mecanismos protéicos de transporte, implicados en la exportación de sustancias tóxicas desde el interior al exterior celular. Pueden ser específicas para un único sustrato o pueden transportar un amplio abanico de compuestos, incluyendo diferentes clases de antibióticos; además de contribuir a la resistencia, cumplen una función de detoxificación (*Webber M.A. & Piddock LJV. 2003; Levy SB. 1992; Nikaido H. 1996; Marshall NJ et al 1997; Lewis K, Hooper DC, et al 1997; Ouellette M, Kündig C. 1997*).

Las bacterias gram-negativas tienen diferentes bombas de expulsión, que pertenecen a diferentes familias: Familia ABC (del inglés "ATB-binding cassette"), Familia SMR (del inglés "small multidrug resistance"), Familia MFS (del inglés "major facilitator superfamily"), Familia MATE (del inglés "multiple antibiotic and toxin extrusion"), Familia RND (del inglés "Resistance-nodulation division") (*Webber M.A. & Piddock LJV 2003*).

Todos estos sistemas utilizan la fuerza protón como fuente de energía, con la excepción de la familia ABC que usa la hidrólisis de ATP para la exportación de los sustratos. La gran mayoría de los genomas bacterianos estudiados, contienen varias bombas de expulsión de antibióticos y la mayoría de ellas están localizadas en la membrana plasmática; se estima que 5-10% de todos los genes bacterianos están implicados en el transporte y una gran proporción de estos codifican bombas de expulsión (*Webber M.A. & Piddock LJV 2003*). En muchos casos, los genes de las bombas forman parte de un operón y está regulado para controlar la expresión; y el incremento en la expresión está asociado con la resistencia a sustancias. Los genes que codifican estos sistemas de expulsión pueden localizarse tanto en plásmidos como en el cromosoma bacteriano.

Sólo la familia de las RND (y alguna bomba de otra familia), muestran una estructura tripartita a través de la membrana interna y la membrana externa, tal y como sugirió Wandersman y colaboradores (Nikaido H. 2011). Este complejo implica, además de la proteína de la bomba localizada en la membrana interna, un canal de membrana externa y una proteína adaptadora periplásmica. El primer ejemplo de una bomba de tipo RND se identificó en *Escherichia coli* en 1993, con el nombre de AcrB. El modelo de bomba de expulsión más conocido es el *mexA-mexB-OprM*, descubierto en *Pseudomonas aeruginosa* y confiere resistencia a tetraciclinas, cloranfenicol, fluoroquinolonas y a algunos β -lactámicos; además de participar en el transporte al exterior de pioverdina, compuesto que actúa como sideróforo. En la figura 1.7 puede observarse la estructura de esta bomba (MexAB-OprM) como ejemplo de modelo tripartito, que consta de un componente de membrana citoplasmática que funciona como transportador, un componente de membrana externa que forma el canal y una proteína de fusión de membrana que une las dos proteínas (Nikaido, H. 1996; Nikaido, H. 1998; Nikaido, H. 1998). MexA-MexB-OprM y MexX-MexY-OprM contribuyen a la resistencia intrínseca y adquirida en *Pseudomonas aeruginosa*; mientras que MexC-MexD-OprJ (Poole K et al 1996) y MexE-MexF-OprN (Köhler, T., M et al 1997) contribuyen sólo a la resistencia adquirida en esta bacteria (Aires, J. R et al 1999; Masuda, N et al 2000).

El amplio abanico de sustratos para las bombas es preocupante, ya que a menudo la hiperexpresión de una bomba tiene como resultado la resistencia a diferentes tipos de antibióticos. Un problema asociado a ello es la resistencia cruzada, ya que la exposición a cualquier agente que pertenezca al perfil de sustrato de la bomba, estaría favoreciendo la resistencia cruzada a todos los antibióticos de esa bomba. Un ejemplo de ello es el caso de MexAB-OprM de *Pseudomonas aeruginosa* de la que se hablará más adelante.

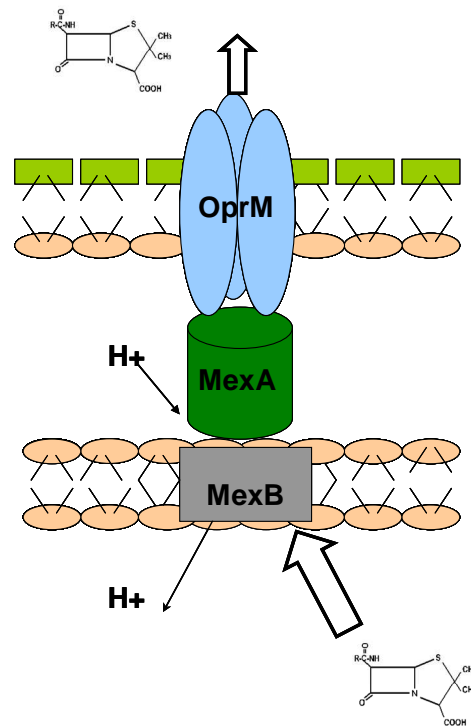


Figura 1.7 Estructura de la bomba de expulsión MexAB-OprM

La coexistencia de alteraciones en las porinas de entrada con un sistema eficaz de expulsión, incrementa notablemente los niveles de resistencia a los antibióticos, ya que se reduce la cantidad de antibiótico a expulsar.

1.1.3.3 Producción de β -lactamasas

Las β -lactamasas son enzimas producidas por las bacterias, encargadas de hidrolizar el enlace amida del anillo β -lactámico, dando lugar a compuestos sin actividad bacteriana. La primera β -lactamasa fue identificada en *Escherichia coli* por EP Abraham y E Chain en 1940, y desde entonces hasta finales de 2009 se habían descrito más de 890 enzimas diferentes, descubriéndose constantemente variantes nuevas (Bush K, Jacoby GA. 2010; Bradford PA 2001). La continua descripción de nuevas β -lactamasas ha generado problemas en su clasificación y nomenclatura, por ese motivo, se propusieron varias clasificaciones.

Por un lado, Ambler en 1980 propuso una clasificación en función de los mecanismos de interacción enzima-sustrato y la secuencia de aminoácidos de las β -lactamasas.

En esta clasificación se distinguen cuatro clases de enzimas, designados A-D. Las clases A, C y D son serín- β -lactamasas y la clase B son metalo- β -lactamasas. Otra clasificación fue la propuesta por Bush y colaboradores en 1989, que sugirieron una clasificación basada en la actividad enzimática o su afinidad por diferentes sustratos y su sensibilidad por la acción de los inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico. Esta clasificación fue revisada en 1995 por Bush, Jacoby y Medeiros, y actualizada en 2010 por Bush y Jacoby (*Bush K, Jacoby GA. 2010*). A pesar de ello, la clasificación de Bush y Jacoby, y la de Ambler están correlacionadas (Tabla 1.1).

La localización del gen que codifica la β -lactamasas es variable, pudiendo localizarse en el cromosoma o estar codificada por plásmidos, y su producción puede ser inducible o constitutiva.

De entre todas las β -lactamasas descritas hasta el momento, caben destacar por su interés e implicaciones clínicas las siguientes: 1) β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) (Enzimas tipo TEM, SHV, CTX-M y OXA, pertenecientes a los grupos 2be, 2ber y 2de); 2) β -lactamasas resistentes a los inhibidores (Enzimas tipo TEM y SHV, pertenecientes al grupo 2br); 3) β -lactamasas tipo AmpC (cefalosporinasa cromosómica *ampC* y enzimas tipo LAT, MIR, CMY y FOX, pertenecientes al grupo 1); 4) Carbapenemasas (Enzimas tipo VIM IMP, IMI, KPC, NDM y OXA, pertenecientes a grupos 2f, 2df y 3).

Tabla 1.1. Clasificación de β -lactamasas establecida por Bush y colab. (Karen Bush, George A. Jacoby. 2010)

Grupo (2010)	Grupo (1995)	Clase molecular	Sustrato	Inhibible por		Enzima
				Ac. Clav ^a o Tazobactam	EDTA	
1	1	C	Cefalosporinas	No	No	ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI ^b	C	Cefalosporinas	No	No	GC1, CMY-37
2 ^a	2a	A	Penicilinas	Si	No	PC1
2b	2b	A	Penicilinas y Cefalosporinas 1 ^a Generación	Si	No	TEM-1, TEM-2, SHV-1, TEM-13
2be	2be	A	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactámicos	Si	No	TEM-3, SHV-2, CTXM-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	No	No	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Cefalosporinas de espectro extendido, monobactámicos	No	No	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicilinas	Si	No	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicilinas, cefepime	Si	No	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilinas	Variable	No	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Cefalosporinas de espectro extendido	Variable	No	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenémicos	Variable	No	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido	Si	No	CepA
2f	2f	A	Carbapenémicos	Variable	No	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Carbapenémicos	No	Si	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, NDM-1
		B (B3)				L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenémicos	No	Si	CphA, Sfh-1
NI	4	ND ^c	Penicilinas	No	?	Penicilinasas

a. Ac. Clav: ácido clavulánico; b. NI: no incluido; c. ND: no determinado

- ***β-lactamasas cromosómicas***

Las cefalosporinas de grupo 1/ clase C son las β -lactamasas más abundantes producidas por las bacterias gram-negativas. Estas cefalosporinas se nombran frecuentemente como enzimas de tipo AmpC y se encuentran en la mayoría de la Enterobacterias como enzimas cromosómicos (*Bush K. 2010*).

Ciertas enterobacterias poseen de manera natural β -lactamasas de tipo AmpC, como es el caso de *Enterobacter spp.*, *Providencia spp.*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens* y *Citrobacter freundii*, también *Pseudomonas aeruginosa* y otros bacilos gram-negativos no fermentadores. Estos microorganismos poseen una AmpC de naturaleza cromosómica inducible, lo que explica la resistencia natural a las aminopenicilinas, cefalosporinas de primera generación, cefamicinas y aminopenicilinas combinadas con inhibidores de β -lactamasas (amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina-sulbactam), expresada por estos agentes bacterianos. En general este enzima, se produce a bajos niveles, pero es inducible en presencia de antibióticos inductores. Esta situación es reversible, ya que al desaparecer el inductor, se reduce su producción a niveles basales normales (*Sanders CC. 1987; Bennett PM & Chopra I. 1993; Lindberg F, et al 1986*). En ocasiones, este incremento en la expresión puede producirse en ausencia de inductor, debido a la desrepresión del sistema. A diferencia de la inducción anterior, este proceso es irreversible y conduce a la producción constitutiva del gen, situación que ocurre en la selección de mutantes estables durante el tratamiento. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, la desrepresión de *ampC* ocurre en varios pasos: una desrepresión parcial, donde todavía conserva su inducibilidad; y la desrepresión total (*Juan C, et al 2006*). En *Enterobacter* y el resto de enterobacterias, esta desrepresión total ocurre en un solo paso. (*Fournier B, et al 1996; Livermore DM. 1995; Sanders CC & Sanders WE Jr. 1986*).

Las bacterias que poseen el gen *ampC*, tienen un complejo sistema regulador, íntimamente relacionado con el reciclaje del peptidoglicano, detallado más adelante.

Otro modelo de regulación de β -lactamasas cromosómicas inducibles es el modelo de *Aeromonas spp*, llamado BlrAB (del inglés “beta lactamase regulation”). En el que como veremos más adelante se coordinan varias β -lactamasas cromosómicas simultáneamente, sin la presencia de un regulador tipo *ampR*, pero relacionado con un regulador transcripcional de dos componentes CreBC de *Escherichia coli*.

Bacterias como *Escherichia coli* y *Shigella spp*. también poseen una β -lactamasa *ampC* cromosómica, pero constitutiva (no inducible). En condiciones normales, la expresión del enzima ocurre a niveles muy bajos sin mostrar resistencia; sin embargo, su producción puede incrementarse de forma constitutiva, por mutación en región promotora, determinando resistencia a ciertos β -lactámicos incluyendo cefalosporinas y ciertos inhibidores (Jacoby GA. 2009; Livermore DM. 1995; Sanders CC & Sanders WE Jr. 1986.).

Otras bacterias como *Proteus mirabilis*, *Klebsiella spp.*, y *Salmonella spp*. carecen de un gen *bla_{AmpC}* cromosómico; sin embargo, pueden incorporarlo gracias a que este gen puede estar asociado a integrones o transposones localizados en plásmidos conjugativos (*AmpC* plasmídicas) (Bush K et al 1995; Livermore DM.1995; Fournier B et al 1996).

- ***β-lactamasas plasmídicas***

La evidencia molecular sugiere que los genes que codifican a estas enzimas, derivan de los genes *bla* cromosómicos que poseen naturalmente las enterobacterias arriba mencionadas. Estos genes han sido integrados en elementos genéticos transferibles facilitando la diseminación a diferentes microorganismos (Philippon A et al 2002). Los genes *ampC* mediados por plásmidos han sido encontrados en bacterias como *Salmonella spp.*, *K. pneumoniae* y *Proteus mirabilis* que naturalmente no poseen estos genes (Schmidtke A & Hanson N. 2006; Pérez- Pérez FJ & Hanson ND. 2002).

Las penicilinasas comunes, pertenecientes al grupo funcional 2b y grupo molecular A, incluyen enzimas como SHV-1 en *Klebsiella pneumoniae* y la β -lactamasa TEM-1 encontrada especialmente en *Escherichia coli*. Estas enzimas forman parte de las llamadas β -lactamasas de amplio espectro. Son las más representativas del grupo y se muestran con una elevada prevalencia entre Enterobacterias. Las enzimas de este grupo son fácilmente inhibidas por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, con lo que infecciones causadas por organismos productores de estas penicilinasas podrán ser tratados en combinación con un inhibidor de β -lactamasas (Bush K 2010).

Otras β -lactamasas plasmídicas de elevada incidencia son TEM-2, pertenecientes a la clase A y grupo 2b, (en enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*) y las oxacilinasas (OXA), pertenecientes a la clase D. TEM-2, tiene un espectro de acción que incluye penicilinas y cefalosporinas de 1ª generación y las OXAs tienen un perfil de hidrólisis parecido, pero con la adición de la cloxacilina y perdiendo sensibilidad a los inhibidores de β -lactamasas (Livermore DM.1995).

Las β -lactamasas plasmídicas más importantes desde el punto de vista clínico incluyen a las β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs), cefalosporinasas *ampC* (cefamicinasas) y carbapenemasas (Karen Bush. 2010):

Las β -lactamasas de espectro extendido, son enzimas que confieren resistencia a penicilinas y cefalosporinas de tercera y cuarta generación, inhibidas por inhibidores β -lactamasas como sulbactam o tazobactam, y por el ácido clavulánico. Fueron inicialmente identificadas como variantes de las β -lactamasas SHV-1 o TEM-1, debido a mutaciones en el centro activo, con lo que esa modificación aumentó su espectro de hidrólisis a monobactámicos y cefalosporinas de espectro extendido.

Los genes que codifican estas enzimas se encuentran generalmente en plásmidos, confiriendo resistencia a múltiples clases de antibióticos, además de ser fácilmente transferibles entre especies. Se han descrito muchas familias dentro de este grupo (Tabla 1.2), y en muchas especies, como por ejemplo en *Pseudomonas aeruginosa* (Philippon A, Arlet G, Lagrange PH. 1994; Mugnier P. 1996), aunque son *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* los microorganismos portadores más frecuentes. Las familias de BLEEs más importantes por prevalencia son TEM, SHV, y CTX-M (Livermore DM.1995).

Las primeras enzimas CTX-M fueron identificadas en 1990 en el este de Europa y América del Sur, y en una década pasó a ser la familia de BLEEs con más predominio en muchos hospitales (Bush K 2010). Esta enzima CTX-M hidroliza cefotaxima y ceftriaxona de manera más eficiente que ceftazidima, mientras que las enzimas tipo TEM y SHV su capacidad hidrolítica es el revés, obligando a realizar el estudio con ceftazidima y ceftriaxona (o cefotaxima) para así poder detectar algunas de las tres y no obtener falsos negativos (Paterson DL, Bonomo RA 2005; Vila J et al 1997; Danel F 1997).

Tabla 1.2. Diferentes grupos de β -lactamasas de espectro extendido.

<i>BLEE</i>	<i>β-lactamasa relacionada</i>	<i>País de origen</i>	<i>Especie inicial donde se detectó inicialmente</i>
TEM	TEM-1 TEM-2	Francia	<i>Entetrobacteriaceae</i>
SHV	SHV-1, LEN	Alemania	<i>Entetrobacteriaceae</i>
CTX-M	KLUA <i>Kluyvera</i>	Alemania, Argentina	<i>Escherichia coli, Salmonella spp.</i>
OXA	OXA-10, OXA-2	Turquía, Francia	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PER	PER	Francia	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
VEB		Vietnam, Tailandia	<i>Pseudomonas aeruginosa, Enterobacteriaceae</i>
TLA	CME-1	Méjico	<i>Escherichia coli</i>
GES/IBC		Guayana, Sudáfrica	<i>Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa</i>
BES	<i>Y. enterocolítica</i>	Brasil	<i>S.marcescens</i>
SFO	AmpA <i>S. fortícola</i>	Japón	<i>Enterobacter cloacae</i>

Otro tipo de β -lactamasas plasmídicas son las de tipo *ampC* o cefamicinasas. Estas enzimas son derivadas de genes *ampC* de diferentes miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. 2002). En los últimos años se han descrito β -lactamasas plasmídicas que confieren resistencia no sólo a cefalosporinas de tercera generación, sino también a cefamicinas, pero no a carbapenémicos; no se inhiben por el ácido clavulánico pero sí por aztreonam, aunque con alguna excepción (MOX-1). La AmpC plasmídica tipo ACC-1 representa otra de las excepciones debido a que no confiere resistencia a cefamicinas (Jacoby G.Rev. 2009; Bauernfeind A et al 1999).

La mayor parte de estas enzimas se han descrito en *Klebsiella pneumoniae*, en *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis* (Livermore DM 1995; Phillipon A et al 2002) y como se ha comentado anteriormente, están relacionadas en su secuencia, con las *ampC* cromosómicas de algunas bacterias como *Enterobacter cloacae* (Bush K 2010; Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. 2002).

Se conocen seis grupos de AmpC plasmídicas en función de la homología de sus genes: CIT (derivadas de la AmpC cromosómica de *Citrobacter freundii*), DHA (derivadas de la AmpC cromosómica de *Morganella morganii*), ACC (cuyo origen está relacionado con la AmpC cromosómica de *Hafnia alvei*), FOX (de origen desconocido), MOX (de origen desconocido) y EBC (derivadas de la AmpC cromosómicas de *Enterobacter cloacae* y/o *Enterobacter asburiae*)(Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. 2002). De estas, ACT-1, DHA-1, DHA-2 y CMY-13 están ligadas al gen *ampR* y son inducibles; mientras que otras *ampC* plasmídicas, no están ligadas a *ampR* y se expresan constitutivamente. Se ha determinado que el nivel de expresión de ciertas AmpC plasmídicas tanto inducibles como no inducibles es mucho mayor en comparación con las AmpC cromosómicas inducibles (Bush K 2010); un ejemplo de ello son las AmpC plasmídicas ACT-1 y MIR-1 (inducible y no inducible, respectivamente) que muestran unos niveles de expresión de 33 a 95 veces mayor que la expresión de la AmpC cromosómica inducible de *Enterobacter cloacae* (Bush K 2010). Debido en parte, al mayor número de copias de genes codificantes de ACT-1 (Bush K 2010; Reisbig M, Hossain A, Hanson D. 2003) y la presencia de promotores eficaces que incrementan la expresión de las *ampC* plasmídicas. Estas enzimas plasmídicas han sido detectadas tanto en aislados intrahospitalarios como en comunitarios (Jacoby G. 2009).

Finalmente, la última clase de β -lactamasa plasmídica, y no por ello menos importante son las carbapenemasas. Estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar la mayoría de los antibióticos β -lactámicos, incluyendo los carbapenémicos que son generalmente estables frente a otras β -lactamasas que poseen serina en su centro activo (*Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. 1995*).

En la tabla 1.3 se muestran tres clases diferentes de carbapenemasas, cada una de ellas con más de un representante: en la clase A se incluyen las enzimas que poseen serina en su centro activo y son inhibidas por el ácido clavulánico, como por ejemplo KPC y GES (*Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.1995; Watanabe M et al/1991*); en la clase B están las llamadas metalo- β -lactamasas (MBLs), dependientes de Zinc y resistentes a los inhibidores clásicos de β -lactamasas, pero sensibles a EDTA.

El tercer tipo, pertenece a la clase D de Ambler y está formado por algunas variantes de OXA-23, 24, 25, 26, 27, 40, 48, 51 y 56 (*Poirel L et al 2004; Walther-Rasmussen J, Hoiby N. 2006*) y muestran diferentes grados de resistencia a los carbapenémicos.

Tabla 1.3. Diferentes clases de carbapenemasas (Bush K & Jacoby GA 2010), completado con representantes más usuales y localización genética.

Clase molecular ^a (Clase Funcional ^b)	Enzimas	Inhibido por		Microorganismos	Localización genética
		Ac. Clav ^c	EDTA		
A (2f)	Sme, IMI, Nmca	±	-	<i>Serratia marcescens</i>	Cromosoma
				<i>Enterobacter cloacae</i>	
	KPC	±	-	<i>Enterobacterias</i>	Plásmido
	GES	±	-	<i>Enterobacterias</i>	Plásmido
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
B (3)	L1	-	+	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Cromosoma
	CcrA			<i>Bacteroides. fragilis</i>	
	Cpha			<i>Aeromonas hydrophila</i>	
	BcII			<i>Bacillus cereus</i>	
	IMP, SPM, SIM, GIM, VIM, AIM, DIM, KHM, NDM	-	+	<i>Enterobacteriaceae</i>	Plásmido/Cromosoma ^d
<i>Pseudomonas spp.</i>					
BGNNF					
D (2df)	OXA (OXA-48)	±	-	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Cromosoma/ Plásmido
				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
				<i>Enterobacteriaceae</i>	

a. De acuerdo con la clasificación de Ambler; b. De acuerdo con la clasificación de Bush, Jacoby; c. Ácido clavulánico; d. Su localización generalmente es plásmídica, aunque en ocasiones puede ser cromosómica.

1.1.3.4 Modificación de la diana del antibiótico

La bacteria puede alterar la diana del antibiótico, impidiendo o dificultando la acción del mismo. Podemos encontrar alteraciones a nivel del ADN girasa (confiriendo resistencia de quinolonas), del ARNr 23S (resistencia a macrólidos) de las enzimas PBPs (proteínas fijadoras de penicilina) necesarias para la formación de la pared celular (confieren resistencia a β -lactámicos).

Una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o varios antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos de diversas especies bacterianas, con lo que dificulta aún más el estudio de las resistencias de las bacterias a los distintos antibióticos.

La alteración o modificación del sitio de unión del antimicrobiano se traduce en una pérdida de la afinidad y por tanto imposibilita la destrucción del microorganismo. Esta mutación se puede dar a nivel ribosomal, como ocurre con la resistencia a macrólidos y lincosamidas (Clindamicina), en la que la adición de grupos metilo a la unidad 50s del ribosoma impide la acción de determinados antibióticos. Este mecanismo está descrito en anaerobios y *Staphilococcus aureus*; y son muy similares a los mecanismo de resistencia para tetraciclinas y aminoglucósidos.

Otro ejemplo por el cual las bacterias pueden modificar la diana, es mediante las llamadas Proteínas de Unión a Penicilinas, PBPs (del inglés "Penicillin Binding Proteins"). Están presentes en la membrana de la mayoría de las bacterias, y se llaman así por la capacidad que tienen para unirse covalente y de manera irreversible a la penicilina. Esta unión conlleva a una modificación que puede conducir a cambios en su estructura química, lo que impide su normal interacción con el antibiótico o bien a un incremento en la producción de estas proteínas, de modo que la cantidad de antibiótico que llega no es suficiente para inactivar las proteínas producidas.

Estas proteínas son imprescindibles para llevar a cabo la biosíntesis de la pared celular (*Ghuysen J-M. 1991; Matsuhashi M. 1994*), y son dianas letales.

Se nombran en función de su peso molecular en orden decreciente, que varía de 140.000 a 40.000 D; y tanto el número de PBP, su peso molecular, su concentración y su sensibilidad a antibióticos β -lactámicos, es variable entre especies bacterianas (*Georgopapadakou NH & Liu FY 1980, Kong et al 2010*). Estas proteínas se han estudiado en *Escherichia coli*, para conocer el número y las funciones fisiológicas en la división celular, mantenimiento de la morfología, aspecto y relación con los diferentes β -lactámicos. Spratt (*Spratt BG, Pardee AB. 1975*) definió las PBPs del 1 al 6, y posteriormente se han caracterizado PBP6b, PBP7/8 (*Baquero MR et al 1996; Romeis T & Holtje JV 1994*).

Las PBP's, en relación a su tamaño y peso molecular, se dividen en dos subgrupos: El primer grupo lo forman las PBP-1, PBP-2 y PBP3 (de más alto peso molecular), y se conocen como PBPs esenciales. Son enzimas fisiológicamente importantes ya que catalizan las etapas finales de la biosíntesis del peptidoglicano. El otro grupo está formado por el resto de las PBPs, que tienen un peso molecular más bajo y son mucho más abundantes en la membrana. Poseen actividad D-alanina carboxipeptidasa, y no se consideran necesarias para la viabilidad celular (*Georgopapadakou NH.1993*).

1.2 Características generales de *Pseudomonas aeruginosa*

El género *Pseudomonas* inicialmente se dividió en cinco grupos, basado en la homología del ARN ribosómico (*Palleroni. 1984*); que dos décadas más tarde ha culminado en la separación de algunas especies de este género a géneros independientes como es el caso de *Burkholderia*, *Acidivorax* y *Comamonas*, el género *Brevundimonas* y el género *Stenotrophomonas*, donde encontramos de acuerdo con la clasificación inicial, las especies de los grupos II, III, IV y V, respectivamente. Quedando, finalmente, el género *Pseudomonas* restringido al grupo I, que comprende bacterias como *P.aeruginosa*, *P.putida*, *P. fluorescens*, *P.stutzeri*, *P. veronii*, *P.alcaligenes*, *P.pseudoalcaligenes*, *P.monteilii*, *P.luteola*, *P. mendocina* y *P. oryzihabitans*.

A pesar de la gran diversidad desde el punto de vista genotípico, fenotípico y metabólico, una de las características que definen este género es la presencia del gen de la lipoproteína I de la membrana externa (*oprI*) (*Claudia Kiewitz and Burkhard Tümmler.2000; Saint-Onge A, Romeyer 1992.; Stead DE. 1992*) y la presencia de ácidos grasos típicos de este género (*Palleroni NJ.2003; Stead DE. 1992*).

Pseudomonas aeruginosa, es un bacilo gram-negativo, suele ser móvil gracias a la presencia de uno o más flagelos polares, no formador de esporas y cuya longitud está comprendida entre 1.5 y 5 μm .

Su metabolismo es siempre respiratorio, generalmente aerobio, usando el oxígeno como aceptor final de electrones, aunque en determinadas circunstancias puede ser anaerobio con los nitratos como aceptores. Responden positivamente a la prueba de la oxidasa y catalasa, y negativamente a la prueba indol, y no fermentan la glucosa.

Muestran una temperatura óptima de crecimiento a 37°C aunque, a diferencia de otras especies de este género también puede crecer a 42°C; además existen determinadas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que también muestran cierto crecimiento a 4°C (Kiska DL, Gilligan PH. 2003).

Sus colonias suelen ser aplanadas y con un olor dulzón característico, aunque, se pueden encontrar otro tipo de morfología que se puede relacionar con algunas infecciones pulmonares como por ejemplo en Fibrosis quística y en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).



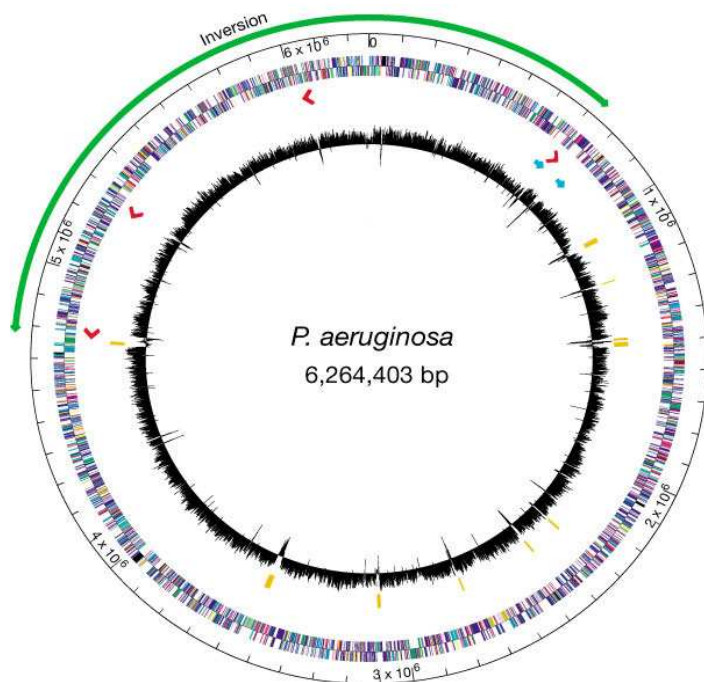
Otra característica no esencial, pero asociada a las especies de *Pseudomonas* es la secreción de pigmentos, en concreto pioverdina, un sideróforo soluble en agua y fluorescente de color amarillento-verdoso que emite fluorescencia cuando se ilumina con rayos UV; también se pueden

encontrar síntesis de otros pigmentos en algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* como la piocianina, que junto con la pioverdina le confieren un tono verde brillante, piorubina (coloración roja) o piomelanina (pigmentación marrón), esta última se ha descrito que puede ser un marcador de resistencia al estrés (Fenoll A et al 1998).

En el año 2000, Stover y colaboradores consiguieron secuenciar el genoma de PAO1 (Stover CK et al 2000). Su tamaño es de aproximadamente 6,3 millones de pares de bases, más grande que el de otros genomas bacterianos secuenciados.

El gran tamaño genómico y su complejidad refleja una gran cantidad de adaptaciones evolutivas en *Pseudomonas aeruginosa*, también se encuentran un gran número de genes de regulación y genes relacionados con el transporte y expulsión de sustancias, sistemas quimiotácticos y formación de biofilms (Fajardo A et al 2008; Remans K et al 2010).

También confiere a *Pseudomonas aeruginosa* una gran capacidad para desarrollar resistencia a antibióticos en dos vías paralelas: por una parte, su capacidad para metabolizar diversidad de sustratos diferentes y expulsar sustancias que puedan ser tóxicas; y por otra, la capacidad de desarrollar mutaciones compensatorias para atenuar la pérdida de eficacia biológica que normalmente confieren los mecanismos de resistencia, ya que están íntimamente ligados con el metabolismo general de la bacteria.



Este genoma contiene alrededor de unos 5500 marcos abiertos de lectura (ORFs), de los cuales sólo se conoce la función de menos de la mitad, lo que indica la gran complejidad genómica de este microorganismo.

Figura 1.8 Genoma de PAO1. Stover et al 2000

Una característica particular de esta bacteria es la localización de los genes que intervienen en la virulencia de la bacteria, ya que de forma habitual no están codificados en las llamadas islas de patogénesis (regiones de ADN que contribuyen a la virulencia) como en la mayoría de los patógenos (Battle SE .2008), sino que se encuentran distribuidas en su cromosoma (O'Toole GA & Kolter R 1998).

Aunque los factores determinantes de la virulencia más conocidos de *Pseudomonas aeruginosa* están codificados en su genoma, algunas cepas individuales difieren considerablemente en su virulencia.

Una explicación es que estos segmentos o regiones de ADN, que a menudo se integran en los genes del ARNt, se caracterizan por tener un contenido en G+C divergente del cromosoma bacteriano, e incluyen componentes de elementos genéticos móviles. Estas construcciones genéticas se denominan PAPI ("*Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity islands") o PAGI ("*Pseudomonas aeruginosa* genomic islands") (Klockgether J et al 2007; Qiu X, Gurkar AU, Lory S. 2006; Goldberg JB, Pier GB.2000).

El conocimiento de la secuencia completa y los procesos codificados, proporciona una riqueza de información para el descubrimiento y la explotación de nuevos antibióticos, y la esperanza en el desarrollo de estrategias eficaces para tratar las infecciones oportunistas.

Se ha aislado *Pseudomonas aeruginosa* en gran variedad de hábitats, con especial predilección por los ambientes húmedos (Holt JG et al 1994), es capaz de colonizar un amplio rango de nichos y es esta gran capacidad de sobrevivir a diferentes nichos lo que hace de *Pseudomonas* un microorganismo problemático en el ambiente hospitalario. Se puede encontrar en gran variedad de soluciones acuosas como jabones, soluciones de lentillas, colirios, fluidos para diálisis; en cosméticos; en piscinas y baños; e incluso, en instrumental hospitalario.

Pseudomonas aeruginosa, también es capaz de colonizar el tracto pulmonar, urinario, tejido, heridas, y puede causar, además, infecciones en sangre y en otras superficies corporales (ojos, oídos, etc.).

1.2.1 Importancia clínica

Es precisamente esta ubicuidad, la que hace que *Pseudomonas aeruginosa* sea el primer causante de infecciones oportunistas en el hombre y principal patógeno nosocomial sobretodo en pacientes ingresados en la unidad de cuidados Intensivos, pacientes con ventilación asistida y la llamada neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV). Este microorganismo está asociado comúnmente con infecciones en pacientes con EPOC y Fibrosis Quística.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una enfermedad caracterizada por la existencia de una progresiva obstrucción de las vías aéreas, generalmente irreversible, causada principalmente por el humo del tabaco, que produce como síntoma principal una disminución de la capacidad respiratoria. En la Fibrosis Quística (FQ), debido a la existencia de alteraciones hidroelectrolíticas y de mucoproteínas a nivel glandular, y a la formación de biofilms, se originan secreciones anómalas y espesas, que favorecen el desarrollo de microambientes bacterianos (*Yankaskas JR et al 2004*). Constituyendo, ambas enfermedades, el grupo poblacional con mayor riesgo de infección (*Holland SP et al 1993*).

1.2.2 Factores de virulencia

Pseudomonas aeruginosa se caracteriza por tener un gran número de factores de virulencia y sistemas de control para su síntesis; gran parte de estos factores están controlados por sistemas de regulación quórum sensing o comunicación célula a célula.

Sin embargo, al margen de las clásicas toxinas, hay genes de expresión constitutiva, relacionados con funciones celulares ordinarias, involucrados en la virulencia como por ejemplo: *dsbA* (Parkins MD, Ceri H, Storey DG. 2001; Ha UH, Wang Y, Jin S. 2003.; Brinkman FS et al 2001).

Dichos genes implicados en la virulencia, son también imprescindibles tanto para la supervivencia de la bacteria en el hospedador como para la patogenicidad de la bacteria y tan importantes como los genes de factores de virulencia clásicos, que posibilitan la generación de efectos tóxicos en células diana (Salyers AA & Whitt DD 2002).

A continuación, se definen los factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*, que se encuentran resumidos en la siguiente tabla (Tabla 2.1).

- *Adhesinas*: son factores de virulencia de la superficie celular, que intervienen principalmente en la colonización inicial del epitelio respiratorio, mediante la adherencia a receptores específicos. Las adhesinas que *Pseudomonas* produce pueden ser tipo pili, en la que la bacteria se adhiere de manera eficiente a células epiteliales, este tipo de pili pertenece a los pili de tipo 4 y son importantes en las interacciones bacteria-célula (Hahn HP 1997), formación de biopelículas (O'Toole GA & Kolter R 1998) y movilidad tipo twitching (Whitchurch CB, Erova TE, et al 2002; Mattick JS 2002). La infección crónica en FQ está asociada con la pérdida de movilidad twitching por varios mecanismos (Lee B et al 2005; Pasloske BL et al 1998) como mutaciones en gen *pilB*, esencial para la biogenesis del pili (Kresse AU et al 2003; Smith EE et al 2006) y en gen *pilQ*, que codifica una proteína transmembrana esencial para la extensión del pili (Chang, YS et al 2007).

El otro tipo de adhesinas que sintetiza la bacteria son las adhesinas no pili, como el lipopolisacárido LPS, importante en pacientes con FQ ya que posibilitan la adhesión a las secreciones mucosas (Salyers AA & Whitt DD. 2002).

El LPS, se une a una proteína que actúa como canal de cloro de la membrana de la célula hospedadora (regulador de conductancia transmembrana de la FQ (CFTR), permitiendo a la bacteria adherirse y después infectar a las células del epitelio pulmonar. En infecciones agudas este LPS es fino y protege a la bacteria frente a la acción del complemento; pero en una infección crónica, este LPS se vuelve más rugoso y resistente (Sato H & Frank DW 2004).

- **Toxinas:** pertenecen al sistema de secreción tipo III (T3SS) (Salyers AA & Whitt DD 2002; Lee VT et al 2005) (se inyecta directamente desde la bacteria a la célula hospedadora). Existen cuatro exoenzimas conocidas (ExoS, ExoT, ExoU, ExoY) cuya expresión es variable en diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. La mayoría de las cepas poseen Exo Y, Exo T y una de las otras dos exoenzimas (Exo S o Exo U)(Feltman H et al 2001); por ejemplo, en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes con FQ, es más frecuente la expresión de Exo S que de Exo U. Sin embargo, sólo en muy raras ocasiones se encuentran las cuatro exoenzimas en una misma cepa. Exo U es una potente citotoxina, que una vez penetra en las células eucariotas, lisa la célula intoxicada mediante su actividad fosfolipasa (Lee VT et al 2007); algunos estudios sugieren que infecciones por cepas que secretan esta exoenzima se asocian con una mayor gravedad y mortalidad (El-Solh AA et al 2011; Roy- Burman A et al 2001).

Estas cuatro toxinas tienen la función de reducir la efectividad de la defensa fagocítica del hospedador. En la tabla 1.4 se muestran las funciones y el efecto de cada una de ellas. Además de las exotoxinas ya descritas, *Pseudomonas aeruginosa* posee otras toxinas que se liberan al medio extracelular y pertenecen al sistema tipo II. Entre estas toxinas podemos destacar la exotoxina A, que inhibe el factor de elongación 2, con la consecuente interrupción en la síntesis protéica y la contribución a la muerte de las células del huésped.

Tabla 1.4 Principales factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

Factores de virulencia		Función y efectos en el hospedador
Adhesinas		
Pili		Adhesión de la bacteria a las células epiteliales.
LPS		Adhesión de la bacteria a secreciones mucosas.
Toxinas		
T3SS	ExoU	Actividad fosfolipasa, destructora de membranas en macrófagos. Provocando una rápida necrosis
	ExoT/ExoS	Bloqueo en la transducción de señal y reorganización del citoesqueleto en fagocitos polimorfonucleares. Conduciendo a fallos en los mecanismos de transducción de señales, provocando hiperproducción de citoquinas
	ExoY	Aumento de AMPc en las células del hospedador y reorganización del citoesqueleto de actina. Causando una reorganización del citoesqueleto
T2SS	Exotoxina A	Bloqueo de la síntesis proteica (factor de elongación 2), daño tisular. Provocando la interrupción en la síntesis proteica y la contribución a la muerte de las células del huésped.
	LasA y LasB	Actividad elastolítica en células pulmonares. Importantes en la infección pulmonar.
T5aSS	EstA	Hidroliza ester de glicerol; implicado en la producción de rhamnolípidos.(1)
T5bSS	LepA	Actúa como proteasa e induce la activación de NF-kB. (2)
T6SS (HSI-I)	Hcp-1	Formación de nanotubos. Es secretado durante infecciones crónicas en pacientes con FQ. (3)
Factores extracelulares		
Ramnolípidos y Fosfolipasa C		Solubilización e hidrólisis del surfactante alveolar, respectivamente. Colapso de los alveolos y reducción de la función pulmonar en Fibrosis Quística.
Alginato		Posible incremento en la capacidad de formación de biofilms y ventaja en el establecimiento de la infección crónica en FQ. Reducción de la expulsión mecánica del pulmón; barrera física para el acceso a antibióticos y células del sistema inmunitario.

(1) Wilhelm et al 1999; (2) Kida et al 2008; (3) Mougous et al 2006

- Elastasas: LasA y LasB son dos enzimas que llevan a cabo una actividad elastolítica en células pulmonares. LasA es una serín-proteasa que se une a la elastina y potencia la actividad de LasB, que es una zinc-metaloproteasa. Ambas enzimas son más importantes en las etapas iniciales de la infección pulmonar, se ven afectadas por las concentraciones extracelulares de hierro y zinc, y controladas por diversos genes, como por ejemplo el activador transcripcional LasR, también implicado en la regulación de otros genes mediante sistemas de quórum-sensing (*Hauser AR et al 2011; Pesci EC 1997; Storey DG et al 1998; Toder DS et al 1994; Toder DS et al 1991*). Mutaciones en este activador transcripcional podrían causar disminución de la secreción de exotoxina A, fosfolipasa C y elastasas (*Hauser AR et al 2011; Storey DG et al 1998*)

- Hemolisinas: *Pseudomonas aeruginosa* produce dos tipos de hemolisinas, la proteasa alcalina fosfolipasa C (Plc) y el ramnolípido (Rhl).

La fosfolipasa C es una hemolisina termolábil que degrada los lípidos y la lecitina, de modo que facilita la destrucción tisular. Por otra parte el Ramnolípido es una hemolisina termoestable, capaz de solubilizar los fosfolípidos, altera los tejidos que contienen lecitina e inhibe la actividad ciliar del aparato respiratorio (*Read RC et al 1992; Hingley ST et al 1986*).

Estas dos proteínas son capaces de causar daño en los pulmones de los pacientes de FQ (*Olvera C et al 1999*). En individuos sanos, los alvéolos pulmonares están recubiertos de una sustancia surfactante compuesta por agua y fosfolípidos, que impide que los alvéolos se colapsen cuando se vacían de aire en la respiración, en cambio, en pacientes de FQ, produce el colapso alveolar debido a un defecto en el surfactante.

Este colapso se ve favorecido en los pacientes con infección crónica por *Pseudomonas aeruginosa*, gracias al ramnolípido, que solubiliza los fosfolípidos del surfactante haciéndolos más accesibles para la unión de la fosfolipasa C.

- Alginato: La mayoría de los aislamientos clínicos o ambientales de *Pseudomonas aeruginosa* son cepas no mucoides, ya que producen cantidades muy pequeñas de alginato. Sin embargo, en los pulmones de los enfermos de FQ se seleccionan muy frecuentemente cepas mucoides, que son el factor principal de morbilidad y mortalidad en estos pacientes (Ciofu O et al 2008; Deretic V et al 1994; Govan JRW et al 1996; Hauser AR et al 2011).

El alginato es un copolímero lineal con enlaces β -1,4 de D-manuronato y C-5, L-guluronato. Su biosíntesis ha sido completamente descrita (May TB & Chakrabarty AM. 1994; Mohammadi NA. 2007) y se ha determinado que la causa más frecuente de este fenotipo mucoso en los pulmones de los pacientes de FQ es la mutación en el gen que codifica para la proteína MucA (factor anti-sigma) (Xie Z-D et al 1996). La mayoría de los genes que codifican la biosíntesis de alginato en *Pseudomonas aeruginosa* están localizados en un solo operón llamado *algD* (Hauser AR et al 2011); este operón y la producción de alginato está bajo regulación positiva y negativa. Para la expresión del promotor *algD* se requiere el factor sigma *algU* (Hauser AR et al 2011). En las cepas salvajes, el factor anti-sigma MucA (codificado por genes *mucA*) inactiva al factor sigma *AlgU*; pero en pacientes con FQ se seleccionan mutantes *mucA*, que inactivan a este factor anti-sigma, que conducen a una pérdida de producción de MucA y consecuentemente a niveles elevados de *AlgU*. Esta sustancia tiene diversos efectos ya que puede actuar como antioxidante de los radicales libres liberados por los macrófagos, como barrera física impidiendo la fagocitosis e inhibición de la quimotaxis de los neutrófilos, la activación del complemento, y además puede potenciar la formación de biofilms (Govan, JRW and V Deretic. 1996; Hauser AR et al 2011).

- Quórum sensing: Es el mecanismo de control de expresión de genes en función de la densidad celular (*Waters CM & Bassler BL 2005*). Es utilizado por algunos bacilos gram-negativos para comunicarse entre los diferentes microorganismos de una población y es la manera que tienen de adaptarse al medio y de ejercer su patogenicidad de forma coordinada. Este fenómeno permite a una colonia de bacterias dar una respuesta coordinada, como emitir luminiscencia (*Vibrio Fischeri*), secretar sustancias viscosas provocando infecciones (*Pseudomonas aeruginosa*) o liberar toxinas al medio para matar a otros organismos y así alimentarse (*P. festeria*). Estos sistemas de señalización celular constan de una molécula pequeña que se denomina autoinductor y es sintetizada por un autoinductor de tipo LuxI y un activador transcripcional tipo LuxR, llamado así por homología con el sistema Lux, primer sistema de comunicación célula-célula, descrito en *Vibrio fischeri* (primera especie en la que se descubrió y se describió el ACYL-homoserina lactosa (señal clave en el quorum sensing) y responsable de la regulación de bioluminiscencia dependiente de la densidad celular (*Haygood MG, & Neilson KH. 1985; Neilson KH & Hasting JW. 1979*)).

En condiciones de baja densidad celular, se produce autoinductor a niveles basales, difundiendo al exterior a favor de gradiente; cuando se produce un incremento en la densidad, el autoinductor se acumula en la célula, alcanzando una concentración intracelular similar a la concentración extracelular, y como consecuencia el autoinductor se une a un activador transcripcional que codifica a unos determinados genes, que regularán la producción y excreción de factores de virulencia o de sustancias que intervienen en la formación de biofilms.

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, estas sustancias autoinductoras son n-acyl homoserina lactonas e inicialmente se identificaron 2 sistemas quorum sensing: el sistema LasR/LasI y el sistema rhlR/rhlI (Brint JM & Ohman DE.1995; Gambello MJ et al 1993; Latifi A et al 1995), descritos anteriormente. Posteriormente se identificó un tercer sistema llamado PQS, del inglés “*Pseudomonas Quinolone Signal*”. PQS está controlado por el sistema Las y regula el sistema Rhl; sugiriendo que PQS actúa como enlace entre los dos sistemas anteriormente descritos (Veesenmeyer JL et al 2009).

- Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos, ADN y proteínas, producida por la propia bacteria, y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo (Costerton JW et al 1995; Sutherland I 2001; Whitchurch CB et al 2002; Matsukawa M & Greenberg EP 2004; Branda SS et al 2005). El desarrollo de biofilms depende de la densidad celular, la disponibilidad de nutrientes y fuentes de energía presentes en el ambiente; controlado a través del sistema quorum sensing. Estudios realizados utilizando microscopía confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz del biofilm no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas del biofilm. La existencia de estos canales no evita sin embargo, que dentro del biofilm podamos encontrarnos con ambientes diferentes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad sobre el estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro del biofilm y dificulta su estudio (Costerton JW, et al 1995; Davey ME, O’Toole GA. 2000; Stoodley P et al 2002).

1.2.3 Epidemiología de la resistencia a antibióticos

La creciente amenaza de resistencia antimicrobiana en *Pseudomonas aeruginosa* recae por una parte en la extraordinaria capacidad que posee este organismo para desarrollar resistencia a casi cualquier antibiótico utilizado, debido a mutaciones en genes cromosómicos. Por otra parte la creciente prevalencia de determinantes de resistencia transferibles, en particular aquellos que codifican carbapenemasas de clase B (MBL) o β -lactamasas de espectro extendido, frecuentemente cotransferidas junto con genes que codifican enzimas modificantes de aminoglucósidos (*Lister PD et al 2009; Livermore DM 2002*).

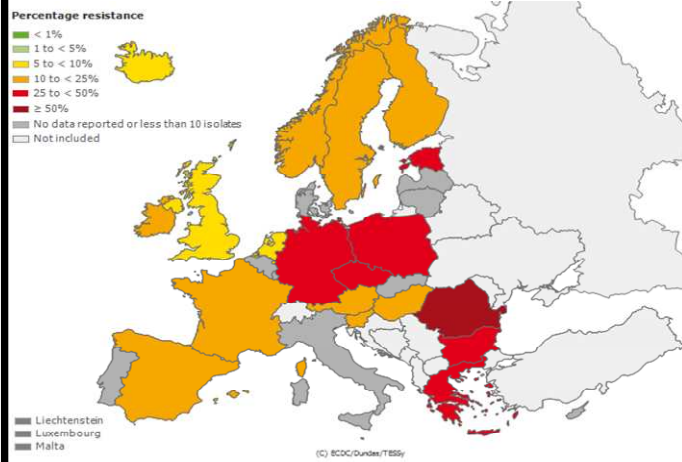
Pseudomonas aeruginosa se encuentra entre los diez microorganismos más frecuentes en UCI que provocan neumonía adquirida (17.5%), infecciones sanguíneas (8.4%) e infecciones del tracto urinario (14.5%) (*EARSS. Annual epidemiological report Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data*)

Aunque hay moléculas bajo desarrollo clínico que puede ayudar a mitigar en cierta medida esta amenaza de resistencia en el futuro, actualmente en Europa los carbapenémicos (imipenem, meropenem y doripenem) son de momento los antibióticos de primera línea disponibles para combatir infecciones de *Pseudomonas aeruginosa* resistente.

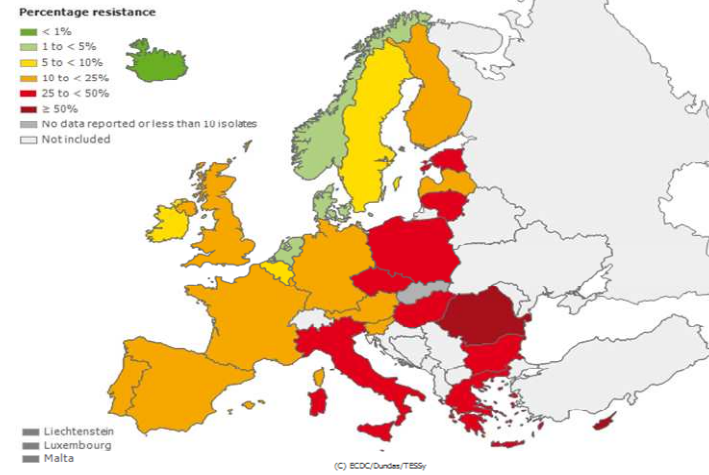
De 2007 a 2010, se ha descrito un incremento en los niveles de resistencia a antibióticos, especialmente en el sur y este de Europa. Por un lado, el fenómeno de multiresistencia, es un fenómeno cada vez más frecuente (aproximadamente un 15% de los aislados muestran resistencias al menos a tres tipos de antibióticos); por otro, la resistencia a carbapenémicos, que se encuentra alrededor de un 20%, reduciendo las opciones de tratamiento (Figura 1.9).

Sin embargo, a pesar del incremento en los niveles de resistencia, en España parece ser que la actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* se mantiene bastante estable para la gran mayoría de antibióticos, aunque con ligeros descensos de su actividad (EARSS) (*Antimicrobial resistance surveillance in Europe Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*).

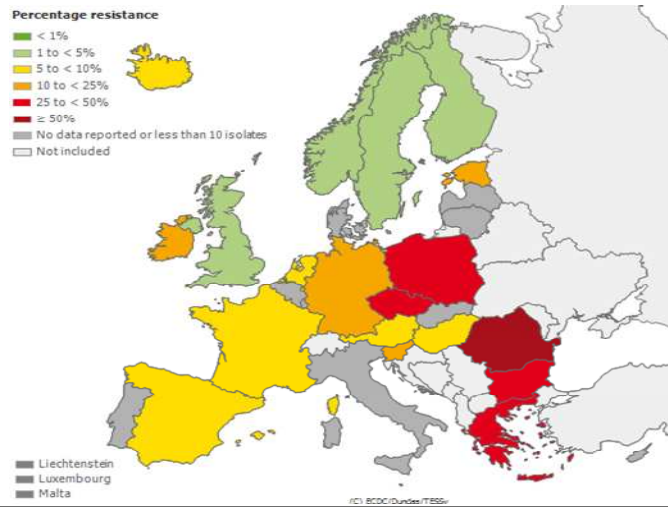
% (R+I) Carbap. 2005



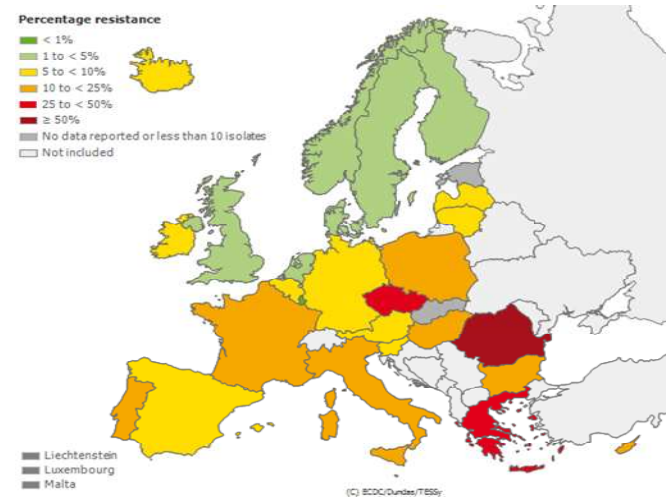
% (R+I) Carbap. 2010



% (R) Ceftazidima 2005



% (R) Ceftazidima 2010



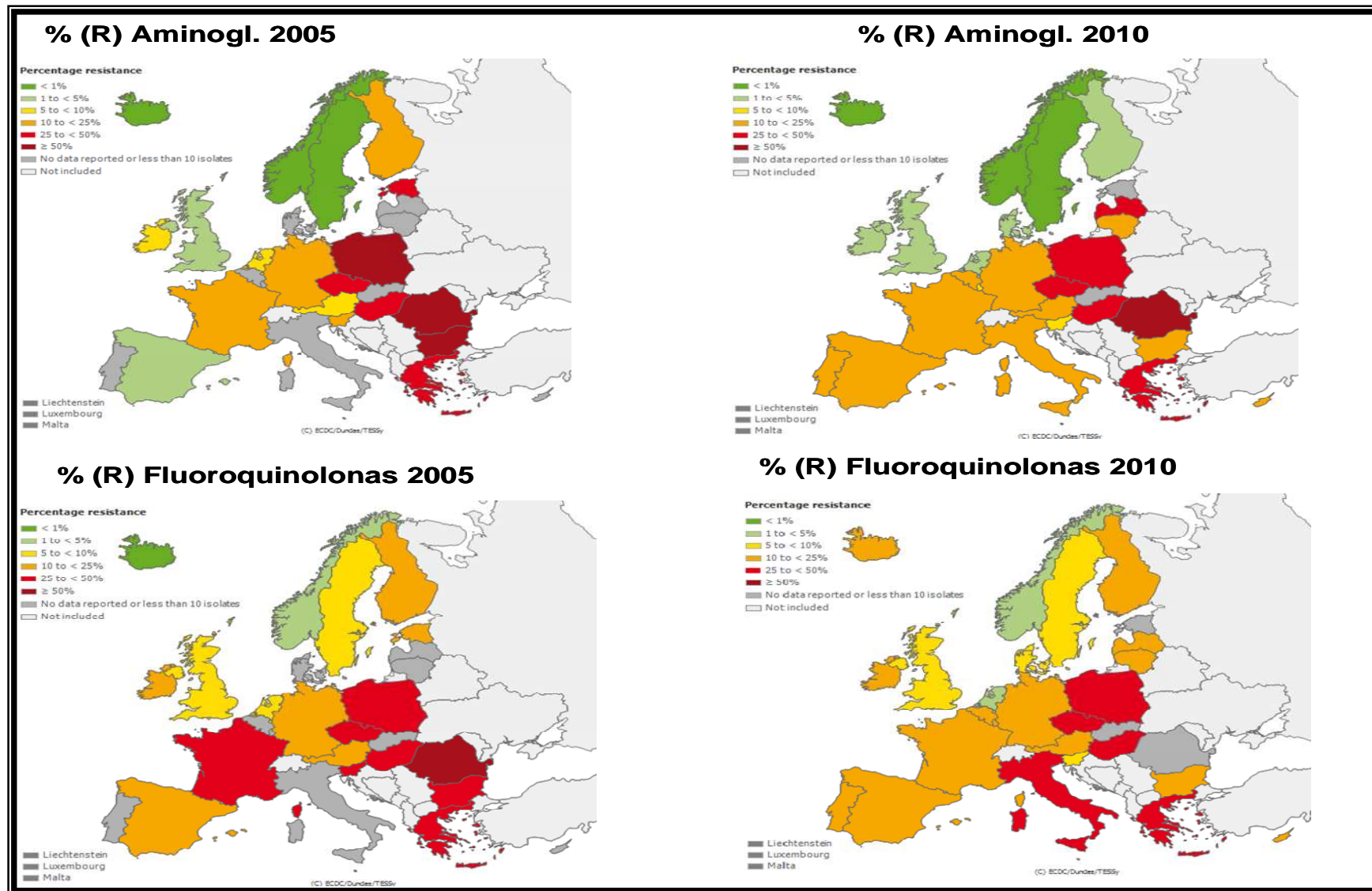


Figura 1.9. Porcentajes de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* (R+I) en el periodo 2005-2010 (Fuente: EARSS Interactive Database)

Es crucial tener un conocimiento profundo, de la evolución en la epidemiología y del impacto de los mecanismos de resistencia a carbapenémicos en *Pseudomonas aeruginosa*, con el uso de los modelos farmacocinéticos/farmacodinámicos (PK/PD), para optimizar la terapia antimicrobiana para prevenir y combatir infecciones causada por *Pseudomonas* multirresistente.

1.3 Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es uno de los patógenos nosocomiales más relevantes, uno de los principales causantes de infecciones respiratorias adquiridas dentro del ambiente hospitalario y la primera causa de VAP (neumonía asociada a ventilación) en UCI, con una elevada tasa de mortalidad; principalmente debido a la extraordinaria habilidad de esta bacteria para adquirir resistencia a los antibióticos. El uso elevado de antibióticos en hospitales, sobretudo en pacientes de UCI y con enfermedades como FQ, ha generado una presión selectiva en el desarrollo de resistencias.

En general la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* es debida a la combinación de varios factores (*Lambert PA 2002*):

- Su resistencia intrínseca debida la baja permeabilidad de su membrana externa y expresión de bombas de expulsión.
- La existencia de un gran repertorio de sistemas de regulación que permite la expresión de genes de resistencia.
- Su capacidad de adquirir resistencia a través de mutaciones en genes cromosómicos.
- A la resistencia adquirida de forma horizontal vía plásmidos, transposones y fagos.

1.3.1 Resistencia Intrínseca

Como se ha comentado en varias ocasiones, *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno nosocomial (Hidron et al 2008; Jones RN et al 2009; Zhanel et al 2009), causante de infecciones con elevado índice de mortalidad (Kerr & Snelling 2009; Lambert ML et al 2011; Mahar et al 2010; Mutlu & Wunderink 2006); esto último, es en parte atribuible a la resistencia intrínseca a muchos antibióticos (Poole, 2002). Se denomina resistencia intrínseca a aquella resistencia inherente o natural de la bacteria y, por tanto, no ha sido adquirida por un proceso de mutación o a partir del material genético de otra bacteria.

Una de las características más preocupantes de *Pseudomonas aeruginosa* es que presenta una baja sensibilidad antibiótica, debido a una serie de mecanismos como la reducción de la permeabilidad bacteriana, la expresión de mecanismos de expulsión de antibióticos y la producción de la β -lactamasa AmpC; mecanismos detallados previamente en el apartado 1.1.3.

La mayoría de los antibióticos utilizados en el tratamiento de *Pseudomonas aeruginosa* atraviesan la pared celular para alcanzar sus dianas, por ejemplo los aminoglucósidos como gentamicina, inhiben la síntesis de proteínas por medio de la unión a la subunidad 30S del ribosoma; las quinolonas se unen a la subunidad A de la ADN girasa; y los β -lactámicos inhiben el ensamblaje del peptidoglicano.

La resistencia innata de *Pseudomonas aeruginosa* a todas las clases de antibióticos ha sido generalmente atribuida a la expulsión activa de antibióticos. La entrada de moléculas hidrofílicas de pequeño tamaño, como los antibióticos β -lactámicos, está restringida a unas estructuras de la membrana externa, llamadas porinas. En *Pseudomonas aeruginosa*, la porina más abundante en la membrana externa es OprF, que forma grandes poros en la membrana (Brinkman FSL et al 2000; Benz & Hancock RE 1981; Livermore DM 1995).

Esta porina permite la difusión de partículas iónicas y pequeños nutrientes polares, es esencial para el crecimiento microaeróbico de *Pseudomonas aeruginosa* (Hogardt M & Heesemann J 2010), contribuye a la formación de biofilms (Hasset DJ et al 2002) y está considerada como sensor y modulador del sistema quorum sensing para potenciar la virulencia bacteriana (Fito-Boncompagni L et al 2011).

El fracaso terapéutico es debido a una combinación de la permeabilidad de la membrana externa y la eficiente eliminación de las moléculas de antibiótico que penetran por la acción de las bombas de flujo.

1.3.2 Resistencia adquirida

Una característica importante de *Pseudomonas aeruginosa* es que además de su resistencia intrínseca, pueden presentar mutaciones que conducen al desarrollo de resistencia. Las mutaciones en genes cromosómicos y la adquisición de genes de resistencia (como aquellos que codifican β -lactamasas (Gupta V 2008; Zhao & Hu 2010) y enzimas modificantes de aminoglucósidos (Poole K 2005; Ramirez & Tolmasky 2010) vía transferencia horizontal), son los principales mecanismos que conducen al desarrollo de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa* (Lister PD et al 2009; Livermore DM 2002; Poole K 2011; Strateva & Yordanov 2009).

1.3.2.1 Mutaciones en genes cromosómicos

- Las mutaciones que afectan a las topoisomerasas II (genes *gyrA* y *gyrB*) y IV (genes *parC* y *parE*), confieren resistencia a las fluoroquinolonas más fácilmente en *Pseudomonas aeruginosa* que en enterobacterias; esto es debido a que una sola mutación en *Pseudomonas* (debido a su elevado nivel de resistencia intrínseca) le confiere resistencia a este grupo de antibióticos, mientras que en enterobacterias son necesarias dos o más mutaciones para que adquieran resistencia a dichos antibióticos (Jalal S & Wretlind B. 1998). Estas enzimas son responsables de la introducción y/o eliminación de superenrollamientos, y además juegan un papel esencial en la replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN (Drlica & Zhao 1997).

En infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* del tracto urinario y heridas (Jalal S & Wretlind B. 1998), las mutaciones principales son las que afectan a las topoisomerasas II y IV; a diferencia de los aislados resistentes de enfermos de FQ donde los sistemas de flujo cobran mayor protagonismo (Jalal S et al 2000). También en ocasiones, las bombas de expulsión de antibióticos en combinación con girasas y topoisomerasas, conducen a resistencia de alto nivel (Poole K. 2011)

- Las mutaciones en el sistema de regulación de AmpC constituyen el mecanismo más importante de resistencia a β -lactámicos en *Pseudomonas aeruginosa* y conducen a distintos grados de desrepresión de la producción de *ampC*, reduciendo la sensibilidad a cefalosporinas de amplio espectro como ceftazidima (Juan C et al 2006; Queenan AM et al 2010; Moya B et al 2009) y penicilinas, como ticarcilina (Cavallo JD et al 2007; Dubois V et al 2008).

Los carbapenémicos como el imipenem, son excelentes inductores de *ampC*, su rápida actividad bactericida y estabilidad frente a la hidrólisis, los hace efectivos frente AmpC en *Pseudomonas aeruginosa* (Jones RN 1998) aunque la desrepresión de *ampC* parece contribuir a la resistencia a carbapenémicos junto con otros mecanismos de resistencia como puede ser la pérdida de porina OprD (como veremos más adelante). La producción de variantes AmpC con mejor actividad frente a ceftazidima, cefepime, y carbapenémicos (incluyendo imipenem), primero descritas en *Enterobacteriaceae* y referidas como AmpC de espectro extendido (ESAC) (Nordmann P & Mammeri H 2007), han sido descritas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* (Rodríguez-Martínez JM et al 2009) y también, parecen contribuir a la resistencia a carbapenémicos junto con la pérdida de OprD (Rodríguez-Martínez JM et al 2009).

La actividad de las penicilinas anti-pseudomónicas, las cefalosporinas y los monobactámicos sobre *Pseudomonas aeruginosa* se basa en que, aunque estos antibióticos son hidrolizados por AmpC, a la vez son débiles inductores de ella (Livermore DM & Brown DF 2001).

Sin embargo, durante el tratamiento con este tipo de antibióticos frecuentemente se seleccionan los mutantes con hiperproducción constitutiva de AmpC (mutantes desreprimidos), conduciendo al fracaso terapéutico (Juan C, et al 2005; Livermore DM 1987).

Este fenómeno constituye el mecanismo más importante de resistencia a β -lactámicos por parte de *Pseudomonas* y será tratado con mayor profundidad a lo largo de esta introducción.

- Los sistemas de expulsión activa de antibióticos, como hemos visto anteriormente, son mecanismos capaces de extraer antibióticos y otras sustancias de manera eficiente, y generar resistencia a antibióticos. En *Pseudomonas aeruginosa* los miembros de la familia RND parecen ser los principales contribuyentes a la resistencia (Poole K 2011).

En esta bacteria existen 12 bombas de expulsión de tipo RND, tres de ellas: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, y MexXY-OprM se ha demostrado que proporcionan resistencia a β -lactámicos (Poole K 2011). El sistema de expulsión MexAB-OprM, posee una expresión constitutiva, sin embargo el incremento en la resistencia es mucho más drástico tras mutaciones en sus genes reguladores; esta bomba de expulsión afecta a la sensibilidad de fluoroquinolonas, penicilinas, cefalosporinas, meropenem (aunque no imipenem) (Poole K 2001; Masuda N et al 2000), y también expulsa triclosán, solventes orgánicos y detergentes (Poole K 2001), una homoserín lactona autoinductora del sistema quorum sensing (C12-HSL) (Evans K et al 1998; Pearson JP et al 1999) y ciertos determinantes de virulencia (Hirakata Y et al 2002). La expresión del sistema MexCD-OprJ afecta a antibióticos β -lactámicos con una preferencia sobre las cefalosporinas de 4ª generación como cefepime al igual que ocurre con la hiperexpresión del sistema MexXY-OprM (Hocquet D et al 2006; Peña C et al 2009).

- Algunas mutaciones afectan a la permeabilidad de la membrana externa, normalmente, asociadas a una menor expresión, o pérdida total del número de porinas. *Pseudomonas aeruginosa* produce diferentes porinas, siendo *OprF* la porina mayoritaria, presente en todas las cepas. La reducción en la expresión de estas porinas, muestran un ligero efecto sobre las CMI's de β -lactámicos y fluoroquinolonas (Woodruff WA & Hancock RE 1988), y no es una de las principales causas de la resistencia a los antibióticos.

En un estudio de Piddock (*Piddock LJV et al 1993*) se asoció la pérdida de OprF de una cepa clínica tratada con fluoroquinolonas, con un aumento en la CMI para ciprofloxacino, carbenicilina y ceftazidima; aunque los estudios que asocian modificaciones en la expresión de OprF con resistencia antimicrobiana han sido de lo más controvertidos.

Entre otras porinas destaca OprD, es una porina permeable a las carbapenemasas pero no a otros β -lactámicos (*Studemeister AE & Quinn JP 1988*), con papel en la absorción de aminoácidos cargados positivamente, como la lisina. La pérdida de esta porina produce resistencia a imipenem y sensibilidad reducida a meropenem.

1.3.2.2 Adquisición de determinantes de resistencia por transferencia horizontal

Existen enzimas cuyos genes se pueden transmitir horizontalmente entre cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, o incluso entre cepas de esta y otras especies bacterianas. Entre estas enzimas podemos destacar las β -lactamasas y las enzimas modificantes de aminoglucósidos.

- Las β -lactamasas adquiridas por vía horizontal más habituales detectadas en *Pseudomonas aeruginosa* son PSE-1 y PSE-2 e hidrolizan preferentemente a las penicilinas. También es importante destacar las β -lactamasas de espectro extendido (BLEES) (como PER-1) y las carbapenemasas de clase A (GES y KPC), MBL (como IMP y VIM) y clase D (OXA) por el amplio abanico de β -lactámicos que se ven afectados, su variedad y su capacidad de dispersión.

La frecuencia creciente de cepas clínicas portadoras de carbapenemasas, reducen de manera considerable las opciones terapéuticas para atacar las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* y aumenta con ello la expansión de cepas multirresistentes y de los mecanismos transferibles que implican (Juan C & Oliver A 2010)

PER-1 es una β -lactamasa que confiere resistencia de alto nivel a ceftazidima, manteniendo su sensibilidad al ácido clavulánico y con pequeño efecto in vitro sobre piperacilina, siendo estables a los carbapenémicos (Nordmann P et al 1993). La infección por *Pseudomonas aeruginosa* portadora de este tipo de β -lactamasa está asociada con un elevado porcentaje en el fracaso terapéutico (Vahaboglu H et al 2001).

Las carbapenemasas tipo GES fueron un grupo inicialmente definido como BLEE; de todas las variantes descritas, solo 4 de ellas tienen actividad carbapenemasa (GES-2, -4, -5 y -6). El hallazgo de GES no es tan frecuente como en el caso de otras carbapenemasas, aunque sí han sido aisladas en prácticamente todo el mundo. Como hemos comentado, la diseminación de estos determinantes puede originar situaciones epidémicas de cepas multirresistentes, un ejemplo de ello fue el reciente brote epidémico que tuvo lugar en el Hospital 12 de octubre de Madrid; donde una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* productora de GES-5 y resistente a todos los antibióticos excepto colistina, fue diseminada en 24 pacientes del hospital en el periodo 2007-2008 (Viedma E et al 2009).

Las enzimas tipo IMP y VIM son metalo- β -lactamasas que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, pero no el aztreonam, y son inhibidas por EDTA (*Livermore DM & Woodford N 2000*). Los genes de las β -lactamasas VIM, IMP y OXAs de espectro extendido normalmente se encuentran en casetes dentro de integrones (sistemas que reúnen diversos genes adquiridos y que está controlado por un promotor común), lo que facilita los procesos de desarrollo de multirresistencia.

Finalmente, las β -lactamasas tipo OXA's de espectro extendido, confieren resistencia a ceftazidima, cefepime, cefpiroma, monobactámicos y penicilinas, no a los carbapenémicos, y muestran una débil inhibición por clavulánico (*Bradford PA 2001*). La gran mayoría derivan de OXA-2 y OXA-10 (*Nordmann P & Guibert M 1998*).

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

Las enzimas modificantes de aminoglucósidos más frecuentes en los aislados de *Pseudomonas aeruginosa* son AAC (6')-II y ANT(2'')-I; otras enzimas presentes, aunque menos frecuentes, son por ejemplo AAC(3)-II y APH(3'). La distribución de los distintos tipos de enzimas modificantes de aminoglucósidos es muy diferente según la región geográfica y sus patrones de administración de aminoglucósidos (Miller GH et al 1997).

Otro tipo de enzimas modificadoras son las metilasas ribosomales 16S (Doi Y & Arakawa Y 2007), se han descrito en otras bacterias además de *Pseudomonas aeruginosa*, como por ejemplo en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, así como también en no fermentadores. Estas enzimas han emergido como un potente mecanismo de resistencia, confiriendo resistencia de alto nivel a la gran mayoría de los aminoglucósidos utilizados, mediante la alteración de la unión del antibiótico a la molécula diana.

En el año 2003, se describió en Japón el primer caso de metilasas ribosomales en un aislado de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a aminoglucósidos (Yokoyama K et al 2003) que poseía este mecanismo y desde entonces han surgido diferentes publicaciones que indican el crecimiento de este mecanismo de resistencia en diferentes especies. Los organismos que producen esta metilasa son por lo general multiresistentes ya que además suelen producir β -lactamasas de amplio espectro o metalo- β -lactamasas (Doi Y & Arakawa Y 2007; van Hoek AHAM et al 2011).

1.3.3 Mecanismos cromosómicos de resistencia a β -lactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*.

Además de su resistencia intrínseca, *Pseudomonas aeruginosa*, como ya hemos comentado en anteriores ocasiones, posee una gran capacidad para incrementar esta resistencia a prácticamente todos los antibióticos disponibles, a través de mutaciones en genes implicados en la resistencia.

Entre estos mecanismos de resistencia mutacionales podemos destacar la inactivación de la porina OprD, la frecuente hiperexpresión de alguna de las múltiples bombas de expulsión y la hiperexpresión de la β -lactamasa cromosómica inducible AmpC.

1.3.3.1 OprD

El mecanismo más común de resistencia a los carbapenémicos en *Pseudomonas aeruginosa* es la pérdida o alteración de la porina OprD (Wang J et al 2010). Como ya se ha comentado en apartados anteriores, OprD es una porina permeable a las carbapenemasas pero no a otros β -lactámicos, con un papel en la absorción de los aminoácidos cargados positivamente, como la lisina. La pérdida de esta porina produce resistencia a imipenem y sensibilidad reducida a meropenem.

Para que *Pseudomonas aeruginosa* adquiera resistencia a meropenem necesita combinar la pérdida de OprD con otro(s) mecanismo(s), como hiperexpresión de MexAB-OprM o hiperproducción de AmpC (Gutierrez O et al 2007; Livermore DM 1992; Tomas M et al 2010; Wang J et al 2010). La aparición simultánea de dos mutaciones es biológica y matemáticamente improbable, ya que una mutación responsable de adquirir una determinada resistencia ocurre en 1 de cada 10^7 - 10^9 células; sin embargo, sí es más probable la aparición secuencial de una segunda mutación en un clon que ya posee alguna mutación.

Esta situación se ve favorecida ya que las infecciones resistentes a un primer antibiótico serán tratadas con un segundo, y así sucesivamente favoreciendo la selección secuencial de mutaciones.

Esta acumulación de mutaciones se ve facilitada en cepas hipermutadoras, muy habituales en pacientes de FQ (Oliver A et al 2000), seleccionando mutantes multirresistentes.

Estudios recientes (Cabot G et al 2010; Riera E et al 2011) demuestran que, la resistencia de los aislados resistentes a imipenem es debida, principalmente, a mutaciones inactivantes de OprD, como se describen en otros trabajos (Gutierrez O et al 2007; Rodríguez-Martínez JM et al 2009); y son cada vez más frecuentes entre aislados de *Pseudomonas aeruginosa* en los hospitales españoles. Sin embargo, las alteraciones en OprD no siempre explican los niveles de sensibilidad/resistencia a los carbapenémicos; ya que también se han encontrado mutaciones inactivantes en OprD en aislados sensibles a imipenem y meropenem (Ocampo A et al 2012)

1.3.3.2 Bombas de expulsión

En *Pseudomonas aeruginosa* la presencia de bombas de expulsión de antibióticos contribuyen de manera importante a esta capacidad para desarrollar y adquirir resistencia. Entre ellas destacan MexAB-OprM y MexXY-OprM (que contribuyen a la resistencia intrínseca y adquirida) y MexCD-OprJ y MexEF-OprN cuya expresión sólo se muestra tras mutaciones en los genes responsables (*nfxB* y *mexT*). Las características principales de estas bombas se detallan a continuación en la Tabla 1.5.

La prevalencia e impacto de las bombas de expulsión de antibióticos, así como la hiperexpresión de AmpC sobre la resistencia, ha sido evaluada en un estudio multicéntrico de Cabot G y colaboradores (Cabot G et al 2010) en una colección de 190 aislados de *Pseudomonas aeruginosa*, procedentes de

hemocultivos. De estos, un 39% muestran hiperexpresión de al menos uno de los principales mecanismos de resistencia: un 24% hiperexpresaban *ampC*, alrededor de un 13% hiperexpresaban *mexB* o *mexY*, tan sólo un 4 y 2% mostraron hiperexpresión de *mexF* y *mexD*, respectivamente. Estos datos nos revelan que es frecuente la hiperexpresión de los genes *mexB* y *mexY* y su presencia simultánea en aislados de *Pseudomonas aeruginosa*.

En cuanto a los aislados resistentes a imipenem, estudiados en este trabajo (Cabot G et al 2010) se observó que era debido principalmente a mutaciones inactivantes en la porina OprD, como describen anteriores estudios (Gutierrez O et al 2007; Rodríguez-Martínez JM et al 2009); por otra parte, los aislados resistentes a meropenem, guardaban una cierta relación con la hiperexpresión de *ampC* y *mexB*, consistente con estudios previos (Giske C et al 2008; Gutiérrez O et al 2007; Quale JS et al 2006).

Finalmente, tan solo el 1% de los aislados eran productores de MBL, con una prevalencia más baja que en otros lugares como América del Sur (Cabot G et al 2010) o determinadas ciudades europeas (Cabot G et al 2010). Demostrando que, tanto la hiperexpresión de *ampC*, las bombas de expulsión y las mutaciones inactivantes de OprD son frecuentes entre aislados de *Pseudomonas aeruginosa* en los hospitales españoles, mientras que la producción de metalo- β -lactamasas, aunque se ha incrementado en los últimos años, es todavía poco frecuente.

Tabla 1.5. Características de las principales bombas de expulsión de *Pseudomonas aeruginosa*.

Bomba	Gen(es) regulador(es)	Expresión	Espectro
MexAB-OprM	<i>mexR(nalB)</i> <i>nalC</i> <i>nalD</i>	Constitutiva; su expresión se incrementa aún más por mutaciones en los reguladores (1)	Fluoroquinolonas, β-lactámicos, como penicilinas y cefalosporinas, meropenem, tetraciclina, macrólidos, cloranfenicol, novobiocina, trimetoprim y sulfonamidas.
MexCD-OprJ	<i>nfxB</i>	Expresión basal muy reducida. Hiperexpresión en mutantes <i>nfxB</i> . Hipersensibilidad a determinados antibióticos, debido a una relación inversa entre esta bomba y la expresión del sistema MexAB(2,3)	Fluoroquinolonas, macrólidos, cloranfenicol, novobiocina, tetraciclina, trimetoprim y a algunos β-lactámicos (cefepime); hipersensibilidad a β-lactámicos como carbenicilina y aminoglucósidos.
MexXY-OprM	<i>mexZ (amrR)</i>	Expresión inducible (aminoglucósidos). Hiperexpresión en mutantes <i>mexZ</i> (1)	Aminoglucósidos, tetraciclina, eritromicina, fluoroquinolonas y ciertos β-lactámicos (cefepime)
MexEF-OprN	<i>mexT</i> <i>mexS</i>	Expresión basal muy reducida. Hiperexpresión en mutantes <i>nfxC</i> . Hipersensibilidad a determinados antibióticos, debido a una relación inversa entre esta bomba y la expresión del sistema MexAB(2,3).	Fluoroquinolonas, cloranfenicol, trimetoprim, triclosán. Imipenem (reducción de expresión de OprD en mutantes <i>nfxB</i>); e hipersensibilidad a β-lactámicos y aminoglucósidos.
MexJK-OprM	<i>mexL</i>	Expresión basal reducida. Hiperexpresión en mutantes <i>mexL</i> (4)	Tetraciclina y eritromicina

(1) Poole K 2011 (2) Mulet X et al 2009 (3) Kôhler T et al 2007 (4) Chuanchuen R et al 2002

1.3.3.3 Hiperproducción de AmpC

Pseudomonas aeruginosa, como se ha comentado en apartados anteriores, tiene una cefalosporinasa inducible, similar al AmpC cromosómico encontrado en muchos miembros de enterobacterias (Lister PD et al 2009). En condiciones normales, *Pseudomonas aeruginosa* produce bajos niveles de AmpC y es sensible a penicilinas y cefalosporinas antipseudomónicas y carbapenémicos; sin embargo, cuando estos niveles de *ampC* se incrementan, se desarrolla una resistencia a todos los β -lactámicos, excepto a los carbapenémicos.

Mientras la resistencia a gran parte de los β -lactámicos emerge como resultado de la hiperexpresión de *ampC* (con una prevalencia de alrededor de un 24% (Cabot G et al 2010)); la relación entre la expresión de *ampC* y la sensibilidad a carbapenémicos resulta compleja. Parece ser que la hiperproducción de *ampC* por sí sola no altera la sensibilidad a los carbapenémicos, pero sí puede contribuir a su resistencia si está acompañada de mecanismos de resistencia adicionales, como pueden ser la hiperproducción de bombas, la reducción de la porina OprD, etc (Lister PD et al 2009). Este incremento en la resistencia producido por la hiperexpresión de *ampC*, conduce a un fallo terapéutico.

La hiperproducción de dicha enzima en *Pseudomonas aeruginosa* y algunos miembros de *Enterobacteriaceae* puede ocurrir mediante inducción del gen *ampC* o a través de procesos de desrepresión que conducen a la hiperexpresión constitutiva de alto nivel. La hiperexpresión mediante inducción ocurre durante la exposición a β -lactámicos o inhibidores de β -lactamasas, como por ejemplo cefoxitina, imipenem y clavulánico. Es un proceso reversible, ya que tras la eliminación del agente inductor, desaparece esta hiperproducción.

La modificación de alguna proteína implicada en la vía de inducción o la modificación del promotor de *ampC* pueden conducir a una desrepresión en la expresión de *ampC*, en la que la cefalosporinasa se produce constitutivamente, sin necesidad de un inductor β -lactámico (Lister PD et al 2009) y resulta irreversible. Aunque algunos estudios han identificado mutaciones en *ampR* (Bagge N et al 2002; Juan C et al 2005; Quale J et al 2006), la causa principal de la hiperproducción de *ampC* en *Pseudomonas aeruginosa* es la inactivación de la amidasa *ampD* o del gen *dacB* que codifica para una PBP no esencial (PBP4) o la combinación de ambas (Juan C et al 2006; Moyà B et al 2009, Lister PD et al 2009).

1.4 Reciclaje de la pared celular y regulación de la expresión de AmpC.

La mayoría de las bacterias poseen una pared celular de peptidoglicano, cuya estructura es similar a una malla que envuelve a la membrana con el fin de protegerla del entorno. En las bacterias gram-positivas, la pared celular está formada por una capa gruesa de peptidoglicano que contiene ácido teitóico y lipoteitico; en cambio, las bacterias gram- negativas poseen una fina capa de peptidoglicano y una membrana externa que contiene lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas.

1.4.1 Aspectos generales de la biosíntesis de la pared celular

Los componentes de la pared celular son grandes estructuras formadas por subunidades de polímeros, lo que facilita su síntesis. La síntesis del peptidoglicano y del lipopolisacárido tiene lugar en el exterior de la bacteria, y los precursores prefabricados que formarán la estructura final se ensamblan en el interior. Se transportan a la superficie mediante transportadores moleculares y a continuación, se conectan con la estructura pre-existente.

El peptidoglicano, como hemos comentado anteriormente es una malla rígida que está formada por cadenas lineales de polisacáridos unidos a través de péptidos. Este polisacárido se compone de disacáridos repetidos de N-acetilglucosamina (NAG) y N-acetilmurámico (NAM), al que está unido un tetrapéptido. Este péptido contiene aminoácidos tanto en forma de D-alanina como en forma L-alanina.

El entrecruzamiento con el péptido tiene lugar entre la amina libre del aminoácido de tipo diamino (lisina en el caso de bacterias gram-positivas, y ácido diaminopimérico en el caso de gram-negativas) y la D-alanina situada en la cuarta posición de otra cadena.

En especies de *Staphilococcus aureus* y otras gram-positivas, entre estos aminoácidos se encuentra un puente de pentaglicina, para incrementar la longitud del entrecruzamiento.

Durante la biosíntesis de la pared celular pueden distinguirse cuatro etapas bien diferenciadas que tienen lugar en tres lugares celulares diferentes (Kong KF et al 2010; Van Heijenoort J 2001) (Figura 1.10):

En una primera fase que ocurre en el citoplasma de la célula, los monosacáridos se convierten en ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina (NAG), y se activan mediante trifosfato de uridina (UTP), formando difosfato de uridina-ácido-N-acetilmurámico (UDP-NAM) y difosfato de uridina-ácido-N-acetilglucosamina (UDP-NAG), respectivamente.

A continuación un fosfoenolpiruvato (PEP) se une al UDP-NAG conduciendo a la formación de UDP-NAG-enolpiruvato, al que mediante reacciones enzimáticas se va añadiendo una serie de aminoácidos, dando lugar a la producción del pentapéptido UDP-NAM.

En la segunda etapa, este pentapéptido UDP-NAM se une mediante enlace pirofosfato al transportador molecular bactoprenol (fosfolípido hidrófobo) en la membrana citoplasmática, liberándose monofosfato de uridina (UMP). A continuación, se transfiere a éste la N-acetilglucosamina desde el UDP-NAG, mediante la actuación de una transferasa; generando un enlace $\beta(1-4)$ entre NAG y NAM. Gracias a esta unión con el transportador que es catalizada por una translocasa específica, los precursores intracelulares atraviesan la membrana. Este transportador permite el transporte y ensamblaje de sustancias hidrofílicas (como azúcares), ya que por sí solas no atravesarían la barrera hidrofóbica de la membrana.

En una tercera fase, la molécula de bactoprenol desplaza al exterior de la célula el precursor pentapéptido disacárido, que se une a una cadena polipeptídica mediante la acción de las transglicosilasas. En este proceso se libera el pirofosfato de bactoprenol, regenerándose a fosfato de bactoprenol gracias a una fosfatasa, que elimina el fosfato terminal, para empezar un nuevo ciclo.

Finalmente, las cadenas de péptidos procedentes de cadenas adyacentes, se cruzan entre sí mediante el intercambio de un puente peptídico entre la amina libre de aminoácido situado en la tercera posición del péptido (lisina/ácido diaminopimélico) y la D-alanina que está en la cuarta posición de la otra cadena peptídica, liberándose una D-alanina terminal.

Estas D-ala terminales de los péptidos, no implicadas en el entrecruzamiento, son eliminadas mediante la acción de la D-alanina carboxipeptidasa.

De las reacciones enzimáticas que ocurren durante la biosíntesis de la pared, únicamente la transpeptidasa y la D-alanina carboxipeptidasa son sensibles a antibióticos β -lactámicos y se denominan Proteínas de unión a penicilinas, del inglés “Penicillin Binding Proteins” (PBP)(*Araki Y et al 1966; Kong KF et al 2010*). Las PBPs 1a, 1b, 2 y 3, pertenecen al grupo de las transpeptidasas, esta última (PBP3) es esencial para el proceso de septación, permitiendo la separación de las nuevas células, mientras que PBPs 4,5 y 6, pertenecen a las D-alanina carboxipeptidasas.

La acción de los β -lactámicos sobre las PBPs tiene lugar mediante un grupo hidroxilo con la formación de un enlace covalente al centro activo de estas, formando un complejo estable que inhibe la actividad de las PBPs (*Kong et al 2010*); esta unión del antibiótico a las PBPs inactiva también a los inhibidores endógenos de las autolisinas. Inhibiéndose la transpeptidación, desestabilizándose la pared celular y produciendo la lisis de la bacteria por acción de las autolisinas bacterianas, que en condiciones normales sólo rompen ciertas uniones del peptidoglicano para permitir el crecimiento bacteriano.

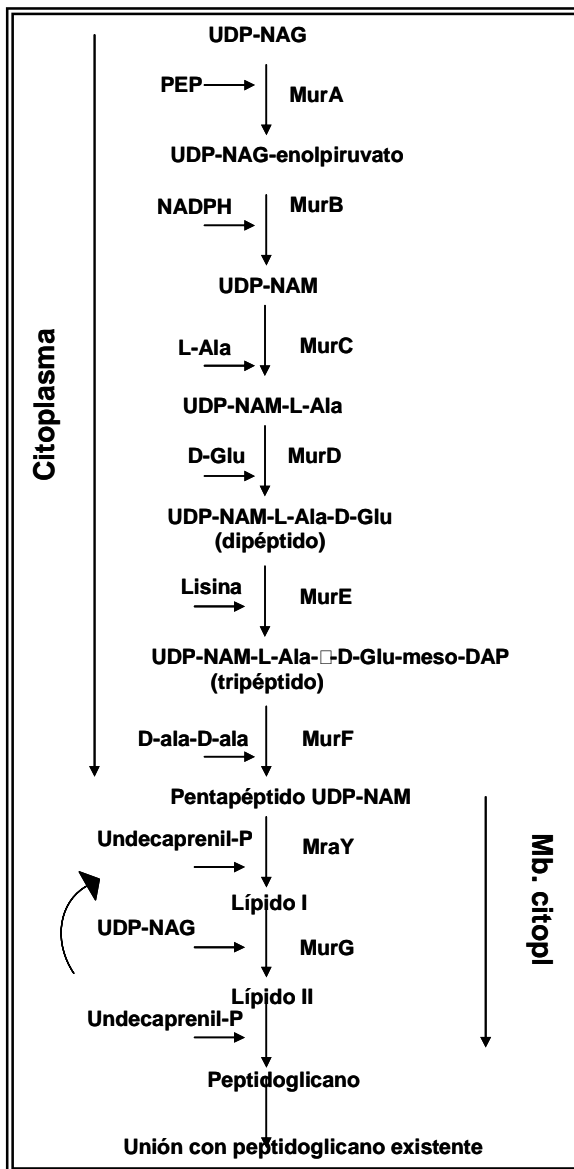


Figura 1.10. Esquema de la biosíntesis del peptidoglicano: una vez formado el pentapéptido UDP-NAM, se une a la molécula de bactoprenol, encargada de desplazarlo al interior celular, para que tenga lugar la formación del peptidoglicano. Ya en el interior celular UDP-NAM se une a UDP-NAG, formando el precursor pentapéptido disacárido. Este peptidoglicano creado, se dirige al exterior de la membrana donde se unirá con cadenas ya existentes que forman el peptidoglicano.

1.4.2 Reciclaje de la pared celular

Este proceso fue inicialmente descubierto por *Goodell & Schwarz* en 1985, a pesar de ya haber evidencias previas a este trabajo en bacilos gram-positivos (*Bacillus subtilis* y *Lactobacillus acidophilus*) y en organismos gram-negativos (*Neisseria gonorrhoeae*). En el reciclaje del peptidoglicano actúan una serie de enzimas que han sido identificadas en *Escherichia coli* (*ParK J et al 2008*).

Estas enzimas participantes en el reciclaje de la pared, tienen la función de recuperar los productos resultantes de la degradación del peptidoglicano y restaurarlos para sintetizar de nuevo más peptidoglicano (Figura 1.10).

El reciclaje se inicia por medio de las transglicosilasas líticas y endopeptidasas, que producen monómeros de anhidromuropéptidos. Todas estas enzimas están activas durante el crecimiento y pueden causar la lisis celular, con lo que están controladas tanto, durante el crecimiento de la célula como en la fase estacionaria. En *Escherichia coli*, se han identificado tres clases de enzimas que se unen al peptidoglicano:

Clase 1: incluye el grupo de las endopeptidasas como son PBP4, PBP7 y MepA, que rompe las uniones entre D-alanina de una cadena de glicano y el ácido diaminopimérico (DAP) de la cadena vecina.

Clase 2: se encuentran las amidasas tipo *AmiA*, *AmiB*, *AmiC* y *AmiD*. Las tres primeras están presentes en el periplasma y participan en la separación celular, rompiendo las uniones entre N-acetilmurámico y el péptido original del peptidoglicano; mientras que *AmiD* está presente en la membrana externa. Todas ellas liberan tri-, tetra- y pentapéptidos del periplasma hacia el exterior celular.

Clase 3: incluye las transglicosilasas líticas y las D-alanina carboxipeptidasas. La gran mayoría de las transglicosilasas líticas son exoenzimas que rompen la cadena de glicano entre el carbono 1 de N-acetilmurámico y el carbono 4 de la N-acetilglucosamina. La principal transglicosilasa lítica responsable del reciclaje es *SltY*, proteína soluble localizada en el periplasma.

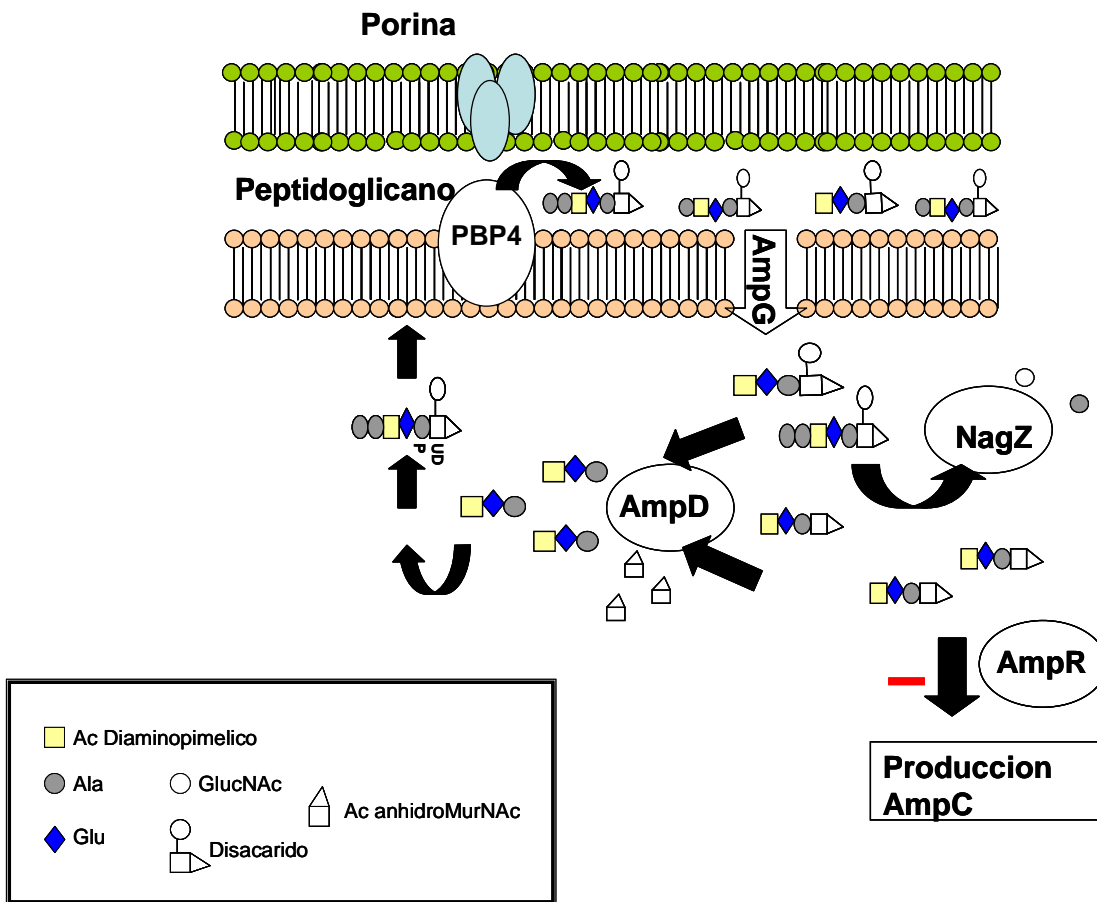


Figura 1.11 Esquema reciclaje del peptidoglicano

En *Escherichia coli* y la mayoría de bacterias gram-negativas, sólo liberan alrededor de un 5-8% de fragmentos de peptidoglicano por generación al medio celular. Este porcentaje tan reducido es consecuencia de un proceso de reciclaje muy eficiente (Chahboune A et al 2005).

Durante crecimiento normal, la síntesis de la pared celular necesita la adición y liberación de componentes de la pared, el producto mayoritario del reciclaje es un tetrapéptido o anhidromuropéptido llamado N-acetilglucosamina-1,6-anhidro-N-acetilmurámico. Su paso del periplasma al citoplasma es llevado a cabo por la permeasa *ampG*. Una vez en el citoplasma, estos anhidromuropéptidos son procesados por la acción de la N-acetilglucosaminidasa: *nagZ*, que elimina los azúcares del péptidos, produciendo 1,6-anhidromuropéptidos.

Estos anhidromuropéptidos se modifican gracias a la amidasa *ampD* que los transforma en péptidos libres y ácido anhidromurámico, y los devuelve a la vía de síntesis de la pared, donde se les añade uridín fosfato (UDP).

1.4.3 Inducción de AmpC

En la mayoría de las bacterias gram-negativas, la presencia de penicilinas u otros β -lactámicos en el exterior celular, induce la síntesis de la β -lactamasa cromosómica AmpC. Algunas de ellas, como el caso de *Escherichia coli* y *Shigella spp.*, esta β -lactamasa no es inducible debido a la falta del regulador.

Este proceso de regulación de *ampC* está íntimamente ligado al reciclaje del peptidoglicano (*Ying Zhang et al 2010*) y su inducción está controlada por el regulador transcripcional *ampR*. Este regulador pertenece a la familia de reguladores LysR y puede actuar de dos maneras, como represor o como activador.

Como hemos comentado en el apartado anterior, en condiciones normales, los productos resultantes de la degradación del peptidoglicano son modificados y procesados por diferentes enzimas en el citoplasma de la célula, hasta obtener péptidos libres y ácido anhidromurámico, que son devueltos a la vía de síntesis de la pared, donde se les añade uridín fosfato. Estos UDP-pentapéptidos se unen al regulador transcripcional *ampR* y lo mantienen en una conformación que evita la activación del promotor de *ampC*, manteniendo niveles bajos de expresión de *ampC* (figura 1.11). Por tanto, en ausencia de inductor β -lactámico, *AmpR* se une a los pentapéptidos que se encuentran en el citoplasma (UDP-pentapéptidos), actuando como represor.

En presencia de antibiótico β -lactámico inductor y debido a la acumulación de anhidromurooligopéptidos (penta-, tetra-, y tripéptidos) en el citoplasma, estos oligopéptidos desplazan a los UDP-pentapéptidos, provocando un cambio conformacional en *ampR*, su consiguiente activación y por tanto la transcripción de *ampC* (Chahboune A et al 2005; Moya B et al 2009) (Figura 1.12).

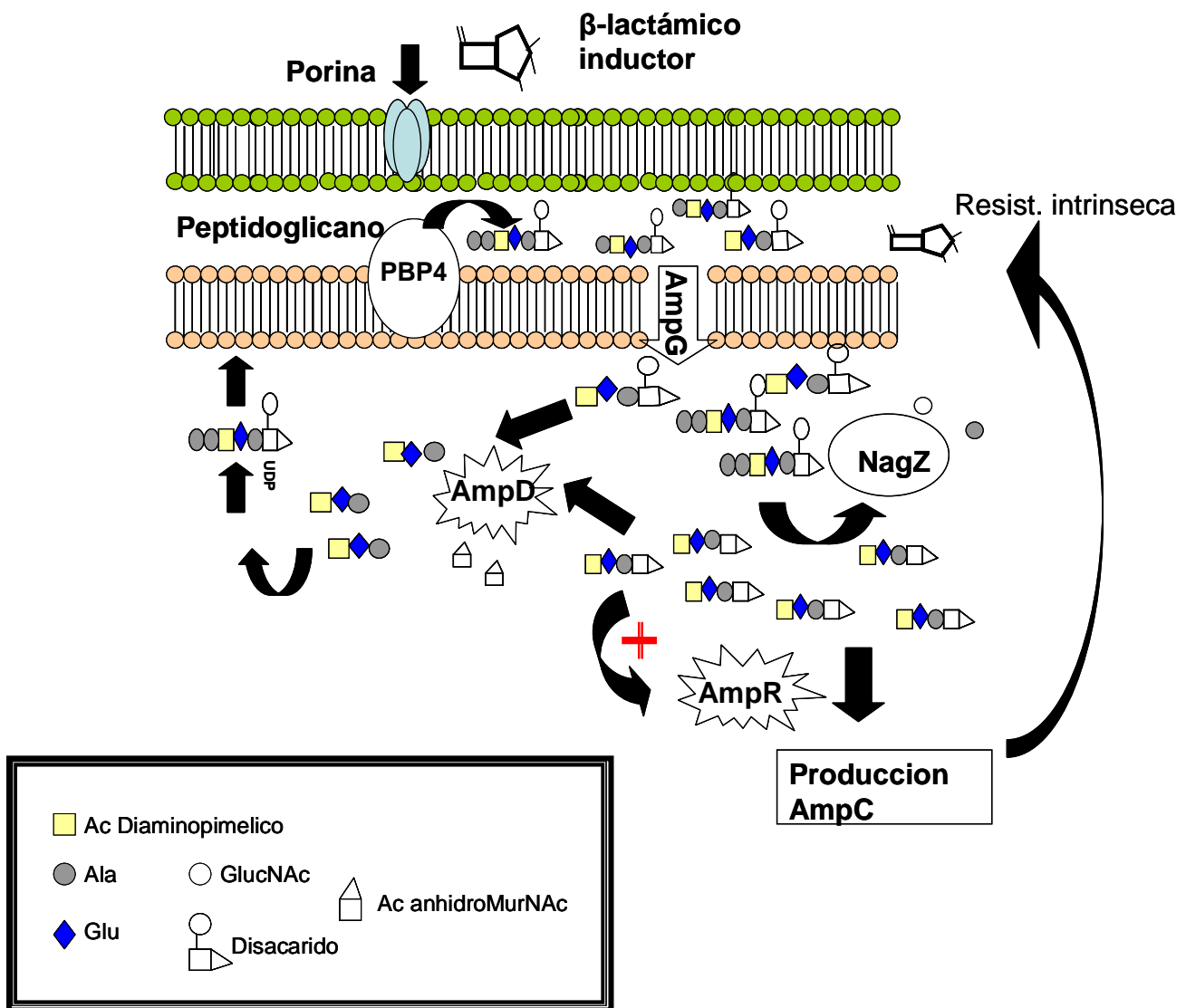


Figura 1.12 Esquema inducción de *ampC*

Como se ha comentado anteriormente, otra manera de inducir la expresión de *ampC* es mediante la desrepresión; y esta puede tener lugar tras la modificación de alguna proteína implicada en la vía de inducción o bien del promotor de *ampC*. En los siguientes apartados, se describen, cada uno de los componentes que participan en la vía de regulación de *ampC*, su función y el efecto descrito debido a mutaciones en estos.

1.4.3.1 AmpG

Inicialmente fue identificada por *Korfmann & Sanders* en 1989 en *Enterobacter cloacae*, como requerimiento necesario para la inducción de *ampC*. Es una permeasa específica para el transporte de N-acetilglucosamina-1,6-anhidro-N-acetilmurámico, que como hemos comentado anteriormente, actúan como moléculas señal en el proceso de inducción de *ampC* (*Chahboune A et al 2005, Zhang Y et al 2010*). Su actividad es necesaria para la entrada de los monómeros de peptidoglicano al citoplasma, donde van a ser reciclados y de nuevo reincorporados a la vía de síntesis de la pared celular (*Chahboune A et al 2005; Zhang Y et al 2010*).

En *Escherichia coli*, *ampG* codifica una proteína de 491 aminoácidos y de 53KDa, que contiene 10 segmentos transmembrana hidrofóbicos, delimitados por seis dominios hidrofílicos citoplasmáticos, incluyendo los extremos amino y carboxiterminal, y cinco dominios periplásmicos hidrofílicos (*Chahboune A et al 2005*) (figura 1.13).

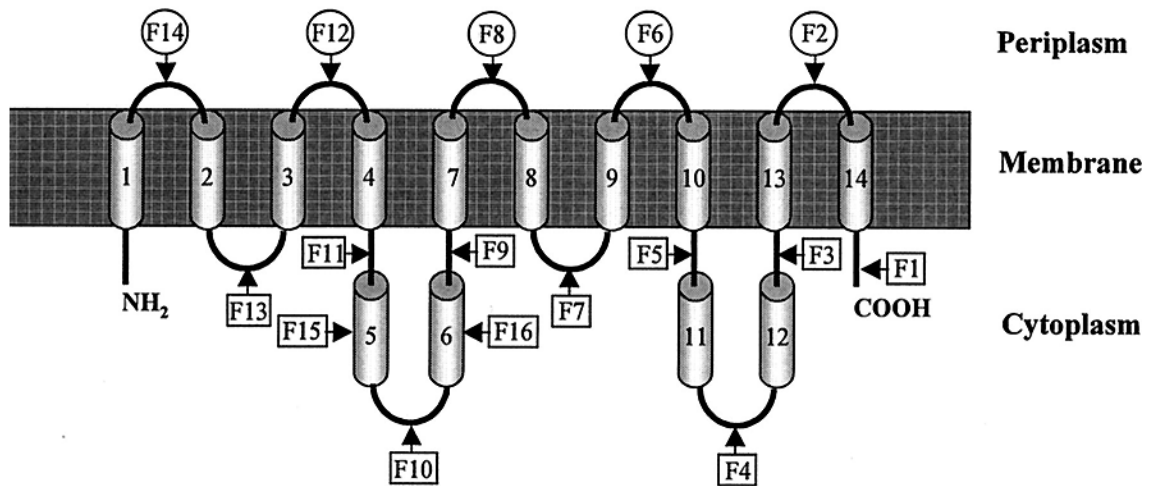


Figura 1.13. Modelo de *ampG* de *Escherichia coli* propuesto por Aicha Chahboune y colaboradores.

Pseudomonas aeruginosa tiene dos homólogos de *ampG* (*ampG* y *ampGh1* también llamado *ampP*), que comparten una identidad en su secuencia aminoacídica del 45 y 41%, respectivamente, al *ampG* de *Escherichia coli*; de los cuales, sólo *ampG* codifica para una proteína funcional (Kong KF et al 2010; Zhang Y et al 2010).

La inactivación de *ampG* por delección o mutación conduce a una expresión de *ampC* no inducible y de bajo nivel (Chahboune A et al 2005; Zhang Y et al 2010), demostrando claramente el enlace entre el reciclaje del peptidoglicano y la inducción de la β -lactamasa *ampC* (Chahboune A et al 2005).

Se ha demostrado la acción inhibitoria de un inhibidor de protones llamado CCP (del inglés "carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone") frente a *ampG* en esta bacteria. La inhibición de la función de *ampG* conduce a un incremento en la sensibilidad a β -lactámicos debido a la supresión de la expresión de *ampC* (Zhang Y et al 2010).

Debido al papel esencial que desempeña *ampG* sobre la expresión de *ampC*, en el segundo capítulo de esta tesis se evalúa su inhibición en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con diferentes patrones de resistencia; como una posible estrategia efectiva para potenciar la eficacia de antibióticos β -lactámicos.

1.4.3.2 NagZ

Fue descrita por primera vez por Yem & Wu en *Escherichia coli* en 1976, está altamente conservada en la mayoría de las bacterias gram-negativas y cataliza la formación de 1,6-anhidromuropéptidos en el citoplasma (Asgarali A et al 2009; Cheng Q et al 2000); en la figura 1.13 se muestra la estructura tridimensional de esta proteína.

Los fragmentos resultantes del reciclaje del peptidoglicano una vez transportados al citoplasma gracias a la permeasa AmpG, son procesados por la glucósido hidrolasa, más conocida como β -N-acetilglucosaminidasa codificada por *nagZ* (Asgarali A et al 2009; Vötsch W et al 2000). El resultado de esta hidrólisis es la acumulación de glucósidos (NAG) y de 1,6-anhidromuropéptidos (tri-, tetra-, y pentapéptidos), a los que se les añade uridín fosfato para dar lugar a UDP-muropéptidos, precursores de peptidoglicano, que son de nuevo enviados al periplasma, para reincorporarse a la pared celular.

Como se ha comentado anteriormente, la acumulación de estos 1,6-anhidromuropéptidos provocaría el desplazamiento de los UDP-pentapéptidos, unidos a *ampR*, conduciendo a la activación de este regulador transcripcional y con ello la producción de *ampC*. De manera contraria, dado que *nagZ* cataliza la formación de esta molécula “inductora” (1,6-anhidromuropéptidos), la inhibición de su actividad reprimiría la expresión de *ampC* (Asgarali A et al 2009; Vötsch W et al 2000).

Las propiedades bioquímicas de NagZ demuestran la existencia de algunas características propias, como por ejemplo la inhibición de dicha enzima tras la adición de varios aminoazúcares.

El conocimiento de esta característica, permite el diseño de inhibidores específicos (Votsch W et al 2000) (Figura 1.14B). Stubbs y colaboradores (Stubbs KA et al 2007) demostraron que un inhibidor molecular de *nagZ* (EtBuPUG) en *Escherichia coli* (con el operón *ampR-ampC* de *Citrobacter freundii*) podían reprimir la inducción de *ampC*.

Dado que *nagZ* actúa como enzima necesaria para la formación de 1,6 anhidromuropéptidos, su inhibición puede conducir a una estrategia para reprimir la expresión de *ampC* durante tratamiento con antibióticos β -lactámicos. En el segundo capítulo de esta tesis abordamos el estudio del bloqueo de la función de *nagZ* mediante inactivación genética y mediante el uso de un inhibidor molecular (PUGNac) en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con diferentes patrones de resistencia.

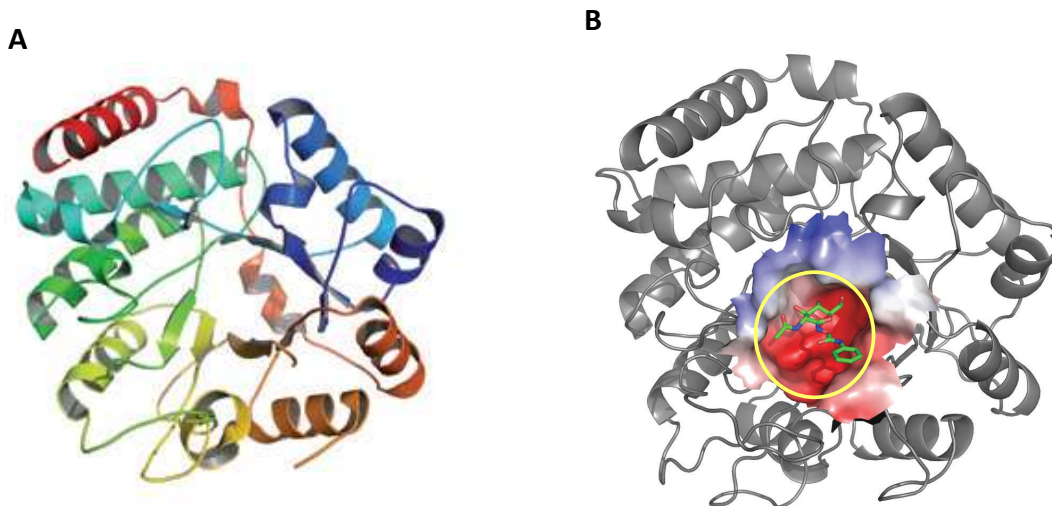


Figura 1.14. A. Estructura tridimensional de NagZ *Vibrio cholerae*. B Estructura tridimensional de NagZ de *Vibrio cholerae* en la que se encuentra unido un inhibidor molecular, PUGNac (Mark BL et al 2011).

1.4.3.3 AmpD

La mayoría de las enterobacterias poseen esta enzima citoplasmática, se trata de una N-acetil-muramil-L-alanina amidasa. Esta enzima favorece el reciclaje del peptidoglicano, ya que rompe los muropéptidos para que puedan ser reciclados y entrar de nuevo en la vía de síntesis de la pared. Al romper estos muropéptidos reduce las concentraciones de estos en el citoplasma y previene la hiperexpresión de AmpC; con lo que su mutación conduce a un incremento de muropéptidos en el citoplasma, favoreciendo su unión a AmpR. Esta unión se debe a que como ya se ha comentado en anteriores ocasiones, los muropéptidos que se encuentran a una concentración más elevada que los UDP-pentapéptidos, desplazan a estos últimos, provocando un cambio conformacional en *ampR* que favorece la unión al promotor de *ampC*. Con el consiguiente incremento de la expresión de *ampC* (Jacoby GA 2009; Lister PD et al 2009).

La completa desrepresión de *ampC* en *Pseudomonas aeruginosa* no ocurre en un único paso. Campbell en 1997 (Campbell JIA et al 1997) demostró tres fenotipos de expresión de *ampC*: fenotipo salvaje que muestra un nivel de expresión bajo e inducible; nivel de expresión moderado e inducible, fenotipo parcialmente desreprimido, alto nivel de expresión y constitutivo, fenotipo total de desrepresión. Juan C y colaboradores en 2006, describió la presencia, en *Pseudomonas aeruginosa*, de dos homólogos de AmpD (AmpDh2 y AmpDh3). La delección por separado de *ampDh2* o *ampDh3*, o de ambos homólogos no altera el fenotipo salvaje, manteniendo el nivel bajo de expresión y su inducibilidad. El fenotipo parcialmente desreprimido se consigue con la delección de *ampD* y de uno de los homólogos (*ampDh2* o *ampDh3*) y finalmente al deleccionar los tres homólogos, se desreprime totalmente *ampC*; confirmando que para obtener la completa desrepresión de *ampC* es necesaria la inactivación secuencial de los tres genes.

En este mismo estudio, se analizaron 10 aislados clínicos hiperproductores de *ampC*, de los cuales 4 de ellos no mostraban ninguna mutación en *ampD*. Estos 4 aislados se observó que estaban asociados a mutaciones de una PBP de bajo peso molecular codificada por el gen *dacB* (Moya B et al 2009) que será explicado más adelante.

El efecto que produce las mutaciones en estos dos genes (*ampD* y *dacB*) será tratado en el primer capítulo de esta tesis, donde se estudiara la resistencia a β -lactámicos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* genéticamente diversas.

1.4.3.4 AmpR

A diferencia de *Escherichia coli* que carece de *ampR*, las β -lactamasas AmpC de *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* y *Pseudomonas aeruginosa* muestran una expresión diferente en ausencia y presencia de antibióticos β -lactámicos, con lo que la regulación del sistema es distinta a la regulación de *Escherichia coli*.

AmpR es un regulador transcripcional perteneciente a la familia LysR (figura 1.15) que controla la producción de la β -lactamasa *ampC*, y muestra dos estados de regulación. La cantidad de metabolitos presentes en el citoplasma, regulan la transcripción de *ampC* uniéndose a *ampR*. Por una parte los UDP-pentapéptidos actúan como represores de *ampC*, uniéndose a *ampR*.

Por otra, la presencia de metabolitos (1,6-anhidromuropéptidos) en el citoplasma son señales que inducen la transcripción de *ampC*, y desplazan a los UDP-pentapéptidos, provocando un cambio conformacional en *ampR*.

La secuencia de *ampR* de *Pseudomonas aeruginosa* es muy similar a la secuencia de *ampR* de *Citrobacter freundii* y *Enterobacter cloacae* (58.3 y 62.5%, respectivamente); las tres especies tienen la misma organización génica en el cromosoma y se considera que también utilizan el mismo mecanismo de regulación (Kong KF et al 2005). Los genes *ampC*, *ampR* y sus correspondientes regiones intergénicas fueron descritas por Lodge JM & colaboradores en 1990. Su organización es idéntica en todos los miembros de enterobacterias que tengan el gen inducible. AmpR está localizado justo corriente arriba de *ampC* y juntos, *ampR* y *ampC* forman un operon divergente con regiones promotoras que se superponen; a las que AmpR se une y así regula la transcripción de ambos genes (Asgarali A et al 2009; Moya B et al 2009; Vötsch W et al 2000).

Además AmpR también modula la expresión de proteasas extracelulares (LasA), piocianina y otros factores de virulencia en *Pseudomonas aeruginosa* (Kong KF et al 2005). La modulación de la actividad de *ampR* por ejemplo por inhibición de *nagZ* podría tener un efecto sobre la regulación transcripcional e interrumpir vías de virulencia, además de suprimir la inducción de *ampC* (Asgarali A et al 2009). Se han descrito mutaciones puntuales en el regulador *ampR* como responsables de la hiperproducción de *ampC* en enterobacterias; sin embargo, aparentemente es un mecanismo poco frecuente en *Pseudomonas aeruginosa* (Bagge N et al 2002; Juan C et al 2005; Quale J et al 2006).

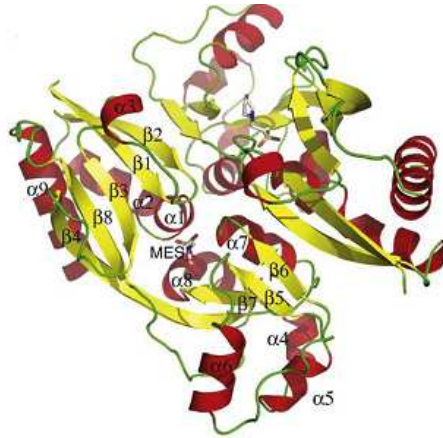


Figura 1.15 Estructura tridimensional de AmpR de *Citrobacter freundii* (Balcewich MD et al 2010)

1.4.3.5 DacB

Es el gen que codifica para una proteína llamada PBP4 y su función y estructura se ha descrito principalmente en *Escherichia coli*. PBP4 (DacB) es una proteína de unión a penicilinas no esencial, de bajo peso molecular y clase C, que posee actividad DD-endopeptidasa y DD-carboxipeptidasa. Participando en el mantenimiento de la morfología, reciclaje del peptidoglicano y otras funciones relacionadas con la división celular (Moya B et al 2009; Meberg MB et al 2004). Está organizada en tres dominios (figura 1.16), el primero de ellos tiene motivos característicos de las PBPs y de β -lactamasas (SXXX, (S/Y) XN y (K/H)(S/T)G) y en este dominio se encuentran integrados los otros dos (Kishida H et al 2006; Zapun A et al 2007).



Figura 1.16. Estructura cristalografiada de PBP4 de *Escherichia coli* (Kishida H et al 2006).

Esta proteína en *Pseudomonas aeruginosa* tiene un 27% de identidad con la PBP4 de *Escherichia coli*, y contiene los motivos conservados (Moya B et al 2009).

Como se ha comentado en apartados anteriores, durante el reciclaje del peptidoglicano, la presencia de un β -lactámico inductor, conducirá a su unión con las proteínas de unión a penicilinas (PBPs). Como consecuencia se produce un incremento en la concentración de muropéptidos, en relación a la cantidad de UDP-péptidos unidos a AmpR, provocando un desplazamiento de estos UDP-péptidos con el correspondiente cambio en la conformación de AmpR.

Este cambio conformacional favorece la unión de AmpR con el promotor de *ampC*, resultando en un incremento en la expresión de *ampC*. Cuando se agota este inductor, el proceso se restaura, volviendo a producir niveles bajos de *ampC* (Moya B et al 2009).

La inactivación de PBP4 conduce a la hiperexpresión de *ampC* dependiente de AmpR y, mediante un análisis genómico de la expresión genética de varios mutantes PBP4, comparando con la cepa de referencia PAO1, se observó que además de un incremento en la expresión de *ampC*, otro gen mostraba su expresión incrementada.

Este gen llamado *CreD*, codifica una proteína de membrana interna de función todavía incierta, regulado por el sistema en dos componentes CreBC, que además juega un papel en la resistencia a β -lactámicos (Moya B et al 2009).

Las mutaciones que conducen a una resistencia a β -lactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*, ya sea *in vivo*, *in vitro* o en aislados clínicos, ocurren frecuentemente en el gen *dacB* (PBP4) (Moya B et al 2009).

1.4.4 Sistema de regulación creBC/BlrAB

Las bacterias responden rápida y eficientemente a cambios físicos y nutricionales en su ambiente y regulan la expresión de un conjunto de genes en respuesta a ambientes específicos y señales metabólicas. Algunas de estas respuestas están controladas por los llamados reguladores de dos componentes, donde la detección de la señal y la respuesta a esta es llevada a cabo por proteínas diferentes.

Estos sistemas reguladores de dos componentes (TCR) están formados en líneas generales por un sensor que pertenece a la familia histidín quinasa y un regulador de respuesta que actúa en el citoplasma. El mecanismo se activa cuando el sensor detecta cambios en el ambiente, y a continuación la proteína reguladora conduce la respuesta vía transcripción génica.

En *Escherichia coli*, el Sistema CreBC encargado de modular genes relacionados con el metabolismo del carbono, pertenece a este tipo de sistema reguladores; al igual que su homólogo en *Aeromonas spp*, que regula la producción de múltiples β -lactamasas en respuesta a la exposición a β -lactámicos y se conoce con el nombre de BlrAB (Avison MB 2001).

Tanto en *Escherichia coli* como en *Aeromonas spp*, el sensor (perteneciente a la familia histidín quinasa) se autofosforila en presencia de la señal; el segundo elemento es un factor de transcripción regulador, que se activa por fosforilación de un residuo de aspartato, el donador de cual es el sensor de señal (Avison MB 2001).

1.4.4.1 Sistema creBC en Escherichia coli

CreBC es un sistema regulador de dos componentes que controla la expresión de un número de genes en *Escherichia coli* (llamado regulón *cre*). La activación específica de este sistema, se produce tras la detección de cambios en la composición de nutrientes presentes en el medio; conduciendo a un aumento en la expresión de los genes que modula (Cariss SJL et al 2008; Avison MB et al 2004).

Este sistema regulador de dos componentes, está formado por *creB* y *creC*; *creB* es el regulador de respuesta, que para activarse tiene que ser fosforilado por *creC* que es el sensor que detecta la señal y se autofosforila. Ambos genes forman parte de un cluster de 4 genes *creABCD*, en el que *creA* es un ORF y *creD* codifica para una proteína de membrana interna de función desconocida, que contiene su propio promotor (Avison MB et al 2004).

Durante mucho tiempo se pensó que la hiperexpresión de *creD* conducía a la aparición del fenotipo *cet2* de los mutantes de *Escherichia coli* resistentes a colicina. Sin embargo, estudios recientes (Cariss SJL et al 2010) han demostrado que el responsable de ello es la hiperexpresión de otro gen, conocido como *yieJ(cbrC)*; localizado también en el regulón *cre* y que codifica la proteína E2 (que confiere tolerancia a colicina).

En este regulón *cre* se han descrito la existencia de nueve genes, divididos en ocho unidades transcripcionales; cada uno de los cuales posee su propia función (la gran mayoría relacionada con el metabolismo del carbono) y una secuencia común de ADN, que parece ser que actúa como sitio de unión para el factor de transcripción, *creB* (Avison MB et al 2001; Cariss SJL et al 2008). En presencia de un estímulo, *creC* es activado y fosforila *creB*, una vez esto ocurre, *creB* se une a esta secuencia conduciendo la transcripción del resto de los genes. Con lo que la transcripción del regulón *cre* es totalmente dependiente tanto de *creB* y *creC*, como de esta secuencia de ADN a la que se une el factor de transcripción (Cariss SJL et al 2008).

El regulador CreBC de *Escherichia coli* comparte una homología del 70% a nivel de aminoácidos con el sistema regulador de *Aeromonas spp* (*BlrAB*). En la literatura existen varios trabajos en los que el regulador *creBC* de *Escherichia coli* es capaz de modular la expresión de las β -lactamasas de *Aeromonas spp*. Se ha descrito que la secuencia de ADN a la que se une el factor de transcripción de *Escherichia coli* o *Aeromonas* (*creB* o *blrA*, respectivamente) presenta una elevada similitud, mientras que esta homología no existe entre las proteínas que reconocen la señal (*creC* y *blrB*, respectivamente) son diferentes.

Esto sugiere que cada factor de transcripción se pueden unir al mismo motivo de ADN pero su activación se realiza en respuesta a diferentes señales (Avison MB 2004; Cariss SJL et al 2008).

1.4.4.2 Sistema BlrAB y expresión de β -lactamasas en *Aeromonas*

El género *Aeromonas spp.* produce múltiples β -lactamasas cromosómicas inducibles (Walsh et al 1995; Walsh et al 1997), que se regulan de manera coordinada (Alksne LE et al 1996; Avison MB, et al 2004; Niumsup P et al 2003).

En la mayoría de las especies, como por ejemplo *Aeromonas hydrophila*, hay tres enzimas diferentes: carbapenemasa de clase B llamada *CphA* (o también conocida como *Imi*), una cefalosporinasa de clase C (*Cep*) y una penicilinasas que hidroliza oxacilina y cloxacilina llamada *Amp* (Avison et al 2004; Tayler AE et al 2010). La regulación de los tres genes esta controlada por un sistema regulador de dos componentes llamado BlrAB y su producción se ve incrementada debido a la expresión de un factor de transcripción, llamado BlrA, activada por BlrB que es la proteína quinasa que detecta la señal; ambos, forman el llamado sistema de dos componentes para el control de expresión de dichas enzimas en *Aeromonas spp.* Además, en todos los miembros del género, *blrAB* está unido a uno de los genes reguladores de β -lactamasas, *amp* y junto con un gen adicional, *blrD* forman el regulón *blr*.

Tayler y colaboradores han sugerido que el componente M5 (monómero disacárido pentapéptido) de peptidoglicano proporciona el enlace entre antibióticos β -lactámicos y la inducción de β -lactamasas en *Aeromonas hydrophila*; y que este componente es el activador directo o indirecto (mediante la acción de otra proteína) del sensor *BlrB* (figura 1.17) (Tayler AE et al 2010).

A pesar de encontrarse diferencias significativas entre AmpR y el control de la producción de β -lactamasas mediante BlrAB como la activación y la localización de la inducción (periplásmica para BlrAB, y en el citoplasma para AmpR); hay una cierta similitud, ya que en ambos sistemas, la inhibición de PBPs de bajo peso molecular está implicada en la inducción de las β -lactamasas.

En *Aeromonas hydrophila*, la alteración de PBP de bajo peso molecular como PBP4, conduce a la expresión de la β -lactamasa (Figura 1.17) (Taylor AE et al 2010), al igual que ocurre en *Pseudomonas aeruginosa* con AmpC (Moya B et al 2009)

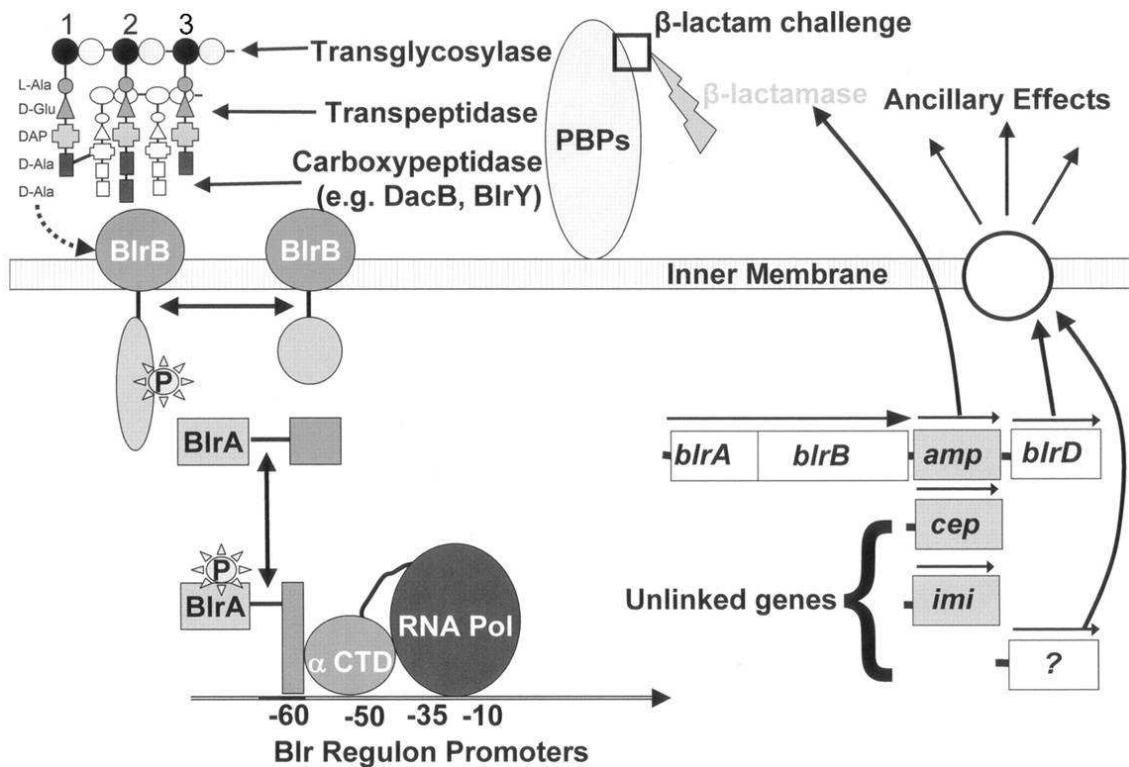


Figura 1.17 Modelo propuesto por Taylor y colaboradores de la inducción de las β -lactamasas en *Aeromonas* spp y su papel en el regulón blr (Taylor AE et al 2010)

El sistema BlrAB (del inglés “beta-lactamase regulation”) es el encargado de modular, por tanto, la expresión de estas β -lactamasas; y como hemos comentado, este sistema es altamente homólogo al sistema de dos componentes de *Escherichia coli*, CreBC. Ya que entre otras similitudes, se ha encontrado en *Aeromonas* spp. la secuencia de ADN, TTCAC, secuencia que originalmente fue encontrada en asociación con los genes regulados por CreBC en *Escherichia coli*, y además un gen adicional en *Aeromonas hydrophila* llamado *blrD*, homólogo al gen *creD* de *Escherichia coli* (Avison 2004; Cariss SJL et al 2008).

1.4.4.3 Sistema *creBC/BlrAB* en *Pseudomonas aeruginosa*

Con el trabajo de Moya B y colaboradores, se demostró que la inactivación de PBP4 en *Pseudomonas aeruginosa* conduce no solo a una hiperexpresión de *ampC* sino también a una hiperexpresión de *creD*, componente del sistema CreBC de *Escherichia coli*, o su homólogo en *Aeromonas spp* (BlrAB) (Moya B et al 2009). La hiperexpresión de este gen es una característica exclusiva de los mutantes PBP4, ya que no se observó en ningún mutante *ampD* de los estudiados; descartando así que este fenotipo fuese consecuencia directa de la hiperexpresión de *ampC*. Además, se demostró la inducibilidad de *creD* en presencia de β -lactámicos inductores de AmpC, y su relación con AmpR; reduciendo significativamente la inducción en presencia de *ampR* funcional, pero restableciéndose tras su inactivación (Moya B et al 2009).

En este mismo trabajo, y con el fin de conocer el papel de este sistema CreBC en la resistencia a β -lactámicos, se inactivaron los genes *creBC* y *creD* en los mutantes PBP4.

El resultado de la inactivación de *creBC* en estos mutantes no sólo redujo la expresión de *creD* a niveles de la cepa PAO1, sino que también disminuyó los niveles de resistencia a valores tratables; por otra parte, la expresión de *ampC* no se vió modificada. El efecto de esta inactivación, resultó ser específico de los mutantes PBP4, ya que en PAO1 o en cualquiera de sus mutantes *ampD* no tuvo ningún efecto sobre la sensibilidad. Sugiriendo que mutaciones en PBP4 activan específicamente el sistema regulador CreBC, conduciendo a un incremento en la resistencia a β -lactámicos y una hiperexpresión de *creD*, sin mostrar modificaciones en la expresión de *ampC*. Sin embargo, la inactivación de *creD* produjo una disminución en la resistencia poco significativa a diferencia de la reducción mostrada tras la inactivación de *creBC*, con lo que parece ser que no es el único responsable del aumento de la resistencia.

Los resultados obtenidos por Moya y colaboradores sugieren que el sistema CreBCD podría ser un candidato para el desarrollo de moléculas que reduzcan o disminuyan el desarrollo de resistencias; e indican un posible enlace entre el regulador de CreBC, mutaciones en *dacB* (PBP4) y el sistema regulador de la expresión de *ampC*. En el capítulo tres de esta tesis evaluaremos la conexión entre ambos sistemas, así como el efecto de CreBC y *creD* sobre la eficacia biológica en presencia y ausencia de β -lactámicos.

2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS

La causa principal de hiperproducción de *ampC* en *Pseudomonas aeruginosa* es la inactivación de *ampD* o *dacB* (que codifica para PBP4) o la combinación de ambas. Estudios previos demuestran que la inactivación de *dacB* en PAO1, produce un incremento más acusado en las CMI's que la inactivación de *ampD* y además conduce a la activación del sistema regulador de dos componentes CreBC, que juega un papel en la resistencia. Teniendo en cuenta que esta información está descrita sólo en PAO1; en la primera parte de este trabajo se construyeron mutantes *ampD* y/o *dacB* de 8 aislados clínicos genéticamente diversos, de PA14 y de PAO1, con el objetivo de:

1. Evaluar si el efecto de la inactivación de *ampD* y *dacB* descrito en PAO1 es un principio universal en *Pseudomonas aeruginosa*.

La regulación de la β -lactamasa AmpC está íntimamente ligada al reciclaje del peptidoglicano y su inducción está controlada por el regulador transcripcional AmpR. Los productos resultantes de la degradación del peptidoglicano son incorporados al citoplasma gracias a la permeasa AmpG y procesados por NagZ, dando lugar a los 1,6-anhidromuropéptidos, moléculas que interaccionan con AmpR, determinando la inducibilidad de *ampC*. Estos anhidromuropéptidos son modificados por AmpD, y posteriormente devueltos a la vía de síntesis de la pared. Dado que AmpG es la vía de entrada de los monómeros de peptidoglicano al citoplasma y NagZ cataliza la formación de 1,6-anhidromuropéptidos, el bloqueo de estos genes de manera independiente pueden ser una posible estrategia para potenciar la eficacia a β -lactámicos y reprimir la expresión de *ampC*. En la segunda parte de este trabajo se construyeron mutantes *ampG* y *nagZ* de PAO1, diversos mutantes de laboratorio (PA Δ D, PA Δ dacB, etc...) y cepas clínicas panresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* con el fin de:

2. Establecer el efecto de la inactivación de *ampG* y *nagZ* en la resistencia a β -lactámicos y en la expresión de *ampC* en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con diferentes patrones de resistencia.
3. Determinar mediante estudios poblacionales de sensibilidad, el efecto de la inactivación de *ampG* y *nagZ* sobre la selección de mutantes resistentes a ceftazidima e imipenem.
4. Evaluar la acción de PUGNAc como inhibidor molecular de *nagZ*, en las diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa* hiperproductoras de *ampC*.
5. Por tanto, el objetivo final es determinar el papel de *nagZ* y *ampG* como posibles dianas para evitar y revertir la resistencia a β -lactámicos y la expresión de *ampC* en *Pseudomonas aeruginosa*.

En estudios anteriores se demostró que en *Pseudomonas aeruginosa*, una mutación en el gen *dacB*, que codifica para una PBP no esencial (PBP4), además de producir un incremento en la expresión de *ampC*, activa el sistema regulador de dos componentes CreBC; sugiriendo que dicho sistema mantiene una posible conexión con el sistema regulador de *ampC*. En este último capítulo de la tesis se evalúa la implicación de CreBC en diversas cepas de PAO1 con una o varias mutaciones en diferentes componentes que participan en la vía de regulación de *ampC*; y el efecto de *creBC* y *creD* sobre la eficacia biológica en presencia y ausencia de β -lactámicos, con el fin de:

6. Descifrar la conexión entre el sistema CreBC y la vía de regulación de AmpC.

7. Evaluar el sistema CreBC como posible candidato para la elaboración de moléculas que disminuyan el desarrollo de resistencias.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas, plásmidos y cebadores

Tabla 3.1.1 Cepas de laboratorio y mutantes usados en este trabajo.

CEPA	GENOTIPO	REFERENCIA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	Cepa de laboratorio totalmente secuenciada	Stover, C.K et al 2000
PAΔD	PAO1 ΔampD::lox, AmpD es una amidasa implicada en la via de regulación de AmpC y en el reciclaje del peptidoglicano.	Juan, C. et al 2006
PAΔdB	PAO1 ΔdacB::lox, dacB codifica para una PBP(Penicillin Binding Protein) no esencial, PBP4.	Moya, B. et al 2009
PA14	Cepa de laboratorio totalmente secuenciada.	Lee et al 2006
PA14ΔD	PA14 ΔampD::lox	Este trabajo
PA14ΔdB	PA14ΔdacB::lox	Este trabajo
AAR	Cepa clínica sensible a ceftazidima, procedente de hemocultivo de pacientes ingresados en UCI durante el año 2008.	Este trabajo
AARΔD	AARΔampD::lox	Este trabajo
AARΔdB	AAR ΔdacB::lox	Este trabajo
EAL	Cepa clínica sensible a ceftazidima, procedente de hemocultivo de pacientes ingresados en UCI durante el año 2008.	Este trabajo
EALΔD	EAL ΔampD::lox	Este trabajo
EALΔdacB	EAL ΔdacB::lox	Este trabajo
JW	Cepa clínica sensible a ceftazidima, procedente de hemocultivo de pacientes ingresados en UCI durante el año 2008.	Este trabajo
JWΔD	JW ΔampD::lox	Este trabajo
JWΔdacB	JW ΔdacB::lox	Este trabajo
GGF	Cepa clínica sensible a ceftazidima, procedente de hemocultivo de pacientes ingresados en UCI durante el año 2008.	Este trabajo
GGFΔD	GGF ΔampD::lox	Este trabajo
GGFΔdB	GGF ΔdacB::lox	Este trabajo
JCC	Cepa clínica sensible a ceftazidima, procedente de hemocultivo de pacientes ingresados en UCI durante el año 2008.	Este trabajo
JCCΔD	JCC ΔampD::lox	Este trabajo
JCCΔdB	JCC ΔdacB::lox	Este trabajo
FRM	Cepa clínica sensible a ceftazidima, procedente de hemocultivo de pacientes ingresados en UCI durante el año 2008.	Este trabajo
FRMΔD	FRM ΔampD::lox	Este trabajo
FRMΔdB	FRM ΔdacB::lox	Este trabajo
GPP	Cepa clínica sensible a ceftazidima, procedente de hemocultivo de pacientes ingresados en UCI durante el año 2008.	Este trabajo
GPPΔD	GPP ΔampD::lox	Este trabajo
GPPΔdB	GPP ΔdacB::lox	Este trabajo

MATERIALES Y MÉTODOS

LDP	Cepa clínica sensible a ceftazidima, procedente de hemocultivo de pacientes ingresados en UCI durante el año 2008.	Este trabajo
LDPΔD	LDP Δ <i>ampD</i> :: <i>lox</i>	Este trabajo
LDPΔdB	LDP Δ <i>dacB</i> :: <i>lox</i>	Este trabajo
PAdacB	Mutante espontáneo de PAOΔ <i>dacB</i> (W273X)	Moya, B. et al 2009
PAdacBΔD	PadacB Δ <i>ampD</i> :: <i>lox</i>	Moya, B. et al 2009
PAΔDh2Dh3	PAO1 Δ <i>ampD</i> :: <i>lox</i> Δ <i>ampDh2</i> :: <i>lox</i> Δ <i>ampDh3</i> :: <i>lox</i> , <i>AmpDh2</i> y <i>AmpDh3</i> , son dos homólogos funcionales de <i>AmpD</i> .	Juan, C. et al 2006
PAΔR	PAO1 Δ <i>ampR</i> :: <i>lox</i> , <i>AmpR</i> es el regulador transcripcional de tipo <i>LysR</i> necesario para la inducción de <i>ampC</i> .	Moya, B. et al 2009
PAΔC	PAO1 Δ <i>ampC</i> :: <i>lox</i> , <i>ampC</i> es el gen que codifica para la β-lactamasa <i>AmpC</i>	Moya, B. et al 2008
PAΔnZ	PAO1Δ <i>nagZ</i> :: <i>lox</i> , <i>nagZ</i> es un N-acetilglucosaminidasa que procesa los anhidromuropéptidos, participa en la vía de regulación de <i>AmpC</i> y en el reciclaje del peptidoglicano.	Este trabajo
PAΔDnZ	PAO1 Δ <i>ampD</i> :: <i>lox</i> Δ <i>nagZ</i> :: <i>lox</i>	Este trabajo
PAΔdBnZ	PAO1Δ <i>dacB</i> :: <i>lox</i> Δ <i>nagZ</i> :: <i>lox</i>	Este trabajo
PAdacBΔDnZ	PadacBΔ <i>ampD</i> :: <i>lox</i> Δ <i>nagZ</i> :: <i>lox</i>	Este trabajo
PAΔDh2Dh3nZ	PAO1Δ <i>ampD</i> :: <i>lox</i> Δ <i>ampDh2</i> :: <i>lox</i> Δ <i>ampDh3</i> :: <i>lox</i> Δ <i>nagZ</i> :: <i>lox</i>	Este trabajo
PAΔG	PAO1Δ <i>ampG</i> :: <i>lox</i> , <i>ampG</i> es la permeasa que permite el paso de anhidromuropéptidos al citoplasma.	Este trabajo
PAΔDG	PAO1Δ <i>ampD</i> :: <i>lox</i> Δ <i>ampG</i> :: <i>lox</i>	Este trabajo
PAΔdBG	PAO1Δ <i>dacB</i> :: <i>lox</i> Δ <i>ampG</i> :: <i>lox</i>	Este trabajo
PAdacBΔDG	PadacB Δ <i>ampD</i> :: <i>lox</i> Δ <i>ampG</i> :: <i>lox</i>	Este trabajo
PAOD1	Mutante espontáneo OprD de PAO1 (W65X), oprD es una porina, que permite el paso de antibióticos y otras moléculas al interior celular.	Moya, B. et al 2010
PAOD1ΔnZ	PAOD1Δ <i>nagZ</i> ::Gmlox	Este trabajo
PAOD1ΔG	PAOD1Δ <i>ampG</i> ::Gmlox	Este trabajo
JSG2A1	Cepa clínica pan-resistente a β-lactámicos, procedente de paciente de UCI, con mutaciones en <i>ampD</i> y/o <i>dacB</i> (PBP4) y en la porina OprD.	Juan, C. et al 2005
JSG2A1ΔnZ	JSG2A1Δ <i>nagZ</i> ::Gmlox	Este trabajo
JSG2A1ΔG	JSG2A1 Δ <i>ampG</i> ::Gmlox	Este trabajo
MQB1C5	Cepa clínica pan-resistente a β-lactámicos, procedente de paciente de UCI, con mutaciones en <i>ampD</i> y/o <i>dacB</i> (PBP4) y en la porina OprD.	Juan, C. et al 2005
MQB1C5ΔnZ	MQB1C5 Δ <i>nagZ</i> ::Gmlox	Este trabajo
MQB1C5ΔG	MQB1C5Δ <i>ampG</i> ::Gmlox	Este trabajo
OFC2I4	Cepa clínica pan-resistente a β-lactámicos, procedente de paciente de UCI, con mutaciones en <i>ampD</i> y/o <i>dacB</i> (PBP4) y en la porina OprD.	Juan, C. et al 2005
OFC2I4ΔnZ	OFC2I4 Δ <i>nagZ</i> ::Gmlox	Este trabajo
OFC2I4ΔG	OFC2I4 Δ <i>ampG</i> ::Gmlox	Este trabajo
PAΔcreBC	PAO1 Δ <i>creBC</i> :: <i>lox</i> , <i>CreBC</i> es un regulador de respuesta de dos	Moya B. et al

MATERIALES Y MÉTODOS

	componentes	2009
PA Δ creD	PAO1 Δ creD::lox, CreD es una proteína de membrana interna de función desconocida, regulado por el sistema CreBC	Moya B. et al 2009
PA Δ creBC _{GFP}	PAO1 Δ creBC::lox, con plásmido pBK-miniTn7-gfp2	Este trabajo
PA Δ creBC _{Ecfp}	PAO1 Δ creBC::lox, con plásmido miniTn7(Gm) _{P_{A1/04/03}} -ecfp-a	Este trabajo
PA Δ creBC _{Eyfp}	PAO1 Δ creBC::lox, con plásmido miniTn7(Km,Sm) _{P_{A1/04/03}} -eyfp-a	Este trabajo
PA Δ creD _{GFP}	PAO1 Δ creD::lox, con plásmido pBK-miniTn7-gfp2	Este trabajo
PA Δ creD _{Ecfp}	PAO1 Δ creD::lox, con plásmido miniTn7(Gm) _{P_{A1/04/03}} -ecfp-a	Este trabajo
PA Δ creD _{Eyfp}	PAO1 Δ creD::lox, con plásmido miniTn7(Km,Sm) _{P_{A1/04/03}} -eyfp-a	Este trabajo
PAO1 _{GFP}	PAO1 con plásmido pBK-miniTn7-gfp2	Este trabajo
PAO1 _{Ecfp}	PAO1 con plásmido miniTn7(Gm) _{P_{A1/04/03}} -ecfp-a	Este trabajo
PAO1 _{Eyfp}	PAO1, con plásmido miniTn7(Km,Sm) _{P_{A1/04/03}} -eyfp-a	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
XL-1 blue	F':Tn10 proA ⁺ B ⁺ lac1 ^q D(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal ^R) thi hsdR17 (r _k ⁻ m _k ⁻) mcrB1	Colección de laboratorio (Bullock, W.O. et al 1987)
S17.1	RecA pro (RP4-2Tet:: Mu Kan::Tn7)	Colección de laboratorio (Simon R et al 1983)
NM522	F' proAB, lacIqZ Δ M15 supE, thi, Δ (lac-proAB), hsd5 (r-, m-)	Colección de laboratorio

Tabla 3.1.2 Plásmidos usados en este trabajo

PLÁSMIDOS	GENOTIPO/ CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES	REFERENCIA
pEX100Tlink	Ap ^R , <i>sacB</i> , basado en pUC19 vector de reemplazamiento de genes, con sitio de multiclonaje	Quénéé L et al 2005
PUCGmlox	Ap ^R , Gm ^R , vector basado en pUC18 con el gen <i>aacC1</i> flanqueado por las secuencias lox	Quénéé L et al 2005
pCM157	Tc ^R , vector de expresión de la recombinasa cre	Quénéé L et al 2005
PEXTADGm	pEX100Tlink con <i>ampD</i> ::Gmlox	Juan C et al 2006
PEXTdacBGm	pEX100Tlink con <i>dacB</i> ::Gmlox	Moya B et al 2009
pEXnZ	pEX100Tlink que contiene el gen <i>nagZ</i>	Este trabajo
pEXnZGm	pEX100Tlink que contiene <i>nagZ</i> con marcador de gentamicina, flanqueado por las secuencias lox	Este trabajo
pEX18Tc	Tc ^R , <i>sacB</i> , basado en pUC18, vector de reemplazamiento de genes con un sitio de multiclonaje	Hoang TT et al 1998
pUCP26	Tc ^R , basado en pUC18	West SE et al 1994
pUCP26ampG	pUC26 que contiene el gen <i>ampG</i>	Este trabajo
pEXTcΔampG::Gm	pEX18Tc que contiene el gen <i>ampG</i> con marcador de gentamicina	Este trabajo
pBK-miniTn7-gfp2	Plásmido basado en pUCP19 (Ap ^R), con marcadores de resistencia a Gm y Cm, que contiene una proteína fluorescente GFP (del inglés "Green Fluorescence Protein")	Koch et al 2001
miniTn7(Km,Sm)P _{A1/04/03} - eyfp-a	Plásmido basado en pUCP19 (Ap ^R), con marcadores de resistencia a Km, Cm y Sm, que contiene una proteína fluorescente EYFP (del inglés "Yellow Fluorescence Protein")	Klausen et al 2003
miniTn7(Gm)P _{A1/04/03} - ecfp-a	Plásmido basado en pUCP19 (Ap ^R), con marcadores de resistencia a Gm y Cm, que contiene una proteína EcFPGFP (del inglés "Cyan Fluorescence Protein")	Klausen et al 2003

Ap^R: resistente a ampicilina; Gm^R: resistente a gentamicina; Tc^R: resistente a tetraciclina.

Tabla 3.1.3 Relación de cebadores diseñados para este trabajo

Cebador	Secuencia(5'-3')	Tamaño Producto PCR (pb)	Uso	Referencia
AmpC-F	GCGCGCAGGGCGTTTCAG	1467	Amplificación y secuenciación	<i>Moya, B et al 2008</i>
AmpC-R2	CGGAGGGGCGGGGAAGC			
ampC-F2	CTTCGTCGATGCCAACCTG		Secuenciación	
ampC-IF	CAGGGCAGCCGCTTCGAC			
ampC-IR	CGTCCTCTTCGAGGCCAG			
oprD-F	CGCCGACAAGAAGAAGACTAG	1413	Amplificación y secuenciación	
oprD-R	GTCGATTACAGGATCGACAG			
oprD-F1	ATGCTGAAGTGGGGCGAGATG		Secuenciación	
oprD-F2A	GCAGGCCACTTCACCGAGG			
oprD-F3A	GATTATATCGGCTTCGGC			
oprDR2	GTCGAGCCCTTCGAATTCGC			
dacBF	CGACCATTCGGCGATATGAC	1400	Amplificación	<i>Moya, B et al 2009</i>
dacBR	CGCGTAATCCGAAGATCCATC			
dacBIF	GCCAGGGCAGCGTACCGC		Secuenciación	
dacBIF2	GTGCTCAACGGCAACCTCTAC			
dacBIR	GTCGCGCATCAGCAGCCAG			
AD-F (PA-DEF)	GTACGCCTGCTGGACGATG	910	Amplificación y secuenciación	<i>Juan C et al 2006</i>
AD-R (PA-DER)	GAGGGCAGATCCTCGACCAG			
RpsI-1	GCTGCAAACTGCCCGCAACG	250	RT-PCR AmpC	<i>Juan C et al 2006</i>
RpsI-2	ACCCGAGGTGTCCAGCGAACC			
AcnaF	GGGCTGGCCTCGAAAGAGGAC	246	RT-PCR AmpC	<i>Juan C et al 2006</i>
AcnaR	GCACCGAGTCGGGGAAGTCA			
CreD RNA-F	CGGCGTGCTGCAGGATATCGC	251	RT-PCR CreD	<i>Moya, B et al 2009</i>
CreD RNA-R	TGTCGACGTGGTACAGGCGCG			
MexB-U	CAAGGGCGTCGGTGACTIONCCAG	273	RT-PCR MexB	<i>Oh H 2003</i>
MexB-L	ACCTGGGAACCGTCGGGATTGA			

MATERIALES Y MÉTODOS

MexY-Fa	TGGAAGTGCAGAACCGCCTG	270	RT-PCR MexY	Peña C et al 2009
MexY-Ra	AGGTCAGCTTGGCCGGGTC			
nZF1-BHI	<u>TCGGATC</u> CTCCGGGCGGAACTCC ATG	506	Inactivación gen <i>nagZ</i>	Este trabajo
nZR1-HdIII	TCA <u>AAGCTT</u> AGCACCGGCGCGAA ACTCA			
nZF2-HdIII	TCA <u>AAGCTT</u> AGCGACCTGGTTCCG TTCG	450		
nZR2-ERI	T <u>CGAATTC</u> ACTCATCGACAGCTC CCTCA			
AGF1-ERI	GATATAG <u>AATTC</u> CGGTCGCGGC GGCACCATCTG	823	Inactivación gen <i>ampG</i>	Este trabajo
AGR1-XbaI	TATATCTCTAGAGCTGGCGGGA GACTTGTAGGC			
AGF2-XbaI	GATATATCTAGATACGTCACCGC GGTGATGGGC	621		
AGR2-HD3	TATATCA <u>AAGCTT</u> GTGCTGATCCT GCTGTTCCGC			
AGF-ERI	GATATAG <u>AATTC</u> AAGAAGGAGA TATACATATGACTCAGCAATCCT GG	1785	Clonaje <i>ampG</i>	Este trabajo
AGR-HD3	TATATCA <u>AAGCTT</u> TCAGTGCTGCT CGGCGTTCTGGTGTCCC			
ampG-F	ATGACTCAGCAATCCTGGCG	1784	Amplificación gen <i>ampG</i>	Este trabajo
ampG-R	TCAGTGCTGCTCGGCGTTC			
ampG-F0	GCTTGCGCGAGGAAGGCG	2024	Amplificación y secuenciación	Este trabajo
ampG-R0	GAAGGTATCGGCATTCCTTC			
ampG-R2	CGATTGGAAGGATATCGACAC			

*Las dianas de restricción para las endonucleasas están subrayadas

3.2 Construcción de mutantes nulos

3.2.1 Procedimiento general utilizado para la inactivación de genes en esta memoria.

Los mutantes realizados en esta memoria se construyeron de acuerdo a procedimientos ya establecidos (Juan C et al 2006; Moyá B et al 2009) para la inactivación de genes, basados en el sistema cre-lox (Quenee et al 2005). El esquema de dicho procedimiento se encuentra detallado en la figura 3.4.

Estos plásmidos contruidos, derivados del pEX100Tlink, son incapaces de replicarse en *Pseudomonas aeruginosa* (plásmido suicida) y contiene el gen *sacB* (causante de la muerte celular en presencia de sacarosa) y el gen *bla* (que confiere resistencia a penicilinas). En el plásmido se incorpora el gen correspondiente inactivado por un casete de resistencia a gentamicina y flanqueado por las secuencias lox. Esta incapacidad de replicación en *Pseudomonas aeruginosa*, junto con la necesidad de integrar el gen de resistencia a gentamicina y la letalidad que provoca el gen *sacB*, conducen a la doble recombinación como única opción para la viabilidad de la célula.

Una vez contruidos los correspondientes plásmidos, fueron transformados a la cepa *Escherichia coli* S17.1, que posee en su cromosoma funciones de transferencia por conjugación y permite la transferencia directa de los plásmidos a las cepas receptoras. Posteriormente, se llevó a cabo la conjugación del plásmido desde la cepa donadora a las correspondientes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Para ello, se añadieron 5mL de cultivo de la cepa donadora S17.1 (portadora del plásmido correspondiente) a 500 µl de cultivo de la cepa receptora, ambas en fase exponencial; se centrifugó durante 15 minutos a 3000 rpm, se decantó el sobrenedante y el precipitado se resuspendió en el LB remanente en el tubo. A continuación, se extendió en forma de botón sobre una placa de LB agar y se incubó durante 6 – 8 horas a 37°C.

Tras la incubación se resuspendió el botón en 1 ml de suero salino y se sembró en placas de Müller-Hinton agar (MHA) que contenían sacarosa al 5%, 30 µg/ml de gentamicina y 1 µg/ml de cefotaxima.

De este modo se seleccionan las células dobles recombinantes que incorporan en el genoma el gen de resistencia a gentamicina dejando en el vector el gen *sacB*. Los dobles recombinantes se comprobaron mediante su sensibilidad a carbenicilina (concentración de 200 µg/ml) y su resistencia a sacarosa.

Para ello se realizaron pases consecutivos, primero en placas de MHA con sacarosa al 5%, gentamicina a 30µg/ml y carbenicilina a 200 µg/ml, y seguidamente en placas de MHA con sacarosa al 5% y gentamicina a 30 µg/ml.

Los dobles recombinantes crecieron en placas con sacarosa y gentamicina, pero no en aquellas con carbenicilina, ya que no tienen el gen plasmídico *bla* que les confiere resistencia a dicho antibiótico. La comprobación definitiva se realizó mediante la amplificación por PCR del gen correspondiente en cada caso.

De cada mutante se procedió a la eliminación del marcador de resistencia a gentamicina. El plásmido pCM157, contiene el gen de la recombinasa *cre* y por tanto es capaz de reconocer y recombinar las secuencias lox que flanquean el gen de resistencia a gentamicina; para ello se llevó a cabo la electroporación del plásmido pCM157 en cada uno de los diferentes mutantes. Se purificó el plásmido pCM157 usando el *plasmid mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania) y se elaboraron células electrocompetentes de cada uno de los mutantes. Brevemente, se añadió 1mL de cultivo de cada mutante en 50mL de LB y se incubó hasta llegar a la fase exponencial; tras varias centrifugaciones y lavados con SMEB (ver tabla de reactivos) en volúmenes decrecientes, se obtuvieron 500 µL de células electrocompetentes.

A 100 μ l de estas células electrocompetentes se añadieron 5 μ l de cada plásmido y a continuación se electroporó la mezcla con pulsos de 2500V durante 5 milisegundos en el aparato Bio Rad Gene Pulser X Cell (Bio Rad, La Jolla, EE.UU). Tras el pulso, se añadió 1mL de SOC (ver Anexo I) y se incubó durante 1 hora a 37°C; pasado este tiempo se sembró en placas de LB con selección de tetraciclina a 250 μ g/ml. De al menos dos transformantes de cada cepa crecidos en placa, se preparó un preinóculo en LB con selección de tetraciclina a 250 μ g/ml, con el fin de mantener el plásmido pCM157, permitir la recombinación y eliminar el marcador de resistencia a gentamicina.

La curación del plásmido pCM157, se consiguió en todos los casos mediante uno o varios pases en LB líquido (sin ningún tipo de selección), sembrando la dilución 10^{-6} en MHA de cada uno de los cultivos. Las colonias crecidas en estas placas se estriaron de manera consecutiva en placas de MHA con tetraciclina 250 μ g/ml, MHA con gentamicina 30 μ g/ml y MH sin selección, para comprobar la pérdida de la resistencia a gentamicina y del pCM157, mostrando sensibilidad a ambos antibióticos.

Finalmente se hizo una última comprobación por PCR y secuenciación (ver cebadores en tabla 3.1.3) para así confirmar la inactivación del gen correspondiente.

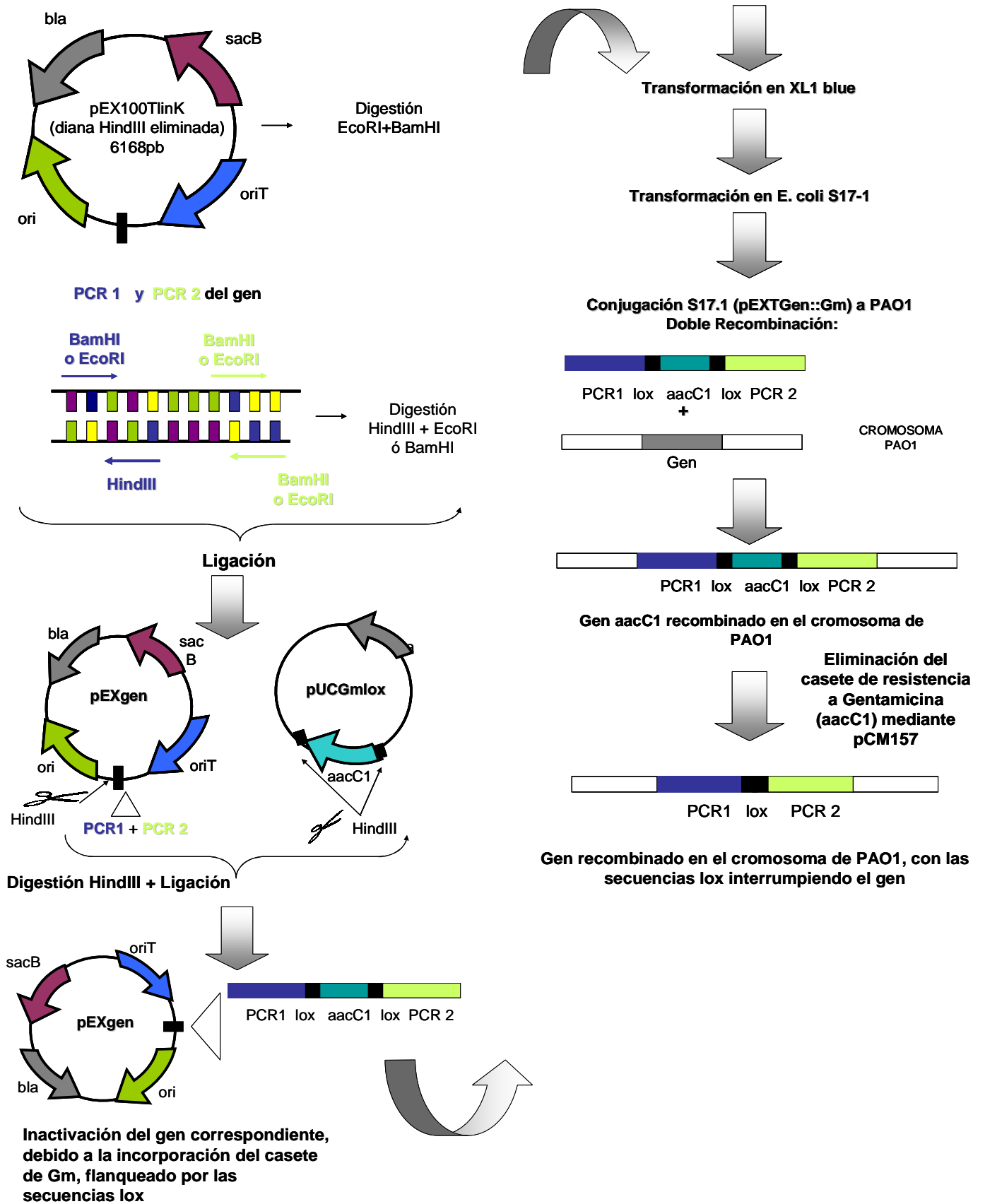


Figura 3.4 Esquema general de Inactivación génica

3.2.2 Inactivación de genes *ampD* y *dacB* en cepas genéticamente diversas.

Los mutantes *ampD* y *dacB* fueron construidos siguiendo el procedimiento basado en el sistema Cre-lox, como se ha descrito previamente (Quenee et al 2005).

Los plásmidos para la inactivación de *ampD* (pEXTADGm) y *dacB* (pEXTdacBGm) son derivados de pEX100Tlink y fueron construidos por Juan y colaboradores (Juan C et al 2006) y Moya y colaboradores (Moya B et al 2009), respectivamente. Dichos plásmidos fueron transferidos mediante conjugación de *Escherichia coli* S17-1, portadora del plásmido correspondiente (pEXTADGm, pEXTdacBGm) a cada una de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1, PA14 y 8 cepas clínicas genéticamente diversas). La selección de los dobles mutantes se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado anterior y a continuación se comprobó, mediante amplificación y secuenciación del gen correspondiente en cada caso (Juan C et al 2006; Moya B et al 2009), usando las parejas de cebadores detallados en la tabla 3.1.3.

3.2.3 Inactivación de *NagZ* en cepas de laboratorio y cepas clínicas panresistentes.

La extracción de ADN de todas las cepas estudiadas en este trabajo, se realizó mediante *DNAeasy Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania) y su posterior amplificación por PCR se llevó a cabo en un Termociclador *PTC-200* (MJ Research Inc.)

A continuación, con ADN de la cepa PAO1 se realizaron dos PCR cada una de ellas correspondientes al fragmento 3' y 5' del gen *nagZ*, usando los cebadores mostrados en la tabla 3.1.3.

Dichos productos de PCR fueron purificados mediante *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen, Hilden, Alemania) y digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI o *Eco*RI y *Hind*III. Ambos productos de PCR digeridos se ligaron entre sí y al plásmido pEX100Tlink con su diana *Hind*III deleccionada y abierto con las enzimas *Eco*RI y *Bam*HI. El plásmido resultante, pEXnZ fue transformado mediante el método químico de Cloruro Cálculo (CaCl_2) por choque térmico, en una cepa de *Escherichia coli* XL1 blue.

Para ello, previamente se elaboraron células competentes de XL1 blue de la siguiente manera: se incubó el cultivo de dicha cepa hasta la fase exponencial (con aproximadamente 1×10^8 células/mL) y tras sucesivas centrifugaciones y lavados con cloruro cálcico 0.1M en volúmenes decrecientes, se obtuvieron las células competentes. A 100 μl de estas células competentes se añadieron 10 μl del producto de ligación (pEXnZ) y tras un choque térmico de 1 minuto a 42 $^\circ$ C, se incubó 1h a 37 $^\circ$ C en 1mL de LB. Pasado este tiempo, la transformación se sembró en placas de LB con 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina; y para comprobar que los transformantes habían incorporado el plásmido, se procedió a la amplificación por PCR del gen *nagZ* y posterior secuenciación.

El plásmido de los transformantes resultantes, fue extraído y digerido con *Hind*III; simultáneamente el gen de resistencia a gentamicina (*aacC1*), flanqueado por las secuencias *lox*, se liberó del plásmido pUCGmlox mediante restricción con *Hind*III. A continuación se procedió a la ligación entre ambos, obteniendo pEXnZGm. Este plásmido fue de nuevo transformado en XL1 blue, siguiendo el procedimiento anterior, salvo para la selección de los transformantes (que se seleccionaron en placas de LBA con ampicilina y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina). Dichos transformantes fueron posteriormente comprobados por PCR y secuenciación; y finalmente transformado en la cepa S17.1, siguiendo el mismo método de choque térmico.

Posteriormente se llevó a cabo la conjugación entre *Escherichia coli* S17.1 (pEXNzGm) y las cepas correspondientes (PAO1, PA Δ D, PA Δ dB, PA Δ dacBAD, PA Δ DDh2Dh3 y cepas clínicas panresistentes) para la obtención de los mutantes *nagZ* de cada una de las cepas. La selección de los dobles recombinantes se realizó del mismo modo que en el apartado anterior (placas de LBA con sacarosa 5% y gentamicina 30 μ g/ml, y en placas de LBA sacarosa 5% con gentamicina 30 μ g/ml más carbenicilina 200 μ g/ml). Finalmente se comprobaron los mutantes por PCR y secuenciación, usando los cebadores descritos en la tabla 3.1.3.

De cada mutante *nagZ* se procedió a la eliminación del marcador de resistencia a gentamicina y curación del plásmido, del mismo modo que se ha descrito en apartados anteriores. Finalmente se hizo una última comprobación por PCR y secuenciación (ver cebadores en tabla 3.1.3) para así confirmar la inactivación del gen.

3.2.4 Inactivación de la permeasa *AmpG* en cepas de laboratorio y cepas clínicas panresistentes.

Para la inactivación de *ampG*, previamente se extrajo ADN de PAO1 y a continuación se amplificó por PCR los fragmentos: 3' y 5' del gen *ampG* de manera independiente (los cebadores están descritos en la tabla 3.1.3). Los amplicones fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* o *HindIII* y *XbaI*, ligados entre sí y posteriormente clonados en pEX18Tc (Hoang TT et al 1998), derivado de pEX100Tlink con marcador de resistencia a tetraciclina. El plásmido resultante pEXTc Δ ampG fue transformado en una cepa de *Escherichia coli* NM522, y los transformantes se seleccionaron en placas de LB con 5 μ g/ml de tetraciclina.

El marcador de resistencia a gentamicina, flanqueado por las secuencias *lox*, se obtuvo del plásmido pUCGmlox mediante restricción con *Xba*I y fue ligado al plásmido digerido con el mismo enzima, obteniendo pEXTcΔampG::Gm. Este plásmido fue de nuevo transformado en *Escherichia coli* NM522, seleccionando los transformantes en placas de LBA con 5 μg/ml de tetraciclina y 5 μg/ml de gentamicina. A continuación, este plásmido pEXTcΔampG::Gm se transformó en la cepa de *Escherichia coli* S17.1.

Los diferentes mutantes de *ampG* se generaron por conjugación, del mismo modo que se realizó con el plásmido pEXnZ::Gm, transfiriendo el plásmido desde *Escherichia coli* S17.1 a cada una de las cepas correspondientes (PAO1, PAΔD, PAΔdB, PAΔdacBAD y cepas panresistentes). La selección de los dobles recombinantes se realizó en placas con tetraciclina 5 μg/ml, en lugar de la carbenicilina utilizada en la conjugación de pEXnZ::Gm, y se comprobaron por PCR y secuenciación (según los cebadores detallados en la tabla 3.1.3).

Para la eliminación del marcador de resistencia a gentamicina, se electroporó el plásmido con pCM157 (como se ha descrito anteriormente) en los diferentes mutantes y se seleccionaron en placas de LBA con tetraciclina 250 μg/ml. Posteriormente se procedió a curar el plásmido, siguiendo el mismo procedimiento que en el caso de la inactivación del gen *nagZ*, y se comprobó por PCR y secuenciación la inactivación de gen *ampG* (ver lista de cebadores en la tabla 3.1.3)

3.3 Capítulo 1: Respuesta de resistencia a betalactámicos producida por mutaciones en *dacB* o *ampD* en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* genéticamente diversas.

3.3.1 Cepas bacterianas.

Para este estudio se utilizaron las cepas de referencia de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y PA14, y 8 cepas clínicas obtenidas de hemocultivos de pacientes ingresados en UCI del Hospital Universitario Son Dureta durante el año 2008. Cada uno de estos aislados pertenecen a un clon diferente y fueron escogidos para este estudio, de acuerdo a criterios de sensibilidad a ceftazidima de la cepa salvaje, definida por CMIs inferiores a 4 µg/ml.

La relación clonal fue estudiada mediante la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado (EGCP). Para ello se siguió protocolos previamente establecidos (*Kaufmann ME 1998*). Inicialmente se centrifugó durante 2 minutos a 5000 rpm 1mL de cultivo en caldo BHI de cada una de las cepas para precipitar las células, el sobrenadante se decantó y se lavaron las células con 1mL de PIV (ver Anexo I) y después de una segunda centrifugación, el precipitado se lavó con 200 µL del mismo reactivo. Una vez resuspendidos, se añadieron 200 µL de agarosa de bajo punto de fusión “low melt” al 1.6% (BioRad, La Jolla, EE.UU) atemperada a 42°C; introduciendo la mezcla en el molde correspondiente. Una vez solidificados los bloques, se añadió cada uno de ellos a un tubo con 1mL de solución de lisis (ver Anexo I) dejándolo en incubación durante toda la noche a 37°C. Pasado este tiempo se eliminó la solución de lisis y se sustituyó por 1mL de solución ESP (ver Anexo I), reincubando de nuevo durante 16-20h a una temperatura de 50°C.

A continuación se eliminó la solución y se procedió al lavado de los bloques añadiendo 5mL de TE (ver Anexo I) a cada tubo, durante 30 minutos; el TE se eliminó y se repitió la misma operación de lavado un máximo de 5 veces, añadiendo cada vez 5mL del mismo reactivo e incubándolo 30 minutos. Finalmente se incubaron con el TE a 4°C, hasta proceder a la restricción del ADN cromosómico.

En dicha restricción, se cortaron los bloques de agarosa y se depositaron en un tubo con 1mL de agua destilada durante 1 minuto a 37°C, para eliminar restos de TE; pasado ese tiempo el agua se eliminó y en su lugar se añadieron 200 µL de la mezcla de restricción (*SpeI*) incubándose durante 20h a 37°C. A continuación, la mezcla de restricción se eliminó y se sustituyó por 1mL de TE, incubándose durante 1h a 37°C. Se preparó el gel con agarosa megabase (BioRad) al 1% y se introdujeron los bloques, con el ADN en su interior. Seguidamente se llevó a cabo la electroforesis mediante repetidos pulsos de 5-40s de 6V/cm² durante 26h (*Kaufmann ME 1998*) en el dispositivo CHEF-DRII (BioRad, La Jolla, EEUU) . Finalizada la electroforesis, se preparó una solución de bromuro de etidio (0.5µg/mL) para la tinción del gel y posterior revelado en transiluminador SynGene (Gene Genius Bio Imaging System, SynGene UK). Finalmente, se interpretaron los resultados según criterios preestablecidos de patrones de restricción (*Tenover et al 1995*).

3.3.2 Estudios de sensibilidad

Para cada una de las cepas PAO1, PA14 y cepas clínicas originales y mutantes *ampD* y *dacB* construidos, se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI's) de los siguientes antibióticos β -lactámicos: ceftazidima, cefepime, piperacilina-tazobactam, imipenem y meropenem. Dicho proceso se llevó a cabo mediante tiras de Etest[®] (AB Biodisk, Solna, Suecia), realizando una suspensión bacteriana en un tubo con solución salina, y ajustando a una densidad de 0,5 Mc Farland. Posteriormente se extendió en una placa, se añadió la tira de antibiótico o antibióticos correspondientes y se incubó durante 24h a 37°C. Pasado ese tiempo se procedió a la lectura de la CMI y su posterior interpretación de acuerdo a los criterios del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003*).

3.3.3 Cuantificación de la expresión de *ampC* y *creD*

El nivel de expresión de *ampC* y *creD* se determinó mediante RT-PCR en tiempo real en PAO1, PA14 y cada una de las cepas clínicas. Para ello, se extrajo el ARN de cada una de las cepas, se trató con DNAsa, y se ajustó a una concentración final de 50ng/ μ L, tal y como se ha descrito en el punto anterior. A continuación se procedió a cuantificar la expresión de cada uno de los genes, siguiendo las condiciones ya descritas y con los cebadores correspondientes para cada uno de los genes (*rpsL*, *ampC* y *creD*) (tabla 3.1.3).

Al igual que en el apartado anterior, en todos los casos se consideró la media del valor de expresión del ARN obtenido de 3 experimentos independientes, cada uno de ellos realizado por duplicado y normalizando los valores de expresión de cada uno con el gen de referencia *rpsL*.

3.3.4 Secuenciación de *ampC*.

De todas las cepas utilizadas en este estudio, se procedió a la amplificación y secuenciación de *ampC* usando los cebadores descritos en la tabla 3.1.3, con el fin de conocer los polimorfismos existentes de dicho gen en cada una de las cepas estudiadas y su efecto en la resistencia a β -lactámicos.

La amplificación por PCR se llevó a cabo usando los extractos del ADN total de cada una de las cepas a estudiar, como se ha comentado anteriormente. Los productos resultantes de cada PCR, fueron purificados mediante el *Qiaquick PCR purification kit* (Qiagen, Hilden, Alemania) y a continuación se procedió a la secuenciación de cada producto, ya purificado.

Todas las reacciones de secuenciación se realizaron usando el kit BigDye® Terminator (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif.) y analizadas con el secuenciador ABI prism® 3100 DNA Sequencer (PE Applied Biosystems). Una vez detectados los posibles cambios en la secuencia, se compararon con otras secuencias disponibles en GenBank, usando el programa BLAST de www.ncbi.nlm.nih.gov.

3.3.5 Estudio de otros mecanismos de resistencia

Para conocer si en las cepas clínicas del estudio se encontraban otros mecanismos de resistencia tales como la hiperproducción de bombas de expulsión de antibióticos, se procedió a estudiar los niveles de expresión de ARN mensajero por PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) en tiempo real, siguiendo un protocolo modificado a partir del descrito por *Oh et al*, para las siguientes genes: *mexY* y *mexB*.

El ARN total de los cultivos en fase exponencial se extrajo usando el Rneasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) y se trató con DNAsa a fin de eliminar posibles contaminaciones de ADN; seguidamente, el ARN se ajustó a una concentración final de 50ng/ μ L.

Para la RT-PCR se utilizaron 50 ng del ARN purificado con los reactivos correspondientes del kit de QuantiTect SYBR Green (Qiagen, Hilden Alemania) y siguiendo una composición estándar de la mezcla de reactivos, en función del número de muestras totales. Este proceso se llevó a cabo con los cebadores mostrados en la tabla 3.1.3 y bajo las siguientes condiciones: [(15'' a 95°C, 30'' a 62°C y 30'' a 72°C) x 40 ciclos], en el SmartCycler II (Cepheid, Sunnyvale, EEUU). Además de los genes que codifican para la expresión de las bombas a estudiar, se cuantificó la expresión de un gen de referencia: *rpsL*, cuya expresión es constitutiva y nos sirve como referencia a la hora de realizar los cálculos pertinentes.

En todos los casos se consideró la media del valor de expresión del ARN obtenido de 3 experimentos independientes, cada uno de ellos realizado por duplicado y normalizando los valores de expresión de cada uno con el gen de referencia *rpsL*.

Por otra parte, se llevó a cabo la amplificación y posterior secuenciación del gen *oprD* en los aislados resistentes a imipenem, siguiendo el protocolo descrito por Gutiérrez O y colaboradores (*Gutiérrez O et al 2007*); usando los cebadores detallados en la tabla 3.1.3 para determinar si la presencia de alteraciones en la porina OprD que conlleven a su inactivación, eran la causa de esta resistencia.

3.4 Capítulo 2: Inactivación de *ampG* y *nagZ* como dianas frente a la resistencia a β -lactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*

3.4.1 Mutantes de laboratorio y cepas clínicas usadas en el estudio

La cepa de referencia PAO1, los mutantes de laboratorio PA Δ D, PAdacB, doble mutante PA Δ DdacB, mutante triple PA Δ DDh2Dh3 y las cepas clínicas usadas en este estudio, se detallan en la tabla 3.1.1 Tal y como se ha descrito en el primer apartado de esta tesis, se construyeron mutantes nulos del gen *nagZ* y *ampG* en todos ellos.

Los tres aislados clínicos utilizados en este estudio (JSG2A1, MQB1C5, y OFC2I4) provienen de una colección ya estudiada en trabajos previos (Juan C et al 2005). Cada uno de ellos son clones distintos que pertenecen a diferentes pacientes ingresados en UCI y resistentes a todos los antibióticos β -lactámicos probados (incluyendo penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemas). Otra característica que las hace objeto de este estudio es la hiperexpresión de *ampC* debido a la presencia de mutaciones en los genes *ampD* y/o *dacB* (PBP4) (Moya B et al 2009).

3.4.2 Estudios de sensibilidad

Al igual que en el estudio anterior, se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias de los siguientes antibióticos β -lactámicos: ceftazidima, cefepime, cefoxitina, aztreonam, piperacilina-tazobactam, imipenem, meropenem y ciprofloxacino; para cada una de las cepas, incluidos los mutantes *nagZ* y *ampG* correspondientes.

Dicho proceso se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento descrito en el estudio anterior, con las correspondientes tiras de Etest® (AB Biodisk, Solna, Suecia). Para la cefoxitina, la sensibilidad se determinó mediante microdilución en placa, con rango de concentración de 8 µg/mL hasta 4096 µg/mL.

3.4.3 Determinación de los mecanismos de resistencia presentes en las cepas clínicas estudiadas.

Los tres aislados panresistentes, como se ha comentado anteriormente, mostraron cambios en los genes *ampD* y/o *dacB* (PBP4) (Moya B et al 2009). Con el fin de conocer otros mecanismos de resistencia presentes en estas cepas, se estudiaron posibles alteraciones en la porina *oprD* y la expresión de las bombas de expulsión de antibióticos.

El efecto de la inactivación de *oprD* en la resistencia a carbapenémicos se estudió mediante amplificación por PCR y posterior secuenciación, usando los cebadores que se muestran en la tabla 3.1.3.

Se cuantificó la expresión por RT-PCR en tiempo real de los genes que codifican para las principales bombas de expulsión en *Pseudomonas aeruginosa*: *mexB* (MexAB-OprM), *mexD* (MexCD-OprJ), *mexF* (MexEF-OprN) y *mexY* (MexXY-OprM); siguiendo el protocolo descrito por Oh y colaboradores (Oh H et al 2003). Los valores de referencia para considerar hiperexpresión en el gen que codifica cada una de las bombas fueron, 10 veces más que la cepa salvaje PAO1 para el caso de *mexD*, *mexF*, *mexY* y de 3 veces más para *mexB* (Cabot G et al 2011). Al igual que en el trabajo anterior, en todos los casos se consideró la media del valor del ARN mensajero obtenido de 3 experimentos independientes, habiendo realizado cada uno de estos por duplicado.

3.4.4 Cuantificación de expresión de *ampC* basal e inducida.

El nivel de expresión de *ampC* de cada uno de los mutantes y PAO1, se determinó mediante RT-PCR en tiempo real en condiciones basales (como se ha descrito en puntos anteriores) y en presencia de ceftaxitina (antibiótico inductor). Para ello, se añadió 50 µg/ml de ceftaxitina al inóculo inicial, previo a la fase exponencial, y se incubó en agitación durante 3 horas, pasado este tiempo se continuó con la extracción de ARN del mismo modo que en los casos anteriores, se ajustó el ARN y se realizaron las RT-PCR en tiempo real de *ampC*.

3.4.5 Determinación inducibilidad de AmpC mediante ensayo de doble disco.

Para determinar fenotípicamente la inducción de AmpC se evaluó la presencia de antagonismo entre un antibiótico inductor (imipenem) y no inductor (ceftazidima).

La realización de esta prueba de inducción se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito por *Juan y colaboradores (Juan C et al 2006)*, en placas de MHA se sembró la suspensión bacteriana(0.5 McFarland) de las cepas a estudiar, PAO1 y mutantes derivados. A continuación se depositó el disco de ceftazidima y de imipenem, separados por una distancia de entre 5 y 30mm, y se incubó durante 16-24 h a 37°C.

3.4.6 Análisis poblacional de sensibilidad y desarrollo de resistencia.

Para determinar el efecto de la inactivación de *nagZ* y *ampG* sobre la selección de mutantes resistentes a ceftazidima e imipenem, se realizaron estudios poblacionales de sensibilidad a cada uno de los antibióticos comentados.

Se realizó un cultivo de cada una de las cepas a estudiar (PAO1, PA Δ nZ y PA Δ G) en 10mL de MH caldo, que se incubó durante toda la noche a 37°C.

Al día siguiente, se realizaron diversas diluciones en suero salino para, posteriormente sembrar en placas con ceftazidima a diferentes concentraciones crecientes (0,0.5,1,2,4,8 y 16 μ g/ml) y placas con imipenem, también a concentraciones crecientes (0,0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 μ g/ml). El recuento de colonias de cada placa se realizó tras 24h de incubación (figura 3.5).

Un número representativo de colonias que crecieron en estas placas, se inocularon en medio sin ningún tipo de selección, se comprobó la resistencia de las mismas a ceftazidima con el fin de confirmar que el crecimiento era consecuencia de la selección de mutantes espontáneos resistentes a ceftazidima y para evaluar su nivel de resistencia.

Una vez confirmado y evaluado su nivel de resistencia, se extrajo el ARN de estos mutantes espontáneos para determinar la expresión de *ampC* y averiguar los mecanismos de resistencia implicados.

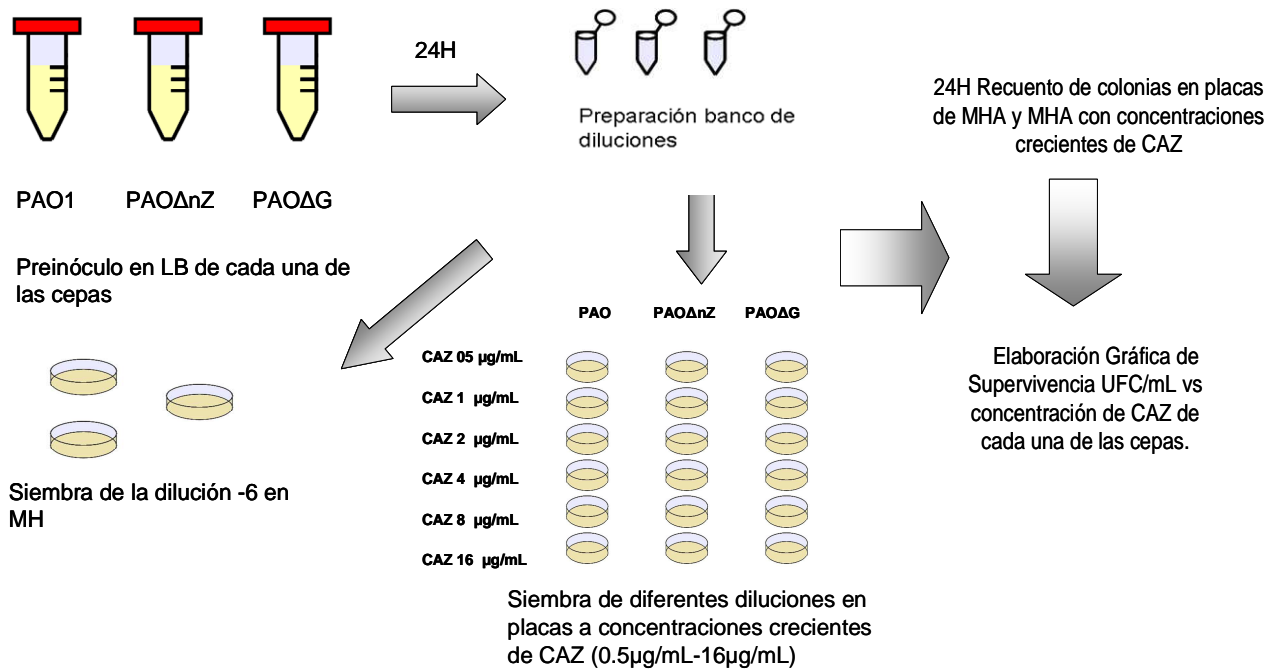


Figura 3.5. Resumen procedimiento para la realización del análisis poblacional de sensibilidad a antibióticos.

3.4.7 Estudio de sensibilidad a diferentes β -lactámicos en presencia de un inhibidor molecular de nagZ: PUGNac

Estudios previos demuestran que el bloqueo de la actividad de NagZ con moléculas inhibitoras basadas en el esqueleto de N acetil- β -glucosaminidasa O-(2-acetamido-2-deoxy-glucopiranosilideno) amino-N-fenilcarbamato (PUGNac) pueden atenuar la resistencia a β -lactámicos en el mutante *ampD* de PAO1(Asgarali A et al 2009) y en *Escherichia coli* portador de un plásmido que lleva el operón *ampR-ampC* de *Citrobacter freundii* (Stubbs KA et al 2007).

Para determinar el efecto de PUGNac sobre los diferentes mutantes estudiados, se determinó la sensibilidad a ceftazidima, aztreonam y piperacilina-tazobactam por microdilución en ausencia y presencia del inhibidor (PUGNac) a concentraciones de 0.5 mM y 5 mM.

3.5 Capítulo 3: Sistema CreBC: Interconexión con la vía de regulación de ampC y efecto sobre el fitness.

3.5.1. Regulación de creD

3.5.1.1 Cuantificación de la expresión de creD en presencia de diferentes antibióticos.

Para determinar la inducibilidad del sistema CreBC, se evaluó la expresión de *creD* en PAO1 bajo la presencia de ceftazidima e imipenem a concentraciones crecientes (1/4 y 1/2 de la CMI de cada antibiótico) y cefoxitina 50ng/μL como control. Dichos antibióticos se añadieron en la concentración deseada, a cada inóculo inicial de PAO1, previo a la fase exponencial, y se incubaron en agitación durante tres horas, pasado ese tiempo se continuó con la extracción del ARN de acuerdo al procedimiento descrito en los trabajos anteriores.

A continuación, siguiendo el procedimiento ya citado, se realizaron las RT-PCR en tiempo real de cada ARN de PAO1 para el gen de referencia *rpsL* y el gen en estudio *creD*. Para los cálculos pertinentes, se consideró la media del valor de expresión del ARNm obtenido de tres experimentos independientes, cada uno de ellos realizado por duplicado.

3.5.1.2 Cuantificación de la expresión de creD de los mutantes en los diferentes componentes de la vía de regulación de AmpC.

Con el fin de clarificar la conexión entre el sistema CreBC y la vía de AmpC, se determinó la expresión de *creD* en cepas de PAO1 con una o varias mutaciones en diversos componentes que participan en la vía de regulación de AmpC. Para ello se utilizaron las cepas PAO1, PAOΔD y PAOΔdacB, PAdacBAD y PAΔDDh2Dh3, con inactivaciones en *nagZ*, *ampG* y *ampC*.

Estos mutantes y los plásmidos utilizados para la construcción de éstos, se encuentran detallados en la tabla 3.1.1 y 3.1.2, respectivamente.

Al igual que en el apartado anterior, se cuantificó por RT-PCR en tiempo real la expresión de *creD* y del gen de referencia *rpsL*.

3.5.2 Efecto de la inactivación de *creBC* y *creD*, sobre la eficacia biológica *in vitro* e *in vivo*.

Con el fin de conocer y evaluar el efecto que produce en *Pseudomonas aeruginosa* la inactivación, por una parte del regulador en dos componentes *creBC* y por otra de la proteína de membrana *CreD*, sobre la eficacia y competitividad biológica, se realizaron los siguientes experimentos:

3.5.2.1 Tiempo de duplicación de los mutantes *creBC* y *creD*.

Para definir las tasas de crecimiento o tiempo de generación (“g”) de los mutantes PAOΔ*creBC* y PAOΔ*creD* (detallados en la tabla 3.1.1), se determinaron los tiempos de duplicación de cada uno de ellos, en tres experimentos independientes. Brevemente, se inocularon 500μL de cada cepa en 5mL de LB y se incubaron a 37°C en agitación durante 2 horas y media; a continuación se plaquearon diluciones seriadas en MH a la hora y a las dos horas y media de incubación.

Tras el recuento de las colonias, se procedió al cálculo del tiempo de generación mediante las siguientes fórmulas:

$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{t - t_0}$$

N : recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) a tiempo t (final)

N_0 : recuento de UFC a tiempo t_0 (inicial)

$$g = \frac{\ln 2}{\mu}$$

g : tiempo de generación (minutos)

μ : coeficiente exponencial de crecimiento, característico de cada cepa/medio de crecimiento

3.5.2.2 Experimentos de competición *in vitro* en presencia de diferentes concentraciones de antibiótico.

Para llevar a cabo estos experimentos, primeramente se introdujo en cada una de las cepas (PAO1, PA Δ creBC y PA Δ creD) un marcador de resistencia a gentamicina y en otras marcador de resistencia a estreptomina. A continuación se realizaron 6 experimentos de competición *in vitro*: 3 experimentos usando PAO1 marcada con gentamicina versus PA Δ creBC y PA Δ creD, marcadas con estreptomina y otros 3 usando PAO1 marcada con estreptomina versus PA Δ creBC y PA Δ creD marcadas con gentamicina. Los experimentos se realizaron por duplicado y a la inversa para anular cualquier efecto que pudiese tener el marcador sobre el fitnes.

El marcaje de cada una de las cepas, se realizó de la siguiente manera: En las cepas PAO1 y en los mutantes *creBC* y *creD* se introdujo un mini-Tn7 que posee el marcador de resistencia a gentamicina y otro con el marcador de resistencia a estreptomicina; cada uno de estos transposones además incluyen una proteína fluorescente: *gfp*, *cfp* e *yfp* (del inglés “*Green, Cyan, yellow fluorescence protein*”, respectivamente) , que podrá ser útil para futuros estudios. La inserción de estos mini-Tn7 se llevó a cabo en el cromosoma de las cepas objeto de estudio (Klausen M et al 2003).

Se extrajeron de las cepas de *Escherichia coli* correspondientes (detalladas en tabla 3.1.1) los transposones portadores de los marcadores de resistencia, mediante el Kit Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). A continuación se procedió a la inserción de dichos transposones en cada una de las cepas PAO1, $\Delta creBC$, $\Delta creD$, mediante electroporación, de acuerdo al procedimiento ya descrito en los trabajos anteriores. La siembra se realizó en placas de LBA con gentamicina 10 μ g/mL y placas con estreptomicina 200 μ g/mL, en función del marcador de resistencia que lleve, y además se comprobó la expresión de las proteínas fluorescentes mediante visualización de la fluorescencia en microscopio (Eclipse E400, Nikon).

Una vez insertados en cada una de las cepas, se procedió a la realización de los experimentos de competición *in vitro* en ausencia y en presencia de antibióticos. Los antibióticos utilizados fueron ceftazidima, imipenem y cefoxitina a concentraciones 0.25, 0.5 y 0.75 μ g/mL (para el caso de los dos primeros) y a 250, 500 y 750 μ g/mL para cefoxitina. Los experimentos de competición *in vitro*, como se ha comentado al inicio de este apartado, se realizaron por triplicado y a la inversa. Brevemente, se mezclaron en proporción 1:1 aproximadamente 10³ células procedentes de un cultivo en fase exponencial de PAO1 y el mutante correspondiente, y se inoculó en 10mL de LB con o sin antibiótico, según el caso.

A continuación se incubó a 37°C en agitación, durante 20h. Pasado este tiempo, se sembraron por duplicado, diluciones seriadas en placas de LBA con gentamicina 10 µg/mL y LBA con estreptomicina 100 µg/mL, para realizar el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) crecidas en ambas placas y poder establecer el índice de competición para cada experimento. (figura 3.6)

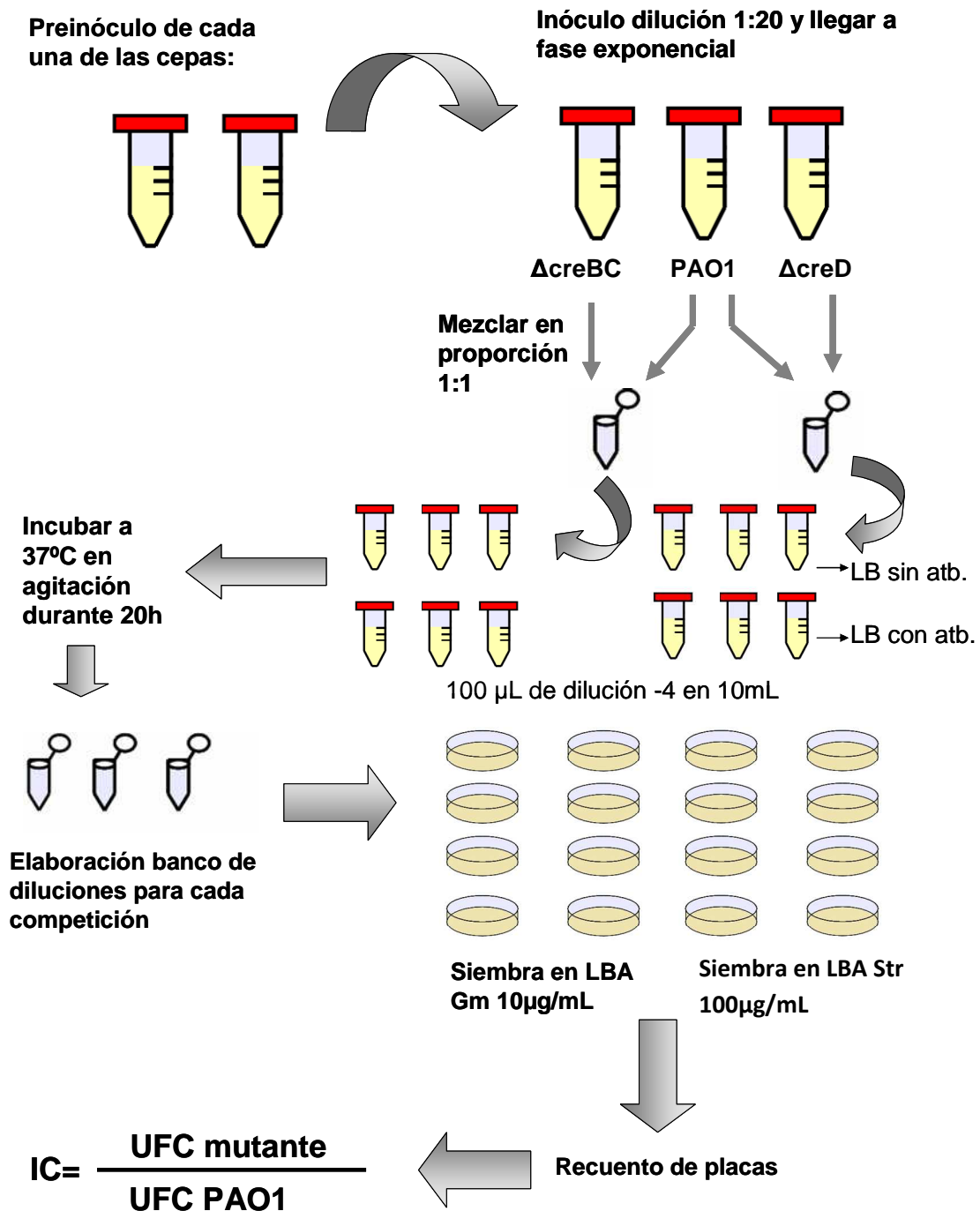


Figura 3.6 Esquema de procedimiento seguida en la realización de las competiciones *in vitro*.

3.5.2.3 Modelos murinos de infección aguda

Para determinar la eficacia biológica *in vivo* de los mutantes PAO Δ creBC y PAO Δ creD, se preparó una suspensión bacteriana con 5×10^6 UFC/mL de cada una de las cepas, incluyendo la PAO1 como referencia. A continuación se procedió a infectar a un grupo de 6 ratones por cepa, previamente anestesiados con Xilazine, inoculándoles de manera traqueal y por medio de cánula, 50 μ L de dicha suspensión. Un número representativo de ratones fueron sacrificados a las 24h siguientes a la inoculación, y el resto a las 48h siguientes. De todos ellos se extrajeron los pulmones de manera aséptica y se homogenizaron en 2mL de suero salino al 0.9% mediante un homogenizador ULTRA-TURRAX® T-25 (IKA,Staufen, Alemania). Una vez homogenizados, se procedió a la siembra de diluciones seriadas en LB. Tras el recuento se comparó la eficacia de cada una de las cepas.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Capítulo 1: Respuesta de resistencia a β -lactámicos producida por mutaciones en *dacB* o *ampD* en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* genéticamente diversas.

4.1.1 Efecto de la inactivación de *ampD* y *dacB* en la CMI de los β -lactámicos y expresión de *ampC* en cepas genéticamente diversas.

Con el fin de conocer si el efecto descrito en trabajos anteriores a cerca de la inactivación de *ampD* y/o *dacB* es un hecho que no sólo ocurre en PAO1, se construyeron mutantes *ampD* y *dacB* de 8 cepas clínicas, de PA14 y de PAO1, como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos.

La tabla 4.1 muestra la sensibilidad de cada cepa a cada antibiótico (figurando entre paréntesis el incremento producido respecto a la cepa parental), los niveles de expresión de *ampC* y *creD*; y los polimorfismos de AmpC encontrados tras la secuenciación y posterior comparación en el *GenBank*.

Como se puede ver en la tabla, la expresión relativa de *ampC* de las cepas clínicas y PA14, presentan niveles que varían entre 0.3 (EAL) y 6.4 (PA14) con respecto a PAO1. A pesar de la variabilidad entre cada una de las cepas, podemos observar que tanto la inactivación de *ampD* como de *dacB* en cada una de ellas, incrementó la expresión basal de *ampC* de manera significativa, pasando a mostrar en todos los casos hiperexpresión de *ampC*. La figura 4.2.2, muestra la mediana de dicha expresión en los mutantes *ampD* (con un valor de 67) y en los mutantes *dacB* (con un valor de 106.5). Al considerar la mediana de los valores de expresión de ambos mutantes, no se aprecian diferencias significativas entre ellos ($P= 0.2597$).

En cuanto a los efectos de la inactivación de *ampD* y *dacB* sobre las CMI de los antibióticos β -lactámicos estudiados, podemos observar que en ambas mutaciones se produjo un incremento en los valores de CMI de cefalosporinas (ceftazidima y cefepime) y penicilinas (piperacilina-tazobactam). El incremento más notable se observó en la inactivación de *dacB*, llegando a mostrar un fenotipo de resistencia de alto nivel (Tabla 4.1). La figura 4.2.1 muestra las medianas del incremento en \log_2 de los valores de CMI para los antibióticos estudiados. Como se puede ver, la inactivación de *dacB* mostró un incremento mucho mayor en la resistencia a cefalosporinas y penicilinas que el incremento producido en la inactivación de *ampD*.

Estos datos concuerdan con el estudio de Moya B (Moya B et al 2009) en el que se demostró que la inactivación de *dacB* en PAO1, producía mayores incrementos en los niveles de resistencia de cefalosporinas y penicilinas, que la inactivación de *ampD*.

En la misma figura (4.2.1) podemos observar que la inactivación de *ampD* mostró un ligero incremento sobre la resistencia a meropenem (con una mediana de 1), mientras que no se observó al inactivar el gen *dacB*. Respecto a la CMI de imipenem, no se vió alterada por ninguna de las dos inactivaciones.

Otro dato destacable en los resultados (tabla 4.1) es que tanto la inactivación de *ampD* como de *dacB* en la cepa PA14 tuvo un efecto reducido, con un escaso incremento en la expresión de *ampC* y en la resistencia a β -lactámicos, al compararlo con la inactivación de *ampD* y *dacB* en PAO1 y en la mayoría de cepas del estudio, en las que se observó un efecto más notable tanto en las CMI, como en la expresión.

Tabla 4.1. Caracterización de los mutantes *ampD* y *dacB* de PA14 y los aislados clínicos. Comparación con los datos de PAO1.

Cepa	CMI(incremento en log ₂) ^a					Expresión			Polimorfismos de AmpC ^c
	CAZ	FEP	PTZ	IMP	MER	<i>ampC</i> ^b	<i>creD</i> ^b	<i>mexY</i> ^b	
PAO1	1.5	1.5	3	1.5	0.38	1	1		
<i>ampD</i>	6(2)	3(1)	16(2.5)	1.5(0)	1(1.5)	45±15(45)	1.2±2.1(1.2)		
<i>dacB</i>	32(4.5)	12(3)	96(5)	1.5(0)	0.5(0)	80±23(80)	95±42(95)		
PA14	1.5	1.5	4	0.75	0.19	6.4±1.3	11±9.7		G27D-A55T-T105A-G391A
<i>ampD</i>	3(1)	3(0.5)	6(0.5)	0.75(0)	0.19(0)	10±5.8(1.5)	6.5±7.7(0.6)		
<i>dacB</i>	4(1.5)	4(1.5)	8(1)	0.75(0)	0.19(0)	36±18(5.6)	21±11(1.9)		
AAR	1.5	8	4	1	0.25	2.5±2.1	2.7±1.0	19.24±15.58	G27D-A55T-T105A-G391A
<i>ampD</i>	8(2.5)	12(0.5)	24(2.5)	1.5(0.5)	0.75(1.5)	221±140(88)	1.2±0.3(0.4)		
<i>dacB</i>	16(3.5)	12(0.5)	32(3)	1(0)	0.25(0.5)	422±29(169)	24±17(8.8)		
EAL	1.5	1.5	3	1.5	0.25	0.3±0.2	1.2±0.7		G27D-T105A-G391A
<i>ampD</i>	3(0.5)	3(0.5)	6(1)	2(0.5)	0.5(0.5)	4.3±0.7(14)	3.1±0.1(2.6)		
<i>dacB</i>	6(2)	4(1.5)	16(2.5)	1.5(0)	0.19(-0.5)	23±7.6(77)	18±16(15)		
JW	2	3	6	1.6	0.25	0.9±0.2	1.9±0.2		Ninguno
<i>ampD</i>	192(6.5)	32(3.5)	>256(>5)	1.5(0)	0.75(1.5)	265±138(294)	2.5±0.1(1.3)		
<i>dacB</i>	192(6.5)	32(3.5)	>256(>5)	1.5(0)	0.38(0.5)	240±187(267)	15±11(7.9)		
GGF	2	2	4	>32	12	0.9±0.6	1.5±0.5		L176R
<i>ampD</i>	8(2)	8(2)	32(3)	>32	>32(>1.5)	154±17(171)	1.5±0.7(1)		
<i>dacB</i>	32(4)	24(3.5)	96(4.5)	>32	12(0)	269±92(298)	5.6±3.3(3.7)		
JCC	3	4	8	1.6	3	0.8±1	6.5±7.3	18.89±14.6	Ninguno
<i>ampD</i>	4(0.5)	4(0)	16(1)	2(0.5)	4(0.5)	12±8.5(15)	5.3±4.0(0.8)		
<i>dacB</i>	6(1)	6(0.5)	16(1)	2(0.5)	3(0)	9.4±7.2(12)	17±6.6(3.2)		
FRM	2	12	4	3	0.126	6.1±5.9	3.1±2.9	40.54±18.9	T12A-G391P
<i>ampD</i>	32(4)	16(0.5)	>256(>6)	3(0)	0.38(0.5)	1176±1556(291)	1.7±1.3(0.5)		
<i>dacB</i>	128(6)	32(1.5)	>256(>6)	3(0)	0.125(0)	1111±83(162)	43±34(14)		
GPP	3	2	2	0.75	0.38	5.3±1.1	27±0.9		G27D-A55T-G391A
<i>AampD</i>	16(2.5)	6(1.5)	32(4)	1(0.5)	0.75(1)	490±391(92)	2.9±3.6(1.1)		
<i>dacB</i>	32(3.5)	12(2.5)	32(4)	0.76(0)	0.25(-0.5)	613±341 (116)	19±7.9(7)		
LDP	2	2	3	1	0.126	0.7±0.3	3.4±3.5		T105A- L176R
<i>ampD</i>	6(1.5)	3(0.5)	12(2)	1(0)	0.38(1.5)	32±26 (46)	4.2±1.6 1.2)		
<i>dacB</i>	12(2.5)	6(1.6)	12(2)	1(0)	0.19(0.5)	68±25 (97)	23±19 (6.8)		

a. Entre paréntesis se muestra el incremento de la CMI en log₂; b. Nivel relativo de ARNm de *ampC*, *creD* o *mexY*, respecto a la cepa salvaje PAO1±desviación estándar; c. Polimorfismos detectados sobre la secuencia de AmpC en PA14 y aislados clínicos, comparados con la secuencia de PAO1.

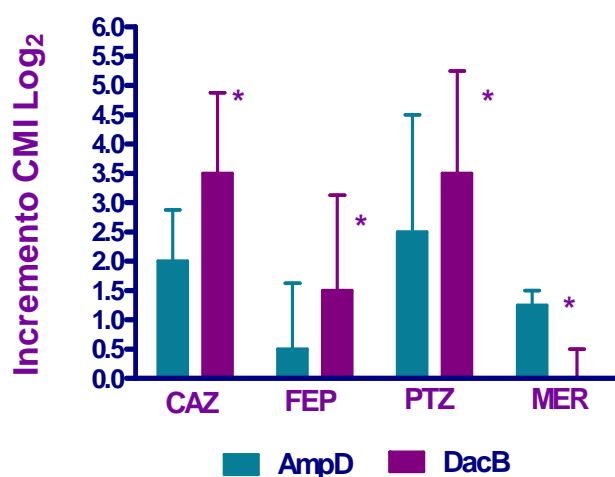


Figura 4.2.1 Mediana y rango del incremento en \log_2 de las CMI para los diferentes β -lactámicos en los mutantes *ampD* y *dacB* estudiados. (* $P < 0.05$ (t de Student))

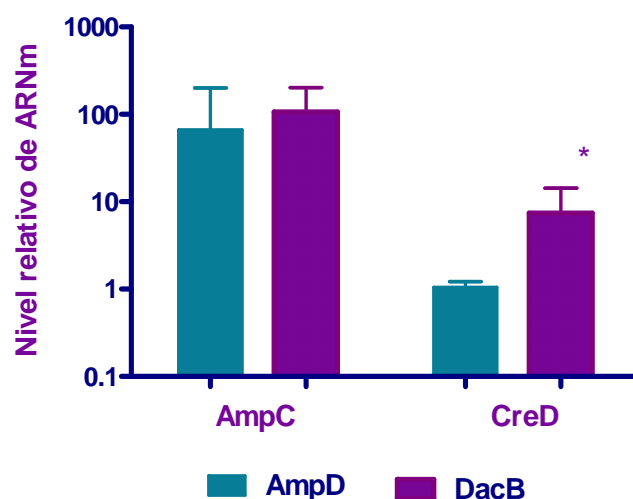


Figura 4.2.2. Mediana y rango del incremento en la expresión de *ampC* y *creD* en los mutantes *ampD* y *dacB* estudiados.

Por otro lado, aunque exista una asociación entre el aumento en la CMI de ceftazidima y el incremento en la expresión de *ampC*, los resultados obtenidos y representados en la figura 4.2.3, no muestran una clara correlación entre ambas ($R^2=0.801$ en la inactivación de *ampD* y $R^2=0.595$ en el mutante *dacB*). A pesar de ello, se puede observar que los mutantes *ampD* a pesar de tener una elevada expresión de *ampC* no consiguen alcanzar los niveles de resistencia que muestran los mutantes *dacB*.

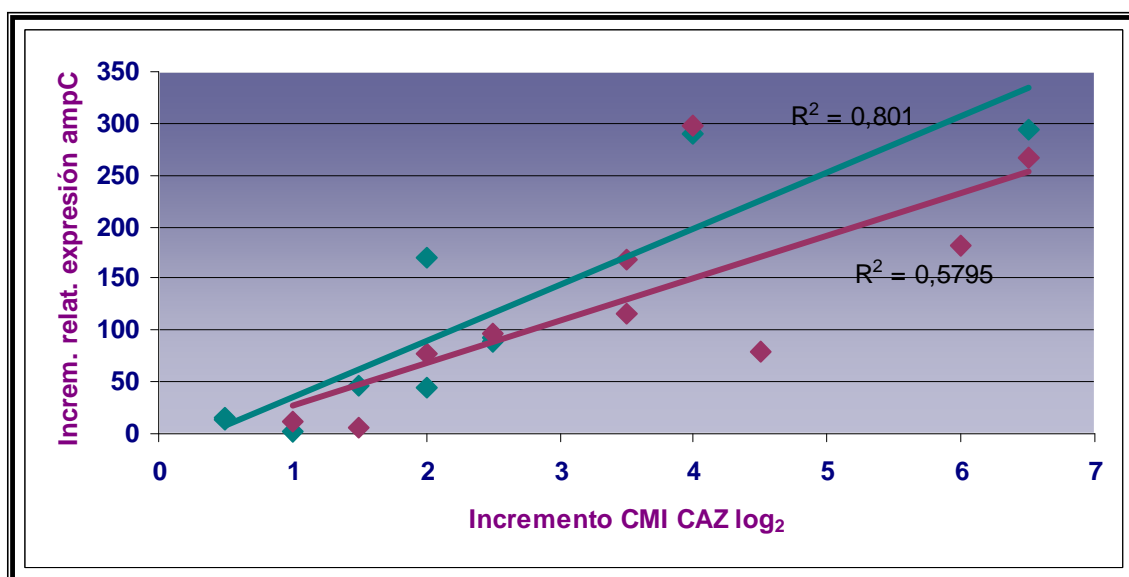


Figura 4.3. Correlación entre el incremento de la expresión de *ampC* y el incremento en log₂ de la CMI de ceftazidima. Datos extraídos de la tabla 4.1. mutantes *ampD* (verde) y *dacB* (lila).

Todos estos resultados demuestran que, a pesar de la variabilidad entre cada una de las cepas estudiadas, la inactivación de *ampD* y/o *dacB* (PBP4) conduce a una hiperexpresión de *ampC* y a un incremento en la resistencia a antibióticos β-lactámicos en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* genéticamente diversas. Con lo que estos datos completan estudios anteriores en los que se describe el efecto de *ampD* y *dacB* en la cepa salvaje PAO1. Estos estudios describen, que la inactivación de *dacB* en PAO1 produce incrementos en los niveles de resistencia a antibióticos β-lactámicos mayores que la inactivación de *ampD* en PAO1 (Moya B et al 2009).

4.1.2 Efecto de la inactivación de *ampD* y *dacB* en la expresión de *creD* (activación sistema CreBC), en cepas genéticamente diversas.

Con el fin de conocer si la inactivación de *dacB* en los aislados clínicos y en PA14 conduce a la activación del sistema *creBC* y juega un papel en la resistencia de alto nivel, al igual que ocurre en PAO1, se cuantificó la expresión de *creD* en PAO1, PA14, cada una de las cepas clínicas y los mutantes *ampD* y *dacB* correspondientes.

Como se puede ver en la tabla 4.1, la cepa PA14 y los aislados clínicos mostraron valores de expresión de *creD* entre 1.2 (correspondiente a EAL) y 11 (valor de expresión perteneciente a PA14), respecto a PAO1. En general, la inactivación de *ampD* no tuvo ningún efecto sobre la expresión de *creD* (con una mediana de 1.05), mientras que sí se observó un notable incremento ($p < 0.001$) en los mutantes *dacB*, con una mediana de 7.45 respecto a sus cepas parentales (figura 4.2.2), tal y como se demostró en estudios anteriores para PAO1 (Moya B et al 2009).

De acuerdo con los resultados obtenidos, podemos confirmar que la activación del sistema CreBC debida a la inactivación de *dacB* descrito en estudios anteriores para PAO1 (Moya B et al 2009) parece ser un principio general en *Pseudomonas aeruginosa*.

4.1.3 Papel de los mecanismos de resistencia adicionales y los polimorfismos de *AmpC* en la resistencia a β -lactámicos de las cepas originales y sus mutantes *ampD* y *dacB*.

La presencia de mecanismos de resistencia adicionales pueden modificar la sensibilidad a antibióticos β -lactámicos, para ello se evaluaron la expresión de bombas de expulsión de antibióticos mediante RT-PCR en tiempo real de los genes *mexB*, *mexC*, *mexF* y *mexY* en cada uno de los aislados.

De todas las bombas estudiadas, sólo se encontraron 3 aislados (AAR, JCC y FRM) en los que se hiperexpresaba el gen *mexY*, que codifica para la bomba MexXY-OprM, con valores de expresión entre 19 y 41 veces más alto que la cepa de referencia PAO1 (tabla 4.1). En todos ellos se mostraba una CMI más elevada para cefepime (entre 4-12 μ g/mL) que para ceftazidima (entre 1.5-3) (tabla 4.1), debida muy probablemente, a la hiperexpresión de *mexY*, como se describe en trabajos anteriores (*Hocquet D et al 2006; Peña C et al 2009*).

Otro de los aislados clínicos resultó tener una alteración en la porina OprD correspondiente a una mutación G1017A, que conduce a la aparición de un codón de parada (W339X), y cuyo fenotipo resultó ser resistente a carbapenémicos, como se puede ver en la tabla 4.1.

Tras la secuenciación de *ampC* y posterior comparación con la secuencia de PAO1, en algunas de las cepas del estudio se encontraron una serie de polimorfismos que se detallan en la tabla 4.1: T21A, G27D, A55T, T105A, y L176R; todos ellos fueron descritos previamente por Rodríguez-Martínez (*Rodríguez-Martínez JM et al 2009*). La sustitución T105A, ha sido descrita en una elevada proporción de cepas no sensibles a imipenem, y también se ha descrito su papel como potenciador de la hidrólisis de cefepime e imipenem (*Rodríguez-Martínez JM et al 2009; Rodríguez-Martínez JM et al 2009*).

Como podemos ver en la tabla 4.1, de las cuatro cepas parentales que presentaron este polimorfismo (PA14, AAR, EAL y LDP) todas ellas eran sensibles a imipenem, y sus respectivos mutantes no mostraron un incremento significativo de la CMI de dicho β -lactámico. La única cepa de la colección resistente a imipenem, resultó ser debida a la inactivación de OprD y no poseía dicho polimorfismo. Estos datos sugieren que el polimorfismo T105A no tiene efecto directo sobre la sensibilidad a imipenem u otros β -lactámicos.

4.2 Capítulo 2: Inactivación de *ampG* y *nagZ* como dianas frente a la resistencia a β -lactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*.

4.2.1.Efecto de la inactivación de NagZ y AmpG en la resistencia a antibióticos β -lactámicos y en la expresión de ampC en mutantes isogénicos hiperproductores de AmpC.

Con el fin de identificar nuevas dianas efectivas para suprimir o evitar la resistencia a β -lactámicos debida a la hiperexpresión de *ampC*, se construyeron mutantes nulos del gen *nagZ* (N-acetilglucosaminidasa) y *ampG* (permeasa de la vía de regulación de AmpC) en las cepas PAO1, PA Δ D, PA Δ dacB, PAdacB Δ D y PA Δ DDh2Dh3, siguiendo el procedimiento previamente descrito en materiales y métodos.

La tabla 4.3 muestra la sensibilidad de cada cepa parental y sus mutantes *nagZ* y *ampG* para cada antibiótico, y la expresión basales e inducidas de *ampC*. Como se puede ver en la tabla, la inactivación de *nagZ* en PAO1 redujo ligeramente las CMI de ceftazidima, imipenem y ceftoxitina; mientras que los mutantes *nagZ* de PA Δ D y PA Δ dacB (PA Δ DnZ y PA Δ dacBnZ) mostraron una disminución en los valores de las CMI de los β -lactámicos estudiados y en la expresión basal de *ampC* hasta valores/niveles similares a la cepa salvaje; pese a presentar importantes diferencias en el nivel de resistencia de cada uno de ellos: PAO1 (salvaje), PA Δ D (resistencia moderada) y PA Δ dacB (resistencia de alto nivel). Estos datos confirman estudios anteriores en los que se observó que la inactivación de *nagZ* incrementa la sensibilidad a β -lactámicos en PAO1 y en su mutante *ampD* (Asgarali A et al 2009), además de describir por primera vez la reversión del perfil de resistencia de alto nivel del mutante *dacB*.

Al contrario que en los mutantes simples, la inactivación de *nagZ* en el mutante doble *dacB-ampD* (PA Δ dacB Δ D) y en el mutante triple de *ampD* (PA Δ DDh2Dh3), no restableció los niveles de sensibilidad (tabla 4.3). No obstante, si se observó una reducción en las CMI de ceftazidima, cefepime, piperacilina-tazobactam y aztreonam hasta valores dentro del rango de sensibilidad, según los puntos de corte del CLSI. En cuanto a la expresión basal de *ampC*, ambos mutantes (PA Δ dacB Δ D, PA Δ DDh2Dh3) que inicialmente mostraban una expresión relativa mayor de 1000 veces respecto a la cepa salvaje PAO1, presentaron una drástica reducción llegando a alcanzar valores en torno a 50 veces (tabla 4.3).

En todos los casos estudiados, la inactivación de *nagZ* determinó una reducción de la expresión basal de *ampC*; sin embargo el efecto en la expresión de *ampC* en condiciones de inducción fue prácticamente inapreciable (Tabla 4.3). Estos resultados son compatibles con estudios anteriores en los que se demuestra que dicha inactivación tiene poco efecto sobre la actividad β -lactamasa inducida por la presencia de cefoxitina (Asgarali A et al 2009).

Todo ello sugiere que: i) *nagZ* juega un papel importante en el nivel basal de expresión constitutiva de *ampC*, pero no cuando la expresión de *ampC* es debida a la inducción por β -lactámicos inductores como cefoxitina e imipenem; ii) los productos de NagZ (1,6-anhidromuropéptidos) son necesarios para la activación de AmpR en ausencia de inductores β -lactámicos y para la resistencia a penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos producida por la hiperexpresión constitutiva de *ampC*. Estos datos sugieren que la inhibición de la actividad de *nagZ* en *Pseudomonas aeruginosa* podría dar lugar a un estrategia efectiva para reprimir la expresión de *ampC* durante la terapia con β -lactámicos, además de potenciar la eficacia de penicilinas y cefalosporinas antipseudomónicas frente a mutantes resistentes con mutaciones *ampD* o *dacB*.

La inactivación de *ampG* en PAO1, condujo a una hipersensibilidad a imipenem, más acusada que en la inactivación de *nagZ*. Este mismo efecto se observó en los mutantes simples *ampD* y *dacB* (PA Δ DG y PA Δ dBG) y en el mutante doble *dacB-ampD* (PA Δ dacB Δ D) con *ampG* inactivado. Además, dicha inactivación restableció la expresión de *ampC* tanto basal como inducida de todos los mutantes, a niveles de la cepa salvaje PAO1, incluso en el mutante doble *ampD-dacB* (tabla 4.3).

Este efecto sobre la inducción de *ampC*, se puede observar claramente en la figura 4.4, en la que se evalúa el antagonismo entre un potente inductor de AmpC (imipenem) y un inductor débil (ceftazidima). En esta figura podemos ver los diferentes mutantes *nagZ* ($PA\Delta nZ$, $PA\Delta DnZ$ y $PA\Delta dBnZ$) y el mutante *ampG* de PAO1($PA\Delta G$), comparado con el mutante *ampR* ($PA\Delta R$), como control de ausencia de inducción. En todos los mutantes *nagZ* estudiados, se pudo constatar la presencia de inducción (antagonismo entre imipenem y ceftazidima), a diferencia del mutante *ampG*, en el que se observó el bloqueo total del proceso de inducción, al igual que ocurre en el mutante *ampR* (figura 4.4), como evidencian los datos de expresión de *ampC* (tabla 4.3).

RESULTADOS

Tabla 4.3 Caracterización de los mutantes *nagZ* y *ampG* de los mutantes dirigidos hiperproductores de AmpC.

CEPA	CMI (µg/mL)							NIVEL RELATIVO DE EXPRESIÓN DE ARNm			
	CAZ	FEP	IMP	MER	PTZ	ATM	FOX	<i>ampC</i> ^a		<i>creD</i> ^a	
								Basal	Inducido	Basal	Inducido
PAO1	1.5	1.5	2	0.38	2	4	4096	1	78±34	1	24±9.1
PAΔnZ	1	1.5	1	0.38	2	4	2048	-2.1±1.5	469±230	1.1±0.3	54±18
PAΔG	1	1.5	0.38	0.38	2	2	128	-1.1±0.4	28±1.4	1.6±0.2	153±22.1
PAΔD	8	4	2	1	32	12	>4096	47±9.5	134±11	1.1±0.3	2.7±0.7
PAΔDnZ	2	1.5	1	0.5	3	4	2048	1.0±0.4	483±26	2.8±1.6	99±15
PAΔDG	1	1.5	0.25	0.38	2	2	128	-1.5±0.6	1.7±2.2	1.3±2.2	34.3±23.4
PAΔdB	24	12	2	0.5	64	24	4096	51±16	232±67	83±7	120±29
PAΔdBnZ	1.5	2	1	0.38	3	4	2048	3.0±1.9	661±374	4.0±0.8	95±45
PAΔdBG	1	1	0.38	0.25	1.5	2	128	-1.1±1.3	1.1±1.7	4.7±1.5	173.8±69.3
PAdacBAD	96	48	2	1.5	>256	64	>4096	1770±414	1950±480	51±24	81±40
PAdacBADnZ	4	3	1	0.5	16	8	2048	40±17	906±80	1.9±1.3	418±170
PAdacBADG	1	1.5	0.25	0.25	1.5	2	128	1.7±0.6	1.6±2.4	8.6±1.1	413.1±348.6
PAΔDDh2Dh3	24	16	2	1	>256	32	4096	1020±87	1105±88	1.3±0.3	1.6±0.7
PAΔDDh2Dh3nZ	3	3	1.5	1	8	8	4096	57±31	905±407	-1.4±0.1	1±0.3
PAΔR	2	2	0.5	0.25	4	4	128	3.8±0.4	3.3±0.8	1.6±0.1	189±8
PAΔC	1	1	0.5	0.25	2	2	128	NA	NA	1.34±0.32	622±250

a. Cantidad relativa de ARNm de *ampC* o *creD*, respecto a la cepa salvaje PAO1 ± desviación estándar; b. Expresión inducida con ceftioxitina 50µg/µL; NA: No aplicable.

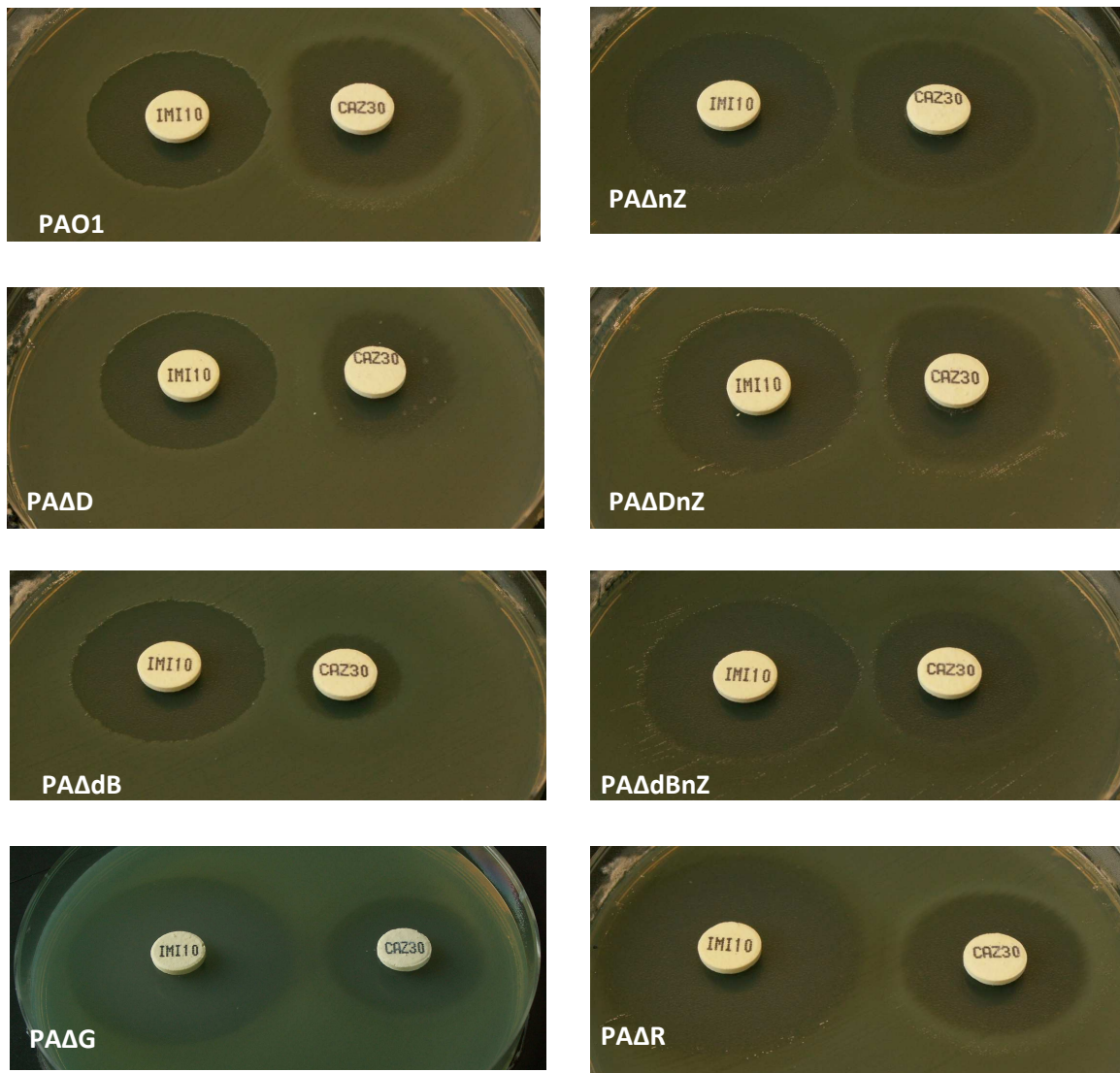


Figura 4.4 Prueba de Inducción de AmpC (ceftazidima-imipenem) en los mutantes *nagZ* de PAO1, PA Δ D y PA Δ dB, y en el mutante *ampG* de PAO1. El mutante *ampR* de PAO1 se usó como control de ausencia de inducción.

4.2.2 Efecto de la inactivación de *nagZ* y *ampG* en la resistencia a carbapenémicos de los derivados de PAO1 deficientes en *OprD*.

En el apartado anterior se ha demostrado que la inactivación de *nagZ* y *ampG* reduce las CMI de cefalosporinas y penicilinas, pero no el efecto que dichas inactivaciones tienen sobre imipenem y meropenem. Como podemos ver en la tabla 4.3 la inactivación de ambos genes en PAO1 condujo a una hipersensibilidad frente a imipenem, dicho efecto resultó ser más elevado al inactivar el gen *ampG* (pasando de una CMI de 2 a 0.38) que en la inactivación de *nagZ* (de 2 a 1). Al igual que ocurre en PAO1, la inactivación de *ampG* en cualquiera de los mutantes estudiados tuvo un efecto más drástico que la inactivación de *nagZ*, mucho más bajo en todos los casos que el valor de sensibilidad a imipenem del mutante *ampC* de PAO1 (PAΔC) con una CMI de 0.5. Estos datos sugieren que la inactivación de *ampG* podría minimizar el impacto del mecanismo de resistencia más relevante en *Pseudomonas aeruginosa* como es la inactivación de la porina *OprD*, que conduce a un incremento de la resistencia a imipenem y a una pérdida de sensibilidad a meropenem.

Para probar esta posibilidad, se construyeron mutantes *ampG* y *nagZ* de una cepa de PAO1 deficiente en *OprD* (PAOD1) (Moya B et al 2010). Dicha cepa posee una proteína *oprD* no funcional debido a un codón de parada prematuro (W65X).

La tabla 4.5, muestra la sensibilidad del mutante deficiente en *OprD* de PAO1, comparada con su cepa salvaje PAO1 y sus correspondientes mutantes *nagZ* y *ampG*. Como podemos ver el mutante deficiente en *oprD* PAOD1, tiene una resistencia a imipenem superior a 32 µg/mL, al inactivar *nagZ* en dicho mutante el valor de su CMI se redujo hasta 6 µg/mL. Esta disminución fue mucho más marcada cuando se inactivó *ampG*, pasando a mostrar una CMI para imipenem de 0.5 µg/mL, valor inferior al observado en la cepa PAO1.

Estos resultados indican que la expresión inducible de *ampC* (bloqueada por la inactivación de *ampG*) es necesaria para la resistencia a imipenem debida a la inactivación de OprD, de acuerdo con los datos publicados por Livermore (Livermore DM et al 1992).

Tabla 4.5 Sensibilidad en PAO1 deficiente en oprD y en sus mutantes *nagZ* y *ampG*.

CEPA	ALTERACIÓN <i>OprD</i> ^a	CMI ($\mu\text{g/ml}$)						
		CAZ	FEP	IMP	MER	PTZ	ATM	CIP
PAO1	W65X	1.5	1.5	2	0.38	2	4	0.094
PAOD1		1.5	1.5	>32	2	1.5	4	0.094
PAOD1ΔnZ		1.5	1.5	6	2	2	2	0.094
PAOD1ΔG		1.5	1.5	0.5	2	2	2	0.094

a. Alteración detectada sobre la secuencia de oprD del mutante de PAO1, comparada con la secuencia de PAO1.

4.2.3 Análisis poblacional de la sensibilidad y desarrollo de resistencia a diferentes concentraciones de antibióticos betalactámicos, en mutantes *nagZ* y *ampG*.

Los resultados obtenidos hasta el momento, sugieren que tanto NagZ como AmpG son necesarios para la resistencia a inductores débiles, adquirida a través de mutaciones en *ampD* y/o *dacB* que conducen a una hiperexpresión constitutiva de *ampC*. Estudios previos han demostrado que la hiperexpresión en *Pseudomonas aeruginosa* es el principal mecanismo que conduce a la resistencia frente a β -lactámicos antipseudomónicos como ceftazidima *in vitro* e *in vivo* (Juan C et al 2005; Giwercman B et al 1990).

De acuerdo con estos estudios y con los resultados obtenidos hasta el momento, el bloqueo de la función de NagZ y/ o AmpG debería prevenir la selección de mutantes resistentes a ceftazidima. Para comprobar esta hipótesis, se realizó un análisis poblacional de sensibilidad a ceftazidima en PAO1, PA Δ nZ y PA Δ AG.

La figura 4.6.1 muestra el recuento total de cada una de las cepas (en UFC/mL) en función de la concentración de antibiótico (en μ g/mL), en la que se pueden observar cuatro etapas bien diferenciadas. Una primera etapa, que se corresponde con la ausencia y concentración subinhibitoria de antibiótico (0.5 μ g/ml), en la que se observó un comportamiento prácticamente idéntico en el tamaño poblacional de las tres cepas (PAO1, PA Δ nZ y PA Δ AG) de aproximadamente $10E^9$ UFC/mL. Una segunda que coincide con la concentración perinhibitoria de antibiótico (1 μ g/ml), en la que se redujo el tamaño de PA Δ nZ y PA Δ AG (aprox. $10E^7$ UFC/mL) con respecto a PAO1 (aprox. $10E^8$ UFC/mL), sugiriendo un ligero aumento de la sensibilidad a ceftazidima en estos mutantes, a pesar de no haber diferencias significativas en cuanto a la CMI.

La tercera etapa correspondería a una concentración suprainhibitoria de ceftazidima (2-4 μ g/ml), donde los mutantes PA Δ nZ y PA Δ AG volvieron a ser similares en tamaño a PAO1 (entre $10E^5$ y $10E^4$ UFC/mL), sugiriendo que la resistencia de bajo nivel ocurre (a través de mutaciones espontáneas) con una frecuencia similar para las tres cepas. Finalmente, una cuarta etapa y la más importante, coincide con concentraciones de ceftazidima mayores o iguales a 8 μ g/ml, en la que no se observaron mutantes ni de PA Δ nZ ni de PA Δ AG, mientras que sí se mantuvo un número significativo de mutantes de alto nivel para PAO1 (aprox. $10E^3$ UFC/mL). Todos estos mutantes resistentes de PAO1 hiperproducían *ampC* y fueron resistentes a ceftazidima.

Las diferencias más notables entre ambas inactivaciones, se observaron cuando se realizó el análisis poblacional de sensibilidad a imipenem (figura 4.6.2). Mientras que en PAO1 aparecieron mutantes resistentes a concentraciones de imipenem por encima de 8 $\mu\text{g/ml}$, en PA Δ nZ se incrementó significativamente la sensibilidad a dicho carbapenémico y se redujo la concentración más alta de aparición de mutantes hasta 2 $\mu\text{g/ml}$. Este efecto fue mucho mayor para PA Δ AG en el que no aparecieron mutantes por encima de concentraciones de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (16 veces más bajo respecto a PAO1). El hecho de que no aparezcan mutantes por encima de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de imipenem, confirma el resultado obtenido en la tabla 4.5, donde la CMI en el mutante *oprD ampG* (PAOD1 Δ G) es de 0.5 $\mu\text{g/ml}$

Estos resultados, reafirman los datos obtenidos en los apartados anteriores 4.2.1 y 4.2.2. Por una parte podemos observar como a concentraciones de ceftazidima mayores o iguales a 8 $\mu\text{g/ml}$, se previene la aparición de mutantes resistentes a dicho antibiótico tanto en la inactivación de *nagZ* como de *ampG*. Por otra, podemos ver como el mutante *ampG* genera hipersensibilidad y previene el desarrollo de resistencia a imipenem, efecto que reafirma el apartado anterior 4.2.2, donde se sugería que la inactivación de *ampG* bloquea la expresión inducible de *ampC* y con ello el mecanismo más relevante de resistencia a imipenem en *Pseudomonas aeruginosa*, la inactivación de la porina *OprD*.

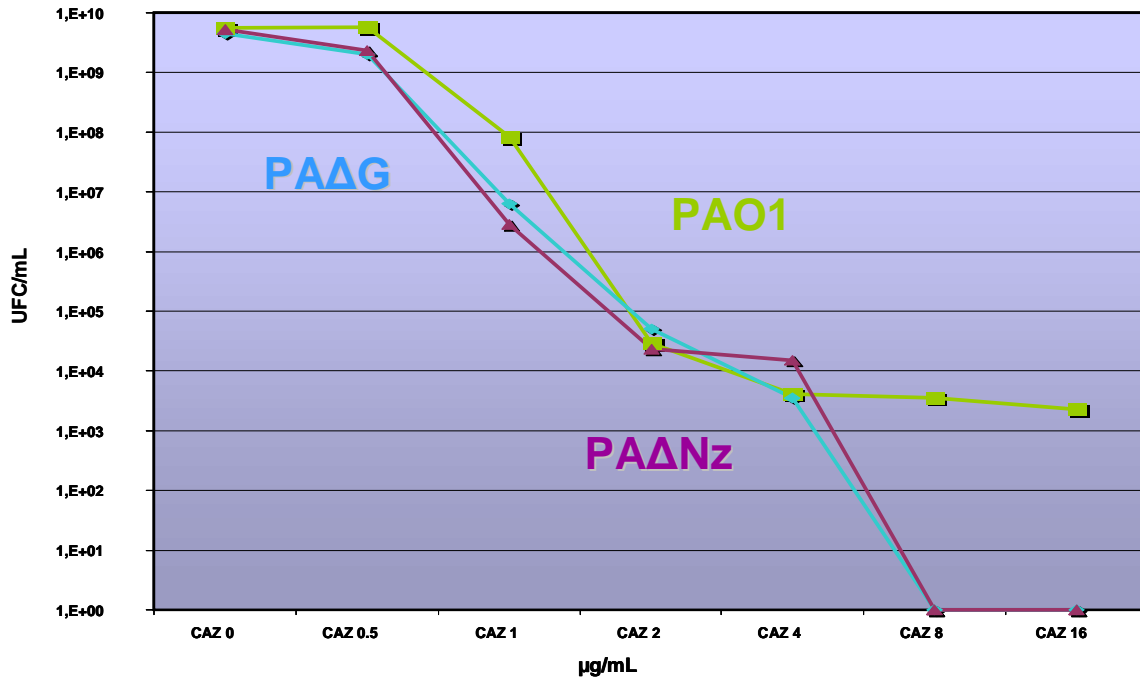


Figura 4.6.1 Análisis poblacional de sensibilidad y desarrollo de resistencia a diferentes concentraciones de ceftazidima. Los cultivos de PAO1, PAΔnZ y PAΔG, fueron plaqueados en MHA con diferentes concentraciones de ceftazidima 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 µg/mL. Los recuentos se obtuvieron tras 24h de incubación. Los resultados mostrados son medianas de tres experimentos ± desviación estándar.

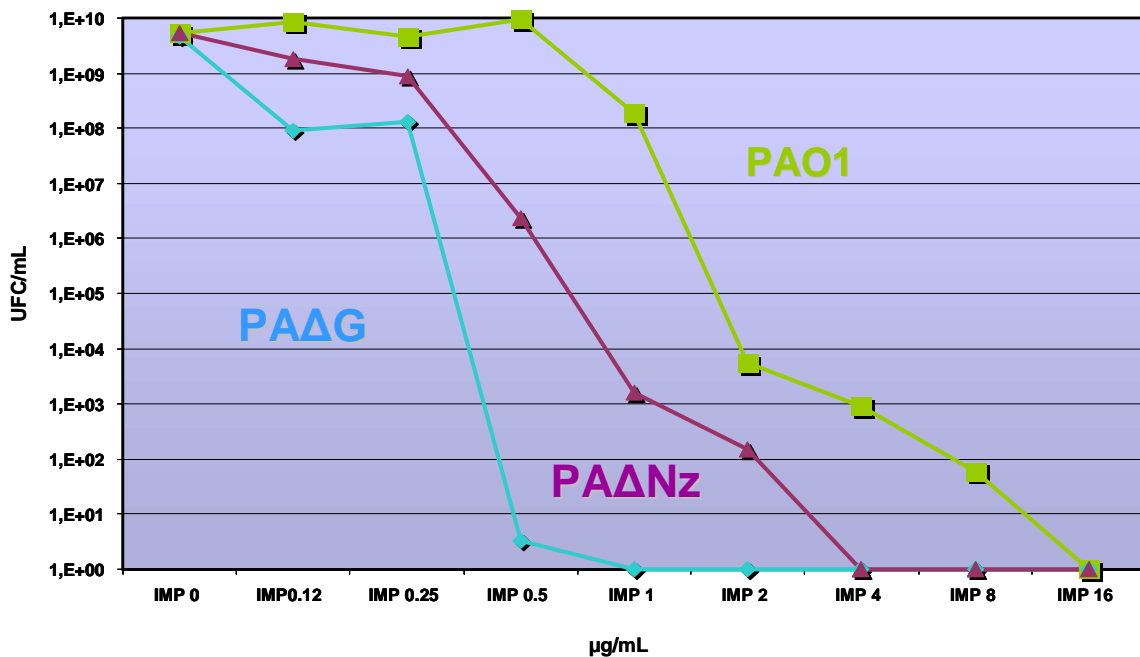


Figura 4.6.2 Análisis poblacional de sensibilidad y desarrollo de resistencia a diferentes concentraciones de imipenem. Los cultivos de PAO1, PAΔnZ y PAΔG, fueron plaqueados en MHA con diferentes concentraciones de imipenem 0, 0.12, 0.25, 1, 2, 4, 8 y 16 µg/mL. Los recuentos se obtuvieron tras 24h de incubación. Los resultados mostrados son medianas de tres experimentos ± desviación estándar.

4.2.4 Evaluación de *ampG* y *nagZ* como dianas para restablecer la sensibilidad en cepas clínicas panresistentes a β -lactámicos.

La panresistencia de *Pseudomonas aeruginosa* en el ámbito clínico es resultado de la interacción de hiperexpresión de *ampC*, inactivación de la porina OprD e hiperexpresión de alguna de sus bombas de expulsión (Lister PD et al 2009; Livermore DM 2002). En este apartado, evaluamos el efecto de la inactivación de *nagZ* y *ampG* en tres cepas clínicas panresistentes de pacientes de UCI y pertenecientes cada una de ellas a un clon diferente, como se describió en el apartado de materiales y métodos. La panresistencia de estos aislados viene determinada por un lado por la hiperexpresión de *ampC* debida a mutaciones en *ampD* y/o *dacB* descritos en estudios anteriores (Juan C et al 2005; Moya B et al 2009). En este último trabajo, además se demuestra la presencia en estas cepas de mutaciones inactivantes en OprD y la hiperexpresión de una o varias bombas de expulsión de antibióticos (Tabla 4.7).

La tabla 4.7 muestra las características de las cepas panresistentes y la sensibilidad de estas y sus mutantes *nagZ* y *ampG*, a cada uno de los antibióticos. Como se puede ver en esta tabla, tanto la inactivación de *nagZ* como de *ampG* incrementó notablemente la sensibilidad a los β -lactámicos, a pesar de observarse claras diferencias entre ellos. En los dos casos, se observó un marcado efecto sobre la sensibilidad a ceftazidima y piperacilina-tazobactam, aunque la inactivación de *ampG* tuvo mayor efecto en aquellos aislados con mutación doble en *ampD* y *dacB* (JSG2A1 y OFC2I4). Las sensibilidades a meropenem, cefepime y aztreonam también se incrementaron aunque de manera más reducida, debido al elevado impacto de hiperexpresión de bombas sobre la actividad de estos antibióticos.

Respecto a la CMI de imipenem, las diferencias más grandes se observaron en la inactivación de *ampG*, donde restauró completamente la sensibilidad de los tres aislados a valores de PAO1, aún teniendo alteraciones en la porina. Por tanto, el imipenem podría actuar como candidato óptimo en combinación con futuros inhibidores potenciales de *ampG*.

Estos datos nos indican que el papel de la inactivación de *nagZ* y *ampG* en cepas clínicas panresistentes, tienen los mismos efectos que en los mutantes de laboratorio estudiados en los apartados anteriores. La inactivación de *ampG* es la que muestra un efecto mayor tanto en la resistencia a antibióticos β -lactámicos, anulando la inducibilidad de AmpC y produciendo hipersensibilidad a β -lactámicos inductores como imipenem, bloqueando incluso la resistencia mediada por la porina OprD.

Por tanto, NagZ y AmpG pueden ser dianas útiles para prevenir y revertir la resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 4.7 Mecanismos de resistencia de las cepas panresistentes y sensibilidad de estas y sus mutantes *nagZ* y *ampG*.

Cepa	Mecanismos de Resistencia						CMI ($\mu\text{g/mL}$)						
	AmpD ^a	PBP4 ^a	OprD ^b	Expresión de bombas			CAZ	FEP	IMP	MER	PTZ	ATM	CIP
				MexB	MexY	MexF							
JSG2A1	Ins (C) en nt 481	T428P	ΔoprD	6.5	<5	<5	192	96	>32	>32	>256	128	3
JSG2A1 ΔnZ							8	16	>32	>32	24	32	3
JSG2A1 ΔG							3	8	1.5	24	8	32	3
MQB1C5	Q155X		W339X	14	21	<5	24	24	>32	>32	96	64	1
MQB1C5 ΔnZ							3	16	>32	>32	12	32	1
MQB1C5 ΔG							3	8	2	>32	12	32	0.75
OFC2I4	ΔDE	M2001I. del.D201	ΔoprD	<2	12	<5	48	24	>32	>32	>256	32	0.38
OFC2I4 ΔnZ							3	12	>32	6	16	4	0.38
OFC2I4 ΔG							1.5	8	1.5	3	3	4	0.38

a. Las mutaciones en *ampD* y *dacB* fueron obtenidas de Juan et al 2005 y Moya B et al 2009; b. Secuencia OprD de los aislados, comparado con la secuencia de PAO1; c. Nivel relativo de expresión de ARNm \pm desviación estandar.; Ins: inserción, del: delección.

4.2.5 Efecto del inhibidor molecular de *nagZ*, PUGNAc, en la actividad de los mutantes isogénicos hiperproductores de *AmpC*.

Como se ha explicado anteriormente, PUGNAc es un inhibidor de NagZ que por sí solo no tiene propiedades antimicrobianas, a pesar de aumentar su concentración hasta 5mM. Sin embargo, su efecto inhibidor aparece cuando se administra (incluso a 0.5mM) en combinación con β -lactámicos.

En trabajos anteriores, se demostró que el bloqueo de la actividad de *nagZ* con inhibidores moleculares, basados en el esqueleto de PUGNAc, atenuaba la resistencia a β -lactámicos en el mutante *ampD* de PAO1 (Asgarali A et al 2009).

En la tabla 4.8, se muestran las sensibilidades en presencia o ausencia de PUGNAc a piperacilina, aztreonam y ceftazidima, de la cepa salvaje PAO1, el mutante *ampD*, *dacB* y el mutante doble *ampD-dacB* de PAO1. Como se puede ver en la tabla, cuando PUGNAc se coadministra a 0.5mM con β -lactámicos, atenúa la resistencia a β -lactámicos en los mutantes *dacB*, incluso con mayor efecto que el descrito para el mutante *ampD*.

Un ejemplo de ello, es el valor de la CMI para ceftazidima que se redujo de 24 a 8 $\mu\text{g/ml}$ en el mutante *dacB*; mientras que en el mutante *ampD*, al administrarle la misma concentración de PUGNAc (0.5mM) la reducción fue menor: de 8 a 4 $\mu\text{g/ml}$. En el doble mutante *ampD-dacB* también se observó un ligero efecto de PUGNAc, en el que se redujo la CMI de 96 a 64 $\mu\text{g/ml}$.

En presencia de este inhibidor a una concentración de 5 mM, las CMIs de piperacilina, aztreonam y ceftazidima disminuyeron ligeramente en el mutante *dacB*, mientras que en el mutante *ampD* y el doble mutante prácticamente se mantuvieron iguales.

Si comparamos los resultados de las CMI de cada antibiótico obtenidos en presencia de PUGNAc (tabla 4.8), con las CMI en las que *nagZ* ha sido inactivado genéticamente (tabla 4.3), se pueden observar diferencias que sugieren que el inhibidor molecular PUGNAc no inhibe toda la actividad endógena de NagZ, posiblemente debido a la permeabilidad limitada del inhibidor al citosol.

Tabla 4.8 Sensibilidad de PAO1, ampD y dacB a diferentes β -lactámicos en presencia y ausencia de inhibidor

Cepa	CMI(μ g/MI)								
	PIP			ATM			CAZ		
	Ausencia PUGNAc	PUGNAc (0.5mM)	PUGNAc (5mM)	Ausencia PUGNAc	PUGNAc (0.5mM)	PUGNAc (5mM)	Ausencia PUGNAc	PUGNAc (0.5mM)	PUGNAc (5mM)
PAO1	4	4	4	3	3	3	2	2	2
PA Δ D	48	24	24	6	3	3	8	4	4
PA Δ dB	64	32	24	12	4	3	24	8	6
PA Δ cB Δ D	384	256	256	32	32	24	96	64	64

Las cepas fueron tratadas con el inhibidor de NagZ PUGNAc a concentraciones de 0.5mM y 5mM. Las CMI se determinaron por microdilución en placa.

4.3 Capítulo 3: Sistema CreBC: Interconexión con la vía de regulación de ampC y efecto sobre el fitness

4.3.1. Regulación de creD

4.3.1.1 Inducibilidad del sistema CreBC en presencia de antibióticos β -lactámicos.

CreB y CreC forman un sistema regulador de dos componentes implicado en el control metabólico que se activa durante el crecimiento en medio mínimo, descrito en *Escherichia coli* (Cariss SJL et al 2008). Este sistema de regulación (regulón cre) controla la expresión de una serie de genes, como por ejemplo *creD* que es una proteína de membrana de función todavía desconocida. En *Aeromonas spp*, existe un homólogo de este sistema llamado BlrAB y parece ser el responsable de la regulación de las β -lactamasas en esas especies (Alksne LE et al 1996; Hernandez Villadares M et al 1996; Waish TR et al 1995).

En el trabajo de Moya B (Moya B et al 2009) se demuestra que la inactivación de *dacB* en PAO1 conduce a la activación del sistema *creBC* (*BlrAB*) y a la aparición de un fenotipo de resistencia de alto nivel, incrementando las CMI de los antibióticos β -lactámicos. Esta activación del sistema CreBC, se ve reflejada en la hiperexpresión de *creD*, y esta expresión es además inducible por el inductor clásico de *ampC* (cefoxitina).

En este apartado, evaluamos si otros antibióticos β -lactámicos como ceftazidima (débil inductor de *ampC*) e imipenem (potente inductor de *ampC*) tienen algún efecto sobre el sistema *creBC*. Para ello, se realizó un estudio de la expresión del gen *creD* en PAO1, mediante RT-PCR en tiempo real, en presencia de dos concentraciones diferentes de ceftazidima e imipenem (1/4 y 1/2 de la CMI).

Como se puede observar en la tabla 4.11, la presencia de ceftazidima, al igual que ocurre sobre la expresión de *ampC*, tuvo un mínimo efecto sobre la expresión de *creD*, mostrando valores a 0.25 µg/mL y 0.50 µg/mL de 1.7 y 2.5 veces PAO1 (frente a aproximadamente 1.3 veces para la expresión de *ampC* en presencia de ceftazidima a las dos concentraciones). Por el contrario, sí se observó un efecto importante en la inducibilidad, incluso a la concentración más baja de imipenem (0.25 µg/mL), con una expresión de 34 veces (frente a una expresión de *ampC* de 193 veces PAO1), valor ligeramente más alto que en presencia de cefoxitina a 50 µg/mL (valor de expresión de 24). Este aumento en la expresión resultó ser aún más notable al incrementar la concentración de imipenem de 0.25 µg/mL a 0.5 µg/mL (1/2 de la CMI), duplicándose su expresión, al igual que ocurre con la expresión de *ampC*.

Estos resultados indican que ceftazidima e imipenem, como inductores débil y potente de la vía de AmpC, también lo son para el sistema CreBC; sugiriendo que la expresión de ambos genes siguen un mismo patrón.

Tabla 4.11: Expresión de *creD* de PAO1 en presencia de diferentes β -lactámicos a varias concentraciones

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Nivel de expresión ^a	
	<i>AmpC</i>	<i>creD</i>
PAO1	1	1
PAO1 CAZ 0,25	1.29 \pm 0.1	1.7 \pm 0.7
PAO1 CAZ 0,5	1.26 \pm 0.3	2.5 \pm 1.4
PAO1 IMP 0,25	193 \pm 20.2	34 \pm 10
PAO1 IMP 0,5	269 \pm 73.1	70 \pm 8
PAO1 FOX 50	78 \pm 34	24 \pm 9.1

a. Nivel relativo de expresión de ARNm \pm desviación estándar

4.3.1.2 Interconexión entre el sistema *creBC* y la vía de regulación de *AmpC*

Con el fin de profundizar en la conexión entre el regulador de dos componentes *creBC* y la vía de regulación de *AmpC*, se determinó la expresión de *creD*, por RT-PCR en tiempo real de una serie de mutantes deficientes en uno o varios componentes de la vía *AmpC*. La tabla 4.12 muestra los niveles de expresión de *ampC* y *creD* en cada uno de los mutantes estudiados.

La expresión de *creD* en mutantes hiperproductores de *ampC* (*PAdacB* y *PA Δ D*) fue descrito en el trabajo de Moya B (Moya B et al 2009), en el que se demuestra el bloqueo de la inducción de *creD* en el mutante *ampD* y la hiperexpresión basal e inducida de *creD* en el mutante *dacB*.

Tabla 4.12 Nivel de expresión de *ampC* y *creD* en toda la colección de mutantes en diferentes componentes de la vía AmpC

<i>Cepa</i>	<i>Nivel de ampC^a</i>		<i>Nivel de creD^a</i>	
	<i>Basal</i>	<i>Inducido^b</i>	<i>Basal</i>	<i>Inducido^b</i>
PAO1	1	78 ± 34	1	24 ± 9.1
PAOΔC	NA	NA	1.34 ± 0.32	622 ± 250
PAΔnZ	-2.1 ± 1.5	469 ± 230	1.1 ± 0.3	54 ± 18
PAΔG	-1.1 ± 0.4	1.9 ± 1	1.6 ± 0.2	153 ± 22
PAΔD	47 ± 9.5	134 ± 11	1.1 ± 0.3	2.7 ± 0.7
PAOΔDAC	NA	NA	2 ± 0.65	744 ± 347
PAΔDnZ	1.0 ± 0.4	483 ± 26	2.8 ± 1.6	99 ± 15
PAΔDG	-1.5 ± 0.6	1.6 ± 0.8	1.3 ± 0.2	47 ± 13
PAΔdB	51 ± 16	232 ± 67	83 ± 7	120 ± 29
PAΔdBnZ	3.0 ± 1.9	661 ± 374	4.0 ± 0.8	95 ± 45
PAΔDBG	-1.1 ± 1.3	1.2 ± 0.9	4.7 ± 1.5	174 ± 69
PadacB	58 ± 9	211 ± 55	37 ± 4.85	35 ± 6.70
PAdacBΔC	NA	NA	68 ± 23	895 ± 375
PAdacBΔD	1770 ± 414	1950 ± 480	51 ± 24	81 ± 40
PAdacBΔDnZ	40 ± 17	906 ± 80	1.9 ± 1.3	418 ± 170
PAdacBΔDG	1.7 ± 0.6	1.8 ± 1.5	8.6 ± 1.1	212 ± 35
PAΔDDh2Dh3	1020 ± 87	1105 ± 88	1.47 ± 0.39	1.72 ± 0.41
PAΔDDh2Dh3ΔC	NA	NA	2.18 ± 0.89	211 ± 17
PAΔDDh2Dh3nZ	57 ± 31	905 ± 407	-1.4 ± 0.1	1.0 ± 0.3
PAΔR	3.8 ± 0.4	3.3 ± 0.8	1.6 ± 0.1	189 ± 8

a. Nivel relativo de expresión de ARNm de *ampC* y *creD* ± desviación estándar; b. Inducción en presencia de cefoxitina (50ng/μL) ; NA: No aplicable

En este trabajo se evaluó la expresión de *creD* en diferentes mutantes deficientes en algún componente de la vía de AmpC (NagZ, AmpG, AmpC):

-La inactivación de *nagZ* y *ampG* en PAO1, no mostró ningún efecto apreciable sobre *creD* (tabla 4.12). Sin embargo dichas inactivaciones sí tuvieron un efecto en los mutantes hiperproductores de *ampC*. Por una parte en el mutante *ampD* (*PAΔD*) se restableció la inducibilidad del sistema CreBC; por otra, en el mutante *dacB* no mostró efecto alguno sobre la inducibilidad, pero sí se atenuó la expresión basal de *creD*, pasando de mostrar un fenotipo hiperproductor (83 veces superior a PAO1) a reducirse a unos valores únicamente 4 veces superior a PAO1. Un efecto similar se puede observar en el mutante doble *ampD-dacB* (*PAdacBΔD*), en el que se vió reducida también la expresión basal de *creD* hasta niveles entre 2 y 8 veces la expresión de PAO1. Sin embargo, un dato curioso curioso fue el hecho que la inactivación de *nagZ* en el mutante triple de *ampD* (*PAΔDDh2Dh3nZ*) no restaurase su inducibilidad.

-La inactivación de *ampC* en cada uno de los mutantes estudiados, como podemos ver en la tabla 4.12, restableció completamente la inducibilidad de *creD* en todos los mutantes, incluido el mutante triple de *ampD*.

Como podemos ver en la tabla, la expresión tanto de *ampC* como de *creD* en la cepa PAO1 se vió incrementada en presencia de inductor; sin embargo, al inactivar AmpC en PAO1, la expresión de *creD* en presencia de inductor aumentó mucho más. Este efecto también se observó en la inactivación de AmpC de todos los mutantes hiperproductores de *ampC*, incluido el mutante triple.

Este hecho se debe a que mientras la vía de regulación de AmpC es funcional, la presencia en el periplasma de un β -lactámico inductor, como la cefoxitina, induce la expresión de *ampC*. Como consecuencia de esta expresión, *ampC* hidroliza dicho β -lactámico inductor y a su vez retroalimenta negativamente la expresión del Sistema CreBC (Figura 4.13).

Por el contrario, si se bloquea *ampC*, no puede hidrolizarse la cefoxitina y por tanto puede ejercer su efecto inductor sobre el Sistema CreBC.

Sin embargo, con este modelo no podemos explicar que la inactivación de *nagZ* y/o *ampG* en el mutante *dacB* disminuyese la expresión basal de *creD*; sugierendo la existencia de algún otro componente/s participante en la regulación.

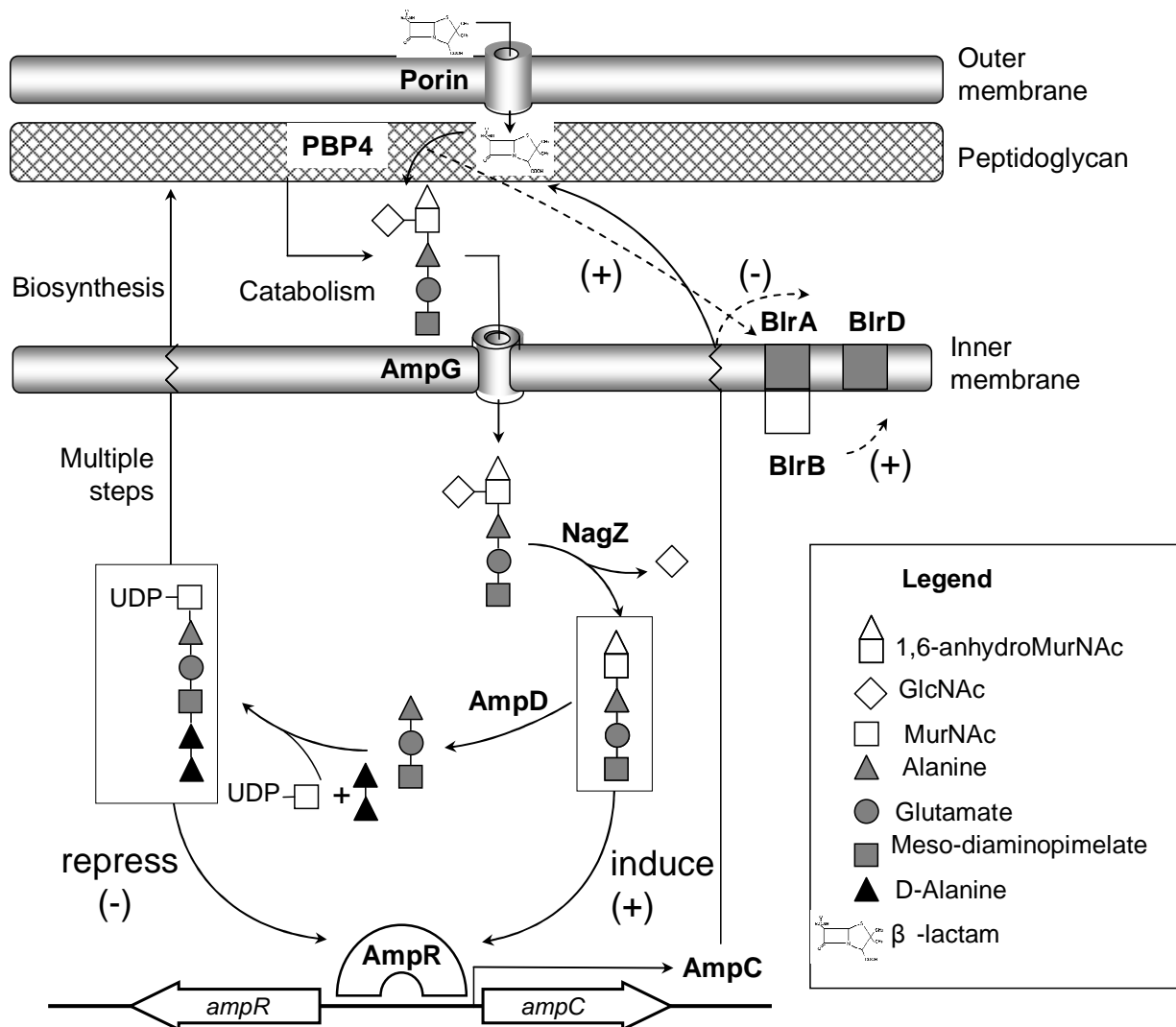


Figura 4.13. Esquema Interconexión Vía de Regulación de AmpC y Sistema CreBC.

4.3.2 Efecto de la inactivación de *creBC* y *creD* sobre la eficacia biológica *in vitro* e *in vivo*

4.3.2.1 Efecto de las mutaciones en *creBC* y *creD* sobre el crecimiento.

Con el fin de conocer el efecto de la inactivación de *creBC* y *creD* en el tiempo de duplicación, se realizaron los cálculos pertinentes de acuerdo a la fórmula descrita en materiales y métodos (apartado 3.5.2.1). La tabla 4.14 muestra los datos obtenidos del tiempo de duplicación para PAO1 y los mutantes estudiados PAO Δ *creBC* (PAO Δ *blrBC*) y PAO Δ *creD* (PAO Δ *blrD*). Estos datos fueron obtenidos de la media de tres experimentos independientes.

Tabla 4.14. Tiempo de duplicación de PAO1 y de los mutantes *creBC* y *creD*.

CEPA	TIEMPO DE DUPLICACIÓN ^a \pm DS
PAO1	29 \pm 1.60
PAO Δ <i>blrBC</i>	31 \pm 2.85
PAO Δ <i>blrD</i>	36 \pm 3.25*

a. Se realizó mediante crecimiento exponencial de cada una de las cepas, en caldo LB a 37° y 180rpm durante 2.5h aprox. (* P= 0.0294 respecto a PAO1).

Como se puede ver, el mutante *creBC* (PAO Δ *blrBC*) mostró un tiempo de duplicación muy similar al tiempo de duplicación de la cepa salvaje PAO1, con un valor medio de 31min frente a los 29min correspondientes a PAO1. Por el contrario, el mutante *creD* (PAO Δ *blrD*) sí aumentó significativamente su tiempo de duplicación en 36 min (P= 0.0294 en comparación con PAO1). Mientras que la inactivación de *creBC* no tuvo efectos significativos sobre el crecimiento, la inactivación del gen *creD* produjo cambios que afectan significativamente al crecimiento, incrementando su tiempo de duplicación.

4.3.2.2 Evaluación de la eficiencia biológica *in vitro* de los mutantes

creBC* y *creD

Para conocer si la inactivación de *creBC* y/o *creD* reduce su eficacia biológica, se realizaron experimentos de competición *in vitro* entre cada uno de los mutantes y PAO1.

Como se puede observar en la figura 4.15, los resultados revelaron que la inactivación de *creBC* y *creD* determinan una marcada disminución de la eficacia biológica. Esta disminución fue más acusada en el mutante *creD*, con un valor de índice de competición medio de 0.03 a diferencia del valor medio de *creBC* que fue de 0.40.

Un paso más en el conocimiento de la eficacia biológica, fue evaluar el efecto de esta competición en presencia de diferentes concentraciones de antibióticos β -lactámicos inductores como cefoxitina e imipenem y no inductores como ceftazidima. En este experimento, como se puede ver en las gráficas 4.15 A y B, ambos casos mostraron una clara pérdida, en ocasiones significativa, de la competitividad biológica respecto al experimento realizado en ausencia de antibióticos. Esta pérdida se hizo más notable en el mutante *creD* y mucho más en presencia de los antibióticos β -lactámicos inductores cefoxitina e imipenem que en presencia de ceftazidima, a pesar de ser una reducción también significativa.

En resumen, los resultados de los experimentos *in vitro* sugieren que la inactivación del Sistema CreBC conduce a una reducción de la eficacia biológica, mucho más marcada en presencia de β -lactámicos. Siendo más significativa la inactivación del gen *creD* en la que además se ve reducida su tasa de crecimiento, como hemos comprobado en el apartado anterior.

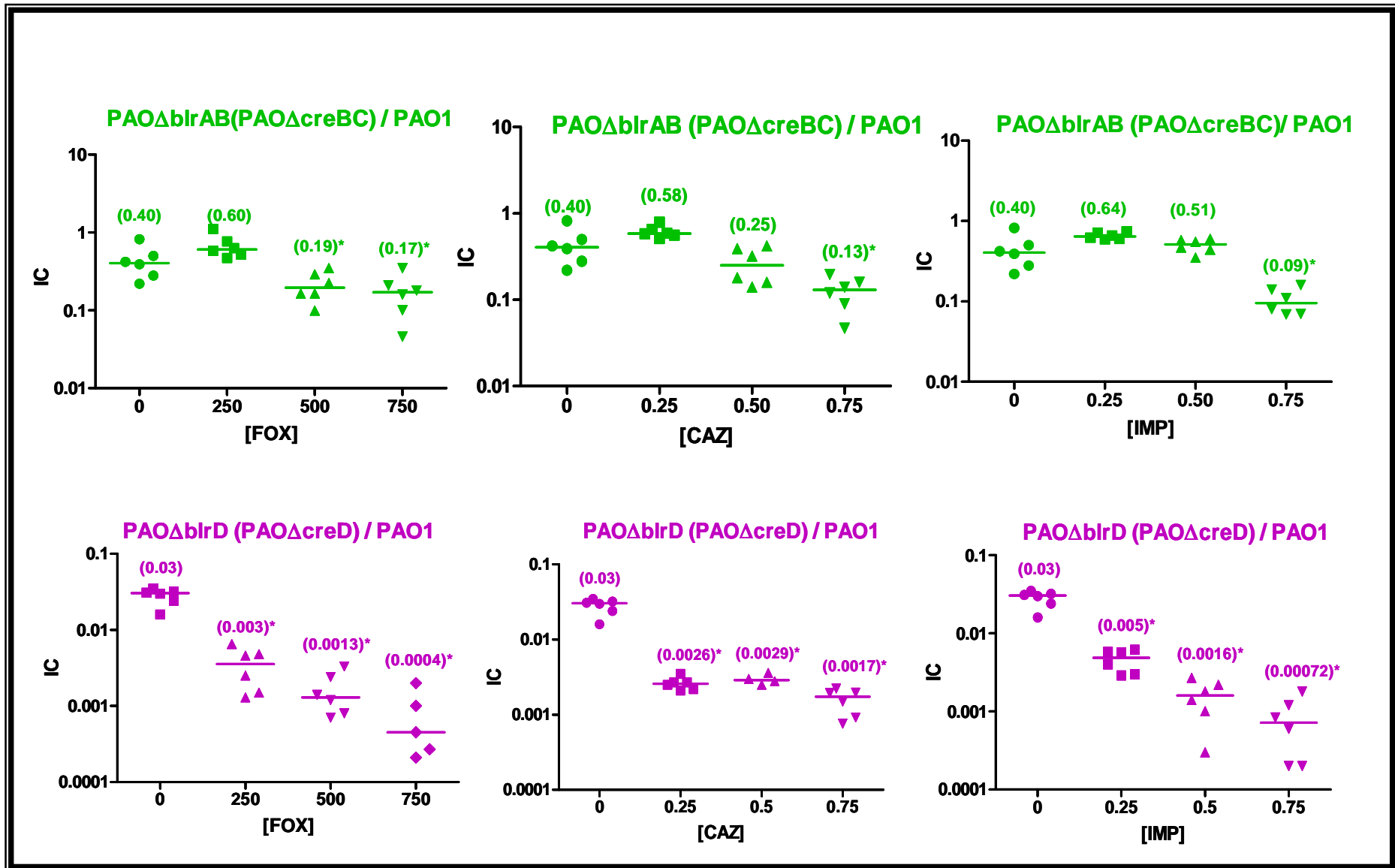


Figura 4.15 A. Índice de competición (IC) PAOΔcreBC vs PAO1 en presencia de diferentes antibióticos: Resultados de los experimentos de competición *in vitro* en ausencia y presencia de antibióticos a diferentes concentraciones. Entre paréntesis se muestra la media de los valores correspondientes de cada experimento. (*P<0.001). B. Índice de competición (IC) PAOΔcreD vs PAO1 en presencia de diferentes antibióticos: entre paréntesis se muestra la media de los valores correspondientes de cada experimento. (*P< 0.001)

4.3.2.3 Eficiencia biológica *in vivo*

Con el fin de conocer si la inactivación de *creBC* y *creD* producía los mismos efectos en *in vitro* que *in vivo*, se procedió a llevar a cabo un modelo de infección respiratoria aguda en ratones. Para ello se inocularon mediante cánula por vía traqueal un número representativo de ratones con cada una de las cepas a estudiar: PAOΔ*creBC*, PAOΔ*creD* y la cepa salvaje PAO1.

Tras 24h de incubación, los ratones infectados fueron sacrificados y se realizó el recuento de las bacterias que habían colonizado los pulmones, mediante trituración de estos y siembra en placas de MHA. El recuento de estos experimentos quedan resumidos en la gráfica 4.16. Como podemos ver en la figura, el mutante *creBC* y el mutante *creD* determinaron un recuento muy reducido de UFC/mL y claramente significativo respecto a PAO1. Estos datos concuerdan con los resultados de los experimentos *in vitro* descritos en los apartados anteriores, donde la inactivación de *creBC* y *creD* reducían su eficacia biológica. Además, la inactivación de *creD*, también disminuyó su tasa de crecimiento, con lo que es otro factor importante por el que el número de bacterias en los pulmones resultó ser más reducido que en el mutante *creBC*.

En resumen, estos resultados sugieren que tanto la inactivación de *creBC* como de *creD* en *Pseudomonas aeruginosa* reduce la eficacia biológica *in vitro* e *in vivo*. Siendo mucho más drástica la inactivación de *creD* en la que además se observa un aumento en el tiempo de duplicación, respecto a la cepa salvaje PAO1.

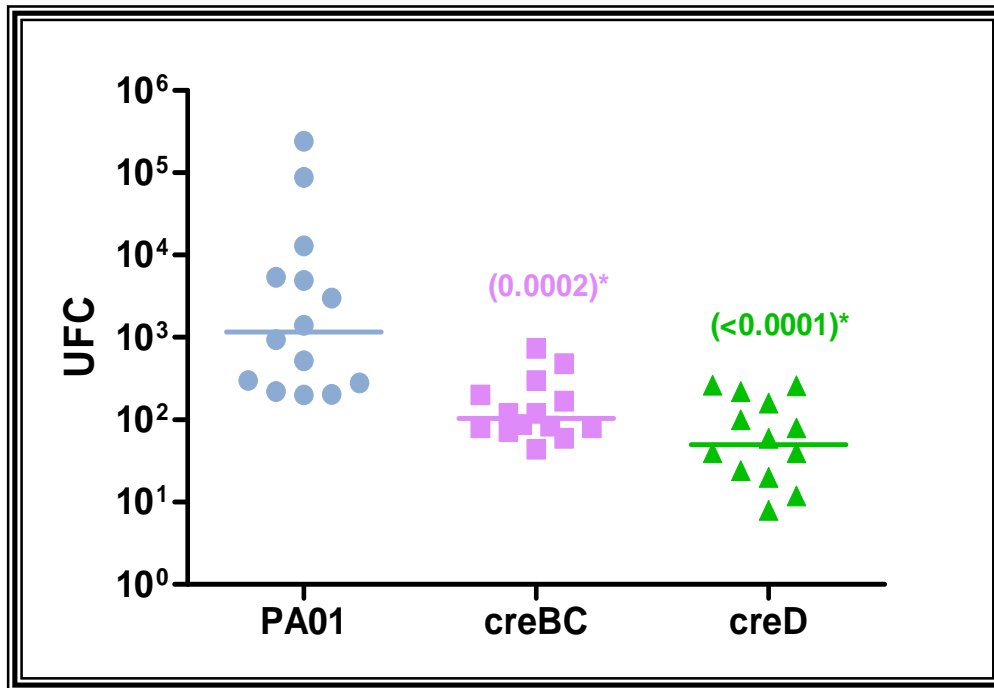


Figura 4.16 Eficiencia biológica *creBC* y *creD* vs PA01 en modelo murino

En la primera parte de este capítulo, nuestros datos revelan que el Sistema CreBC en *Pseudomonas aeruginosa* es inducible por cefoxitina e imipenem y no por ceftazidima siguiendo, por tanto, el mismo patrón que la vía de regulación AmpC. Esta inducibilidad del sistema se incrementa de manera más drástica tras la inactivación de la vía AmpC, sugiriendo que la expresión de *ampC* retroalimenta negativamente la expresión del Sistema CreBC. Mientras la β -lactamasa AmpC es funcional, el inductor es hidrolizado y como consecuencia disminuye la capacidad de inducción del Sistema CreBC; por lo que al inactivarse *ampC*, no hay hidrólisis del inductor, y se incrementa la capacidad de inducción del Sistema CreBC.

La segunda parte de este capítulo se centra en el papel fisiológico del Sistema CreBC. De acuerdo a los datos obtenidos de los experimentos *in vitro* e *in vivo* de la inactivación de *creBC* y *creD*, podemos concluir que dichas inactivaciones reducen la eficacia biológica en *Pseudomonas aeruginosa*. Esta reducción del fitness resulta ser más acusada en los mutantes *creD* y además, mucho más marcada en presencia de antibióticos β -lactámicos.

Como sabemos de trabajos anteriores, el sistema regulador de dos componentes CreBC, descrito inicialmente en *Escherichia coli*, comparte una cierta homología con el sistema regulador de *Aeromonas spp* (*BlrAB*) (Avison MB 2004; Cariss SJL et al 2008).

Por una parte, este sistema en *Escherichia coli*, controla la expresión de un número de genes que forman el regulón *cre*; que codifican (en la mayoría de casos) funciones metabólicas, y tienen una secuencia común de ADN, que parece ser que actúa como sitio de unión para el factor de transcripción, *creB* (Avison MB et al 2001; Cariss SJL et al 2008).

La activación del sistema CreBC, debe a cambios en la composición de nutrientes presentes en el medio, mediante la detección de la señal por parte de *creC* que se autofosforila y activa *creB* por fosforilación. A continuación, *creB* se une a esta secuencia de ADN conduciendo la transcripción del resto de los genes. La transcripción del regulón *cre* es totalmente dependiente tanto de *creB* y *creC*, como de esta secuencia de ADN a la que se une el factor de transcripción (Cariss SJL et al 2008).

Por otra, en *Aeromonas spp*, este sistema recibe el nombre de *BlrAB* y se encarga de regular de manera coordinada la múltiples β -lactamasas cromosómicas inducibles que posee (Alksne LE et al 1996; Avison MB, et al 2004; Niunsum P et al 2003). La producción se ve incrementada debido a la expresión de un factor de transcripción llamado *blrA*, que se une a la secuencia de ADN conduciendo la transcripción. *blrA* es activado por *blrB*, que es la proteína quinasa que detecta la señal; ambos genes forman el sistema *BlrAB* y controlan de expresión de dichas enzimas en *Aeromonas spp*. Esta secuencia de ADN a la que se une el factor de transcripción, *blrA*, presenta una elevada similitud con la secuencia de ADN del sistema CreBC.

En todos los miembros del género, *blrAB* está unido a uno de los genes reguladores de β -lactamasas, *amp*, y junto con un gen adicional, *blrD* forman el regulón *blr*. Estudios recientes en *Aeromonas hydrophila* (Tayler AE et al 2010) han demostrado que es un sistema inducible y que la alteración de PBPs de bajo peso molecular, como PBP4, está implicada en la inducción de las β -lactamasas.

En la literatura existen varios trabajos en los que se sugiere que el Sistema CreBC de *Escherichia coli*, puede regular la expresión de las β -lactamasas de *Aeromonas spp* (Avison MB et al 2000; Rasmussen BA et al 1994) ya que al introducir los genes de *Aeromonas spp*. en *Escherichia coli*, su Sistema CreBC es capaz de modular la expresión de dichos genes.

Por otra parte, en *Pseudomonas aeruginosa*, Moya B (Moya B et al 2009) describieron que la mutación en PBP4 no sólo conducía a una hiperexpresión de *ampC* sino también a una hiperexpresión de *creD*, componente del sistema CreBC; siendo un mecanismo eficiente para obtener resistencia de alto nivel a β -lactámicos en un solo paso (Moya et al 2009), indicando que el Sistema CreBC en *Pseudomonas* es más similar, desde un punto de vista funcional, al sistema BlrAB que al propio sistema CreBC. Los resultados obtenidos en este capítulo, donde se demuestra la inducibilidad del sistema CreBC y la reducción de su eficacia biológica, en presencia de β -lactámicos inductores de la vía AmpC; junto con el trabajo de Moya (Moya et al 2009), complementan un poco más el conocimiento de esta vía en *Pseudomonas aeruginosa*, demostrando su papel en la resistencia a β -lactámicos, típico del sistema BlrAB y su papel metabólico/fisiológico, propio de CreBC.

Los datos obtenidos en nuestros trabajos, a cerca de la existencia del sistema CreBC/BlrAB en *Pseudomonas aeruginosa*, junto con la capacidad de *Escherichia coli* de modular la expresión de las β -lactamasas de *Aeromonas spp.*; sugiere que ambas vías, estudiadas hasta el momento en diferentes organismos (*Escherichia coli* y *Aeromonas spp*) son un único sistema, que responde rápida y eficientemente a señales generadas en la pared y regulan la expresión de un conjunto de genes en respuesta a ambientes específicos y señales metabólicas, incluyendo la presencia de β -lactámicos.

5 CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

1. La inactivación de los genes *ampD* y/o *dacB* en PA14 y cepas clínicas, incrementan la resistencia a antibióticos β -lactámicos y la expresión de *ampC*, siendo el efecto más acusado en la inactivación de *dacB*, confirmando los datos previos en PAO1.
2. Las mutaciones en PBP4 (*dacB*) en PA14 y en las cepas clínicas, conlleva a la activación del Sistema CreBC como ocurre en PAO1.
3. El polimorfismo T105A, encontrado en algunos de los aislados clínicos, no tiene efecto directo sobre la sensibilidad a carbapenémicos u otros β -lactámicos, ni en la cepa salvaje ni en sus mutantes hiperproductores (*ampD* o *dacB*).
4. La inactivación genética de *nagZ* reduce la capacidad de adquirir resistencia a β -lactámicos y revierte los factores responsables de la resistencia, la hiperexpresión constitutiva de *ampC* y la activación del Sistema CreBC.
5. NagZ juega un importante papel en la hiperexpresión constitutiva de *ampC*, pero no cuando la expresión de *ampC* es debida a la inducción por β -lactámicos inductores como ceftioxitina e imipenem.

6. El hecho de que los productos resultantes de NagZ (1,6-anhidromuropéptidos) sean necesarios para la activación de AmpR en ausencia de inductores β -lactámicos y que la pérdida de este enzima no tenga efecto sobre la inducibilidad de AmpC, indica la existencia de otra(s) molécula(s) que active AmpR en presencia de inductores de *ampC*.
7. El inhibidor molecular de *nagZ* PUGNAc, atenúa la resistencia a β -lactámicos en mutantes isogénicos hiperproductores de AmpC. Sin embargo esta inhibición del enzima es incompleta, posiblemente debido a la limitada permeabilidad del inhibidor en el citosol.
8. La inactivación de *ampG* restablece la sensibilidad y la expresión basal e inducida de *ampC*. El bloqueo de la expresión inducible de *ampC*, minimiza la resistencia a imipenem producida por la inactivación de OprD, en mutantes de laboratorio y aislados panresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*. Por tanto, el imipenem podría actuar como candidato óptimo en combinación con futuros inhibidores potenciales de *ampG*.
9. Por todo ello, NagZ y AmpG pueden ser dianas efectivas para prevenir y revertir la emergencia de resistencia como resultado de la hiperexpresión de *ampC* debido a mutaciones en *ampD* y/o *dacB*.

10. La expresión del sistema regulador de dos componentes CreBC es inducible por cefoxitina e imipenem pero no por ceftazidima, siguiendo por tanto el mismo modelo que la vía de regulación de AmpC. La hidrólisis del β -lactámico inductor, consecuencia de la expresión de *ampC*, retroalimenta negativamente la expresión del sistema CreBC.

11. La inactivación de *creBC* o *creD*, conlleva a una reducción significativa de la eficacia biológica *in vitro* e *in vivo* en *Pseudomonas aeruginosa*. Este coste biológico resulta ser mucho más acusado en presencia de antibióticos β -lactámicos.

12. Por tanto, el sistema CreBCD podría ser un candidato para el desarrollo de moléculas que prevengan o reduzcan el desarrollo de resistencias a β -lactámicos.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aires JR, Köhler T, Nikaido H, Plésiat P. 1999. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.*;43(11):2624-8.

Alksne LE & Rasmussen BA. 1996. Expression of the AsbA1, OXA-12, and AsbM1 beta-lactamases in *Aeromonas jandaei* AER 14 is coordinated by a two-component regulon. *J Bacteriol.*;179(6):2006-13.

Araki Y, Shimada A, Ito, E. 1966. Effect of penicillin on cell wall mucopeptide synthesis in a *Escherichia coli* particulate system. *Biochim Biophys Res Commun.*; 23(4):518-25.

Asgarali A, Stubbs KA, Oliver A, Vocadlo DJ, Mark BL. 2009. Inactivation of the glycoside hydrolase NagZ attenuates antipseudomonal beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*;53(6):2274-82.

Avison MB, Horton RE, Walsh TR, Bennett PM. 2001. *Escherichia coli* CreBC is a global regulator of gene expression that responds to growth in minimal media. *J Biol Chem.* 20;276(29):26955-61.

Avison MB, Niomsup P, Nurmahomed K, Walsh TR, Bennett PM. 2004. Role of the 'cre/blr-tag' DNA sequence in regulation of gene expression by the *Aeromonas hydrophila* beta-lactamase regulator, BlrA. *J Antimicrob Chemother.*;53(2):197-202.

Bacik JP, Whitworth GE, Stubbs KA, Yadav AK, Martin DR, Bailey-Elkin BA, Vocadlo DJ, Mark BL. 2011. Molecular basis of 1,6-anhydro bond cleavage and phosphoryl transfer by *Pseudomonas aeruginosa* 1,6-anhydro-N-acetylmuramic acid kinase. *J Biol Chem*; 286(14):12283-91.

Bagge N, Ciofu O, Hentzer M, Campbell JI, 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. *Antimicrob Agents Chemother.*;46(11):3406-11.

- Balcewich MD, Reeve TM, Orlikow EA, Donald LJ, Vocadlo DJ, Mark BL.** 2010. Crystal structure of the AmpR effector binding domain provides insight into the molecular regulation of inducible ampc beta-lactamase. *J Mol Biol.*;400(5):998-1010.
- Baquero MR, Bouzon M, Quintela JC, Ayala JA, Moreno F.** 1996. dacD, an *Escherichia coli* gene encoding a novel penicillin-binding protein (PBP6b) with DD-carboxypeptidase activity. *J Bacteriol.*;178(24):7106-11.
- 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(21):7130-7140.
- Bauernfeind A, Schneider I, Jungwirth R, Sahly H, Ullmann U.** 1999. A novel type of AmpC beta-lactamase, ACC-1, produced by a *Klebsiella pneumoniae* strain causing nosocomial pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother.*;43(8):1924-31.
- Bennett PM & Chopra I.** 1993. Molecular basis of beta-lactamase induction in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.*;37(2):153-8.
- Benz R & Hancock RE.** 1981. Properties of the large ion-permeable pores formed from protein F of *Pseudomonas aeruginosa* in lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta.*;646(2):298-308.
- Bradford PA.** 2001. What's New in beta-lactamases? *Curr Infect Dis Rep.*;3(1):13-19.
- Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R.** 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.*;13(1):20-6. Review.
- Brinkman FS, Bains M, Hancock RE.** 2000. The amino terminus of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprF forms channels in lipid bilayer membranes: correlation with a three-dimensional model. *J Bacteriol.*; 182(18):5251-5.

- Brinkman FS, Macfarlane EL, Warrener P, Hancock RE.** 2001. Evolutionary relationships among virulence-associated histidine kinases. *Infect Immun* 69: 5207-5211.
- Brint JM & Ohman DE.** 1995. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol.*; 177(24):7155-7163.
- Bullock, W. O., J. M. Fernández, and J. M. Short.** 1987. XL1 Blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *BioTechniques* 5:376–378.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.*;39(6):1211-33. Review.
- Bush K, Jacoby GA.** 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Mar;54(3):969-76.
- Bush K.** 2010. Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Crit Care.*;14(3):224.Review.
- Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Tubau F, Macia MD, Rodríguez C, Moya B, Zamorano L, Suárez C, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver A; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).** 2011. Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.*;55(5):1906-11.
- Campbell JIA, Cioufu O, Hoiby N.** 1997. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis have different beta-lactamase expression phenotypes but are homogenous in the ampC-ampR genetic region. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*; 41: 1380-1384.

Cariss SJL, Constantinidou C, Patel MD, Takebayashi Y, Hobman JL, Penn CW, Avison MB. 2010. YieJ (CbrC) mediates CreBC-dependent colicin E2 tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*;192(13):3329-36.

Cariss SJL, Tayler AE, Avison MB. 2008. Defining the growth conditions and promoter-proximal DNA sequences required for activation of gene expression by CreBC in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*;190(11):3930-9.

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

Chahboune A, Decaffmeyer M, Brasseur R, Joris B. 2005. Membrane topology of the *Escherichia coli* AmpG Permease required for recycling of cell wall anhydromuropeptides and AmpC b-lactamase Induction. *Antimicrob Agents Chemother.*;49(3):1145-9.

Chang, Y. S., J. Klockgether, and B. Tummeler. 2007. An intragenic deletion in pilQ leads to nonpiliation of a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from cystic fibrosis lung. *FEMS Microbiol. Lett.* 270:201–206.

Cheng Q, Li H, Merdek K, Park JT. 2000. Molecular characterization of the beta-N-acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and its role in cell wall recycling. *J Bacteriol.*; 182(17):4836-40.

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

Ciofu O, Lee B, Johannesson M, Hermansen NO, Meyer P, Hoiby N.; Scandinavian Cystic Fibrosis Study Consortium. 2008. Investigation of the algT operon sequence in mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 115 Scandinavian patients with cystic fibrosis and in 88 in vitro non-mucoid revertants. *Microbiology.*; 154 (Pt 1):103-113.

- CLSI/NCCLS.** 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 6th ed. (M7-A6). CLSI/NCCLS, Wayne, PA.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM.** 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.*;49:711-45. Review.
- Danel F, Hall LM, Gur D, Livermore DM.** 1997. OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother*; 41: 785-790.
- Davey ME & O'toole GA.** 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.*;64(4):847-67.
- Deretic V, Schurr MJ, Boucher JC, Martin DW.** 1994. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. *J. Bacteriol.*; 176: 2773-2780.
- Doi Y & Arakawa Y.** 2007. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis.* ;45(1):88-94.
- Drlica K, Zhao X.** 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev.*;61(3):377-92. Review.
- Dubois V, Arpin C, Dupart V, Scavelli A, Coulange L, Andre C, Fischer I, Grobost F, Brochet JP, Lagrange I, Dutilh B, Jullin J, Noury P, Larribet G, Quentin C.** 2008. β -lactam and aminoglycoside resistance rates and mechanisms among *Pseudomonas aeruginosa* in French general practice (community and private healthcare centres). *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 316–323.
- El-Solh AA, Hattemer A, Hauser AR, Alhajhusain A, Vora H.** 2012. Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Crit Care* ;40(4):1157-63.

- 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*. *J Bacteriol*; 180: 5443-5447.
- Fajardo A, Martínez-Martín N, Mercadillo M, Galán JC, Ghysels B, Matthijs S, Cornelis P, Wiehlmann L, Tümmler B, Baquero F, Martínez JL.** 2008. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS One.*;3(2):e1619.
- 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.
- Fenoll A, Jado I, Vicioso D, Pérez A, Casal J.** 1998. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: update (1990 to 1996). *J Clin Microbiol* 36: 3447-3454.
- Fito-Boncompte L, Chapalain A, Bouffartigues E, Chaker H, Lesouhaitier O, Gicquel G, Bazire A, Madi A, Connil N, Véron W, Taupin L, Toussaint B, Cornelis P, Wei Q, Shioya K, Déziel E, Feuilloley MG, Orange N, Dufour A, Chevalier S.** 2011. Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. *Infect Immun.* ;79(3):1176-86.
- Fournier B, Roy PH, Lagrange PH, Philippon A.** 1996. Chromosomal beta-lactamase genes of *Klebsiella oxytoca* are divided into two main groups, blaOXY-1 and blaOXY-2. *Antimicrob Agents Chemother.*;40(2):454-9.
- Gambello MJ, Kaye S, Iglewski BH.** 1993. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (apr) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect. Immun.*; 61:1180-1184.
- García-Sánchez JE, Fresnadillo Martínez MJ, Arce Arce JJ, García Sánchez E.** 1999. Antibióticos beta-lactámicos, p 213-226. En JE García Sánchez, R López, J Prieto (eds), *Antimicrobianos en medicina*. Prous Science, Barcelona.
- Georgopapadakou NH & Liu FY.** 1980. Penicillin-binding proteins in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.*;18(1):148-57.

- Georgopapadakou NH.** 1993. Penicillin binding proteins and bacterial resistance to beta-lactams. *Antimicrob Agents Chemother*; 37: 2043-2045.
- Ghuysen J-M.** 1991. Serine β -lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev*;45:37-67.
- Giske, C. G., L. Buarø, A. Sundsfjord, and B. Wretlind.** 2008. Alterations of porin, pumps, and penicillin-binding proteins in carbapenem resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Drug Resist.* 14:23–30.
- Giwerzman B, Lambert PA, Rosdahl VT, Shand GH, Hoiby N.** 1990. Rapid emergence of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients due to in-vivo selection of stable partially derepressed β -lactamase producing strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 26:247–259.
- Goldberg JB & Pier GB.** 2000. The role of the CFTR in susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Trends Microbiol.*; 8(11):514- 20. Review.
- Govan JRW, Deretic V.** 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.*; 60: 539-574.
- Gupta V.** 2008. Metallo β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter species*. *Expert Opin. Investig. Drugs* 17, 131–143.
- Gutiérrez O, Juan C, Cercenado E, Navarro F, Bouza E, Coll P, Pérez JL, Oliver A.** 2007. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.*;51(12):4329-35.
- Ha UH, Wang Y, Jin S.** 2003. DsbA of *Pseudomonas aeruginosa* is essential for multiple virulence factors. *Infect Immun.*;71(3):1590-5.
- Hahn HP.** 1997. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Gene*;192(1):99-108. Review.

- Hassett DJ, Cuppoletti J, Trapnell B, Lyman SV, Rowe JJ, Yoon SS, Hilliard GM, Parvatiyar K, Kamani MC, Wozniak DJ, Hwang SH, McDermott TR, Ochsner UA.** 2002. Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:1425–1443.
- Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA.** 2011. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 24(1):29-70.
- Haygood MG & Neilson KH.** 1985. Mechanisms of iron regulation of luminescence in *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol.*; 162(1): 209–216.
- Hernandez Villadares M, Galleni M, Frère JM, Felici A, Perilli M, Franceschini N, Rossolini GM, Oratore A, Amicosante G.** 1996. Overproduction and purification of the *Aeromonas hydrophila* CphA metallo-beta-lactamase expressed in *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist.* (2):253-6.
- Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK.** 2008. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 29(11):996-1011.
- Hingley ST, Hastie AT, Kueppers F, Higgins ML, Weinbaum G, Shryock T.** 1986. Effect of ciliostatic factors from *Pseudomonas aeruginosa* on rabbit respiratory cilia. *Infect Immun.* ;51(1):254-62
- Hirakata Y, Srikumar R, Poole K, Gotoh N, Suematsu T, Kohno S, Kamihira S, Hancock RE, Speert DP.** 2002. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Exp Med*; 196: 109- 118.

- Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP.** 1998. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212:77–86.
- 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*. *Antimicrob Agents Chemother.* Apr;50(4):1347-51.
- Hocquet D, Roussel-Delvallez M, Cavallo JD, Plésiat P.** 2007. MexAB-OprM- and MexXY-overproducing mutants are very prevalent among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to ticarcillin. *Antimicrob Agents Chemother.*;51(4):1582-3.
- Hogardt M & Heesemann J.** 2010. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol*;300(8):557-62. Review
- Holland SP, Pulido JS, Shires TK, Costerton JW.** 1993. *Pseudomonas aeruginosa* ocular infections, p 159-176. En RB Fick Jr (ed): *Pseudomonas aeruginosa: the Opportunist*. CRC Press, Inc, Boca Raton, Fla.
- Holt JG, Kreig NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST.** 1994. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 9th ed.; p 93-94, 151-168. The Williams & Wilkins Co, Baltimore, Md.
- Jacoby GA.** 2009. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.*; 22(1):161-182 Table of Contents. Review.
- Jaffe A, Chabbert YA, Semonin O.** 1982. Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of beta-lactams. *Antimicrob Agents Chemother*; 22: 942-948.
- Jalal S & Wretlind B.** 1998. Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist.*;4(4):257-6

- Jalal S, Ciofu O, Hoiby N, Gotoh N, Wretling B.** 2000. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.*;44(3):710-2.
- Job V, Carapito R, Vernet T, Dessen A, Zapun A.** 2008. Common alterations in PBP1a from resistant *Streptococcus pneumoniae* decrease its reactivity toward beta-lactams: structural insights. *J Biol Chem.*;283(8):4886-94.
- Jones RN, Stilwell MG, Rhomberg PR, Sader HS.** 2009. Antipseudomonal activity of piperacillin/tazobactam: more than a decade of experience from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2007). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 65, 331–334.
- Jones RN.** 1998. Important and emerging β -lactamase-mediated resistances in hospital-based pathogens: the Amp C enzymes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 461–466.
- Juan C & Oliver A.** 2010. Carbapenemasas en *Pseudomonas spp.* *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 28 (Supl 1):19-28.
- Juan C, Macia MD, Gutierrez O, Vidal C, Perez JL, Oliver A.** 2005. Molecular mechanisms of β -lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother.*; 49:4733–4738.
- Juan C, Moyá B, Pérez JL, Oliver A.** 2006. Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level beta-lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrob Agents Chemother.*;50(5):1780-7.
- Juan C, Zamorano L, Pérez JL, Ge Y, Oliver A; Spanish Group for the Study of Pseudomonas; Spanish Network for Research in Infectious Diseases.** 2010. Activity of a new antipseudomonal cephalosporin, CXA-101 (FR264205), against carbapenem-resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother.*;54(2):846-51.
- Kaufmann ME.** 1998. Pulsed Field Gel Electrophoresis. *Methods Mol Med*

- Kerr KG & Snelling AM.** 2009. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect.*;73(4):338-44. Review.
- Kida Y, Higashimoto Y, Inoue H, Shimizu T, Kuwano K.** 2008. A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF-kappaB through protease-activated receptors. *Cell Microbiol.*;10(7):1491-504.
- Kiewitz C & Tümmler B.** 2000. Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution. *J Bacteriol.*;182(11):3125-35.
- Kishida H, Unzai S, Roper DI, Lloyd A, Park SY, Tame JR.** 2006. Crystal structure of penicillin binding protein 4 (dacB) from *Escherichia coli*, both in the native form and covalently linked to various antibiotics. *Biochemistry.*;45(3):783-92.
- Kiska DL, Gilligan PH.** 2003. *Pseudomonas*, p 719-728. En PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, MA Pfaller y RH Tenover (eds), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington
- Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T.** 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol. Jun*;48(6):1511-24.
- 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*. *J Bacteriol*; 189(6):2443-2459.
- Koch B, Jensen LE, Nybroe O.** 2001 A panel of Tn7-based vectors for insertion of the *gfp* gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *J Microbiol Methods* 45: 187–195.
- Köhler T, Dumas JL, van Delden C.** 2007. Ribosome protection prevents azithromycin-mediated quorum-sensing modulation and stationaryphase killing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:4243–4248.
- Köhler T, Michea-Hamzehpour M, Epp SF, Pechere JC.** 1999. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrob Agents Chemother.*; 43(2):424-427.

- Köhler T, Michea-Hamzehpour M, Plesiat P, Kahr AL, Pechere JC.** 1997. Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*;41(11):2540-3.
- Kong K-F, Aguila A, Schneper L, Mathee K.** 2010. *Pseudomonas aeruginosa* β -lactamase induction requires two permeases, AmpG and AmpP. *BMC Microbiology*; 10:328
- 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 betalactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:4567–4575.
- Kong KF, Schneper L, Mathee K.** 2010. Beta-lactam antibiotics: From antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS.*;118(1):1-36. Review.
- Kresse AU, Dinesh SD, Larbig K, Romling U.** 2003. Impact of large chromosomal inversions on the adaptation and evolution of *Pseudomonas aeruginosa* chronically colonizing cystic fibrosis lungs. *Mol. Microbiol.* 47:145–158.
- Lambert M L, Suetens C, Savey A, Palomar M, Hiesmayr M, Morales I, Agodi A, Frank U, Mertens K, Schumacher M, Wolkewitz M.** 2011. Clinical outcomes of health-care-associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to European intensive-care units: a cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 11, 30–38.
- Lambert PA.** 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med.*;95 Suppl 41:22-6. Review.
- Langaee TY, Cagnon L, Huletsky A .** 2000. Inactivation of the ampD gene in *Pseudomonas aeruginosa* leads to moderate-basal-level and hyperinducible AmpC β -lactamase expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 583–589

- Latifi, A, Winson MK, Foglino M, Bycroft BW, Stewart GS, Lazdunski A, Williams P.** 1995. Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.*; 17:333-343.
- Lee B, Haagensen JA, Ciofu O, Andersen JB, Hoiby N, Molin S.** 2005. Heterogeneity of biofilms formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 43:5247– 5255.
- Lee VT, Pukatzki S, Sato H, Kikawada E, Kazimirova AA, Huang J, Li X, Arm JP, Frank DW, Lory S.** 2007. Pseudolipasin A is a specific inhibitor for phospholipase A2 activity of *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU. *Infect Immun.* ;75(3):1089-98.
- Lee VT, Smith RS, Tummeler B, Lory S.** 2005. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immun.*; 73: 1695-1705.
- Levy SB.** 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother*; 36: 695-703.
- Lewis K, Hooper DC, Ouellette M.** 1997. Multidrug resistance pumps provide broad defense. *ASM News*, 63: 605-610.
- Lindberg F, Lindquist S, Normark S.** 1986. Induction of chromosomal beta-lactamase expression in enterobacteria. *J Antimicrob Chemother.*;18 Suppl C:43-50. Review.
- 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
- 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(4):582-610. Review.
- Livermore DM & Brown DF.** 2001. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother.*; Jul;48 Suppl 1:59-64.

- Livermore DM & Woodford N.** 2000. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol* 3: 489-495.
- Livermore DM.** 1987. Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. *Eur J Clin Microbiol.*; 6:439–445.
- Livermore DM.** 1992. Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*;36(9):2046-8.
- Livermore DM.** 1995. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.*;8(4):557-84. Review.
- Livermore DM.** 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis.*; 34:634-640.
- Mahar P, Padiglione AA, Cleland H, Paul E, Hinrichs M, Wasiak J. Burns.** 2010. *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in burns patients: Risk factors and outcomes. *Dec*;36(8):1228-33.
- Marín M, Gudíol F.** 2003. beta-Lactam antibiotics. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*;21(1):42-55.
- Mark BL, Vocadlo DJ, Oliver A.** 2011. Providing β -lactams a helping hand: targeting the AmpC β -lactamase induction pathway. *Future Microbiol.*;6(12):1415-27.
- Marshall NJ, Piddock LJ.** 1997. Antibacterial efflux systems. *Microbiology.*; 13(3):285-300. Review.
- Martínez-Martínez L, Hernández-Allés S, Albertí S, Tomás JM, Benedi VJ, Jacoby GA.** 1996. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.*;40(2):342-8.
- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T.** 2000. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*;44(12):3322-7.

- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T.** 2000. Contribution of the MexX-MexY-OprM system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:2242–2246.
- Matsubishi M.** 1994. Utilization of lipid-linked precursors and the formation of peptidoglycan in the process of cell growth and division: membrane enzymes involved in the final steps of peptidoglycan synthesis and the mechanism of their regulation. In: *Ghuysen J-M, Hakenbeck R, editors. Bacterial cell wall. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B.V.; pp. 55–72.*
- Matsukawa M & Greenberg EP.** 2004. Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol.*;186(14):4449-56.
- May TB & Chakrabarty AM.** 1994. *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. *Trends Microbiol.*; 2: 151-157
- Meberg BM, Paulson AL, Privadarshini R, Young KD.** 2004. Endopeptidase penicillin-binding proteins 4 and 7 play auxiliary roles in determining uniform morphology of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*; 186:8326–8336.
- Miller GH, Sabatelli FJ, Hare RS, Glupczynski Y, Mackey P, Shlaes D, Shimizu K, Shaw KJ.** 1997. The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms--changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups. *Clin Infect Dis* 24 (suppl 1): S46-S62.
- Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, Shen A, Zhou M, Gifford CA, Goodman AL, Joachimiak G, Ordoñez CL, Lory S, Walz T, Joachimiak A, Mekalanos JJ.** 2006. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science.* 2006 Jun 9;312(5779):1526-30.
- 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 Pathog.*;5(3):e1000353.

- Moyá B, Zamorano L, Juan C, Ge Y, Oliver A.** 2010. Affinity of the new cephalosporin CXA-101 to penicillin-binding proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*; 54(9):3933-7.
- Moya B, Zamorano L, Juan C, Pérez JL, Ge Y, Oliver A.** 2010. Activity of a new cephalosporin, CXA-101 (FR264205), against beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants selected in vitro and after antipseudomonal treatment of intensive care unit patients. *Antimicrob Agents Chemother.*;54(3):1213-7.
- Mugnier P, Dubrous P, Casin I, Arlet G, Collatz E.** 1996. A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*;40(11):2488-93.
- Muhammadi NA.** 2007. Genetics of bacterial alginate: alginate genes distribution, organization and biosynthesis in bacteria. *Curr Genomics*; 8(3):191- 202.
- Mulet X, Maciá MD, Mena A, Juan C, Pérez JL, Oliver A.** 2009. Azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: bactericidal activity and selection of nfxB mutants. *Antimicrob Agents Chemother.*;53(4):1552-60.
- Mutlu GM & Wunderink RG.** 2006. Severe pseudomonal infections. *Curr Opin Crit Care.*;12(5):458-63.
- Nealson KH & Hastings JW.** 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev.*;43(4):496-5
- Neuhaus FC, Georgopapadakou N.** 1992. Strategies in beta-lactam design, p 205-273. *Emerging targets in antibacterial and antifungal chemotherapy*. Chapman and Hall, New York, NY. 1992.
- Nikaido H.** 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J Bacteriol.*; 178(20):5853-9. Review.
- Nikaido H.** 1998. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin Infect Dis.* ;27 Suppl 1:S32-41. Review.

- Nikaido H.** 1998. The role of outer membrane and efflux pumps in the resistance of gram-negative bacteria. Can we improve drug access? *Drug Resist Updat.* 1998
- Nikaido H.** 2011. Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.*;77:1-60. Review
- Niumsop P, Simm AM, Nurmahomed K, Walsh TR, Bennett PM, Avison MB.** 2003. Genetic linkage of the penicillinase gene, amp, and blrAB, encoding the regulator of beta-lactamase expression in *Aeromonas spp.* *J Antimicrob Chemother.*;51(6):1351-8.
- Nordmann P & Guibert M.** 1998. Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.*;42(2):128-31.
- Nordmann P & Mammeri H.** 2007. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. *Future Microbiol.*;2(3):297-307. Review.
- Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R.** 1993. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*;37(5):962-9.
- Ocampo-Sosa AA, Cabot G, Rodríguez C, Roman E, Tubau F, Macia MD, Moya B, Zamorano L, Suárez C, Peña C, Domínguez MA, Moncalián G, Oliver A, Martínez-Martínez L; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).** 2012. Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.*; 56(4):1703-13.
- Oh H, Stenhoff S, Jalal S, Wretling B.** 2003. Role of efflux pumps and mutations in genes for topoisomerases II and IV in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Microb. Drug Resist.* 8:323–328.
- Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J.** 2000. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science.*; 288(5469):1251-4.

- Olvera C, Goldberg JB, Sánchez R, Soberón-Chávez G.** 1999. *Pseudomonas aeruginosa* algC gene product participates in rhamnolipids biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.*; 71: 85-90.
- O'Toole GA & Kolter R.** 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.*; 30, 295-304.
- Ouellette M, Kündig C.** 1997. Microbial multidrug resistance. *Int J Antimicrob Agents.*;8(3):179-87.
- Palleroni NJ, Kunisawa R, Contopoulou R, Doudoroff M.** 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int J Syst Bacteriol* 23: 333-339.
- Palleroni NJ.** 2003. Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiology.*;149(Pt 1):1-7.
- Park JT & Uehara T.** 2008. How Bacteria Consume Their Own Exoskeletons (Turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiol Mol Biol Rev.*;72(2):211-27.
- Parkins MD, Ceri H, Storey DG.** 2001. *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol Microbiol.*;40(5):1215-26.
- Pasloske BL, Joffe M, Sun Q, Volpel K, Paranchych W, Eftekhar F, Speert DP.** 1988. Serial isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a cystic fibrosis patient have identical pilin sequences. *Infect. Immun.* 56:665– 672.
- Paterson DL, Bonomo RA.** 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol Rev.* 2005; 18:657-686.
- Pearson JP, Van Delden C, Iglewski BH.** 1999. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol*; 81: 1203-1210.

- Peña C, Suarez C, Tubau F, Juan C, Moya B, Dominguez MA, Oliver A, Pujol M, Ariza J.** 2009. Nosocomial outbreak of a non-cefepime-susceptible ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strain overexpressing MexXY-OprM and producing an integron-borne PSE-1 beta-lactamase. *J Clin Microbiol.*;47(8):2381-7.
- Pérez-Pérez FJ & Hanson ND.** 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.*;40(6):2153-62.
- Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, Iglewski BH.** 1997. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*; 179(10):3127-3132.
- Philippon A, Arlet G, Jacoby GA.** 2002. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.*;46(1):1-11.
- Philippon A, Arlet G, Lagrange PH.** 1994. Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*;13 Suppl 1:S17-29. Review.
- Piddock LJV, Hall MC, Bellido F, Bains M, Hancock RE.** 1992. A pleiotropic, posttherapy, enoxacin-resistant mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*; 36, 1057–1061.
- Poirel L, Magalhaes M, Lopes M, Nordmann P.** 2004. Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene blaSPM-1-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 48:1406-1409.
- Poole K, Tetro K, Zhao Q, Neshat S, Heinrichs DE, Bianco N.** 1996. Expression of the multidrug resistance operon mexA-mexB-oprM in *Pseudomonas aeruginosa*: mexR encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob Agents Chemother.* ;40(9):2021-8.
- Poole K.** 2001 Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr. Opin Microbiol.*;4(5):500-8.

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

Poole K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*; 56: 20-51

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

Qiu X, Gurkar AU, Lory S. 2006. Interstrain transfer of the large pathogenicity island (PAPI-1) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 103(52):19830-19835.

Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. 2006. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.*;50(5):1633-41.

Queenan AM, Shang W, Bush K, Flamm RK. 2010. Differential selection of single-step AmpC or efflux mutants of *Pseudomonas aeruginosa* by using cefepime, ceftazidime, or ceftobiprole. *Antimicrob Agents Chemother*;54(10):4092-7.

Quénéé L, Lamotte D, Polack B. 2005. Combined sacB-based negative selection and cre-lox antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechniques* 38:63–67.

Ramirez MS & Tolmasky ME. 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat.*;13(6):151-71. Review

Rasmussen B A, Keeney D, Yang Y, Bush K. 1994. Cloning and expression of a cloxacillin-hydrolyzing enzyme and a cephalosporinase from *Aeromonas sobria* AER 14M in *Escherichia coli*: requirement for an *E. coli* chromosomal mutation for efficient expression of the class D enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:2078–2085.

- Read RC, Roberts P, Munro N, Rutman A, Hastie A, Shryock T, Hall R, McDonald-Gibson W, Lund V, Taylor G.** 1992. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *J Appl Physiol.*; 72(6):2271-2277.
- Reisbig MD, Hossain A, Hanson ND.** 2003. Factors influencing gene expression and resistance for Gram-negative organisms expressing plasmid-encoded ampC genes of Enterobacter origin. *J Antimicrob Chemother.*;51(5):1141-51.
- Remans K, Vercammen K, Bodilis J, Cornelis P.** 2010. Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* ;156(Pt 9):2597-607.
- 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. *J Antimicrob Chemother.*;66(9):2022-7.
- Riera E, Macià MD, Mena A, Mulet X, Pérez JL, Ge Y, Oliver A.** 2010. Antibiofilm and resistance suppression activities of CXA-101 against chronic respiratory infection phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. *J Antimicrob Chemother.*;65(7):1399-404.
- Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P.** 2009. Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*; 53(5):1766-71.
- Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P.** 2009. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*; 53(11):4783-8.
- Romeis T, Höltje JV.** 1994. Penicillin-binding protein 7/8 of *Escherichia coli* is a DD-endopeptidase. *Eur J Biochem.*;224(2):597-604.

Roy-Burman A, Savel RH, Racine S, Swanson BL, Revadigar NS, Fujimoto J, Sawa T, Frank DW, Wiener-Kronish JP. 2001 . Type III Protein Secretion Is Associated with Death in Lower Respiratory and Systemic *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J. Infect. Dis*;183: 1767-1764.

Sader HS, Rhomberg PR, Farrell DJ, Jones RN. 2011. Antimicrobial activity of CXA-101, a novel cephalosporin tested in combination with tazobactam against *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacteroides fragilis* strains having various resistance phenotypes. *Antimicrob Agents Chemother.*;55(5):2390-4.

Saint-Onge A, Romeyer F, Lebel P, Masson L, Brousseau R. 1992. Specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 lipoprotein I gene as a DNA probe and PCR target region within the Pseudomonadaceae. *J Gen Microbiol.*;138(4):733-41.

Salyers AA & Whitt DD. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* and related species: a lesson in versatility, p 247-261. *En Bacterial pathogenesis: a molecular approach, 2ª ed.* ASM, Washington, DC.

Sanders CC, Sanders WE Jr. 1986. Type I beta-lactamases of gram-negative bacteria: Interactions with beta-lactam antibiotics. *J Infect Dis.* 1986 Nov;154(5):792-800.

Sanders CC. 1987. Chromosomal cephalosporinases responsible for multiple resistance to newer beta-lactam antibiotics. *Annu Rev Microbiol.*;41:573-93. *Review.*

Sato H & Frank DW. 2004. ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Mol Microbiol* 53: 1279-1290.

Schmidtke AJ & Hanson ND. 2006. Model system to evaluate the effect of *ampD* mutations on AmpC-mediated beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother.*; 50(6):2030-7.

Simon, R., U. Priefer, and A. Puhler. 1983. A broad range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gramnegative bacteria. *Biotechnology* 1:784–791.

Smith E E, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D’Argenio DA, Miller SI, Ramsey VW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson MV. 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:8487–8492.

Spratt BG & Pardee AB. 1975. Penicillin-binding proteins and cell shape in *E. coli*. *Nature.* ;254(5500):516-7.

Stead DE. 1992. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas spp.* by using cellular fatty acid profiles. *Int J Syst Bacteriol* 42: 281-295.

Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.*;56:187-209. *Review.*

Storey DG, Ujack EE, Rabin HR, Mitchell I. 1998. *Pseudomonas aeruginosa* lasR transcription correlates with the transcription of lasA, lasB, and toxA in chronic lung infections associated with cystic fibrosis. *Infect Immun*; 66: 2521-2528.

Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, L. Goltry, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*; 406: 959-964.

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

Stubbs, K. A., M. Balcewich, B. L. Mark, and D. J. Voadlo. 2007. Small molecule inhibitors of a glycoside hydrolase attenuate inducible AmpC mediated beta-lactam resistance. *J. Biol. Chem.* 282:21382–21391

Studemeister AE & Quinn JP. 1988. Selective imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* associated with diminished outer membrane permeability. *Antimicrob Agents Chemother.*;32(8):1267-8.

Sutherland I. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology.*;147(Pt 1):3-9. Review.

Taylor AE, Ayala JA, Niumsup P, Westphal K, Baker JA, Zhang L, Walsh TR, Wiedemann B, Bennett PM, Avison MB. 2010. Induction of beta-lactamase production in *Aeromonas hydrophila* is responsive to beta-lactam-mediated changes in peptidoglycan composition. *Microbiology*; 156(Pt 8):2327-35.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233-2239.

Toder DS, Ferrell SJ, Nezezon JL, Rust L, Iglewski BH. 1994. *lasA* and *lasB* genes of *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of transcription and gene product activity. *Infect Immun*; 62: 1320-1327

Toder DS, Gambello MJ, Iglewski BH. 1991. *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of *lasR*. *Mol Microbiol*; 5: 2003-2010.

Tomás M, Doumith M, Warner M, Turton JF, Beceiro A, Bou G, Livermore DM, Woodford N. 2010. Efflux Pumps, OprD Porin, AmpC β -Lactamase, and Multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(5):2219-24.

Vahaboglu H, Coskuncan F, Tansel O, Ozturk R, Sahin N, Koksali I, Kocazeybek B, Tatman-Otkun M, Leblebicioglu H, Ozinel MA, Akalin H, Kocagoz S, Korten V. 2001. Clinical importance of extended-spectrum beta-lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Med Microbiol.* Jul;50(7):642-5.

- Van Heijenoort J.** 2001. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology*.;11(3):25R-36R. Review.
- van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJ.** 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol.*;2:203.
- Veesenmeyer JL, Hauser AR, Lisboa T, Rello J.** 2009. *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Therapy: Evolving Translational Strategies. *Crit Care Med.*; 37(5): 1777–1786.
- 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(11):4930-3.
- Vila J, Navia M, Ruiz J, Casals C.** 1997. Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother*; 41: 2757-2759.
- Vötsch W & Templin MF.** 2000. Characterization of a beta -N-acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and elucidation of its role in mucopeptide recycling and beta-lactamase induction. *J Biol Chem.*;275(50):39032-8.
- Walsh TR, Payne DJ, MacGowan AP, Bennett PM.** 1995. A clinical isolate of *Aeromonas sobria* with three chromosomally mediated inducible b-lactamases: a cephalosporinase, a penicillinase and a third enzyme, displaying carbapenemase activity. *J Antimicrob Chemother* 35, 271–279.
- Walsh TR, Stunt RA, Nabi JA, MacGowan AP, Bennett PM.** 1997. Distribution and expression of b-lactamase genes among *Aeromonas spp.* *J Antimicrob Chemother* 40, 171–178.
- Walther-Rasmussen J, Hoiby N.** 2006. OXA-type carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.*;57(3):373-83. Review.

- Wang J, Zhou JY, Qu TT, Shen P, Wei ZQ, Yu YS, Li LJ.** 2010. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Chinese hospitals. *Int J Antimicrob Agents.*;35(5):486-91.
- Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S.** 1991. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*; 35: 147-151.
- Waters CM & Bassler BL.** 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:319-46.
- Webber MA & Piddock LJ.** 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother.*;51(1):9-11. Review.
- West S E, Schweizer HP, Dall C, Sample AK, Runyen- Janecky LJ.** 1994. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 148:81–86.
- Whitchurch CB, Erova TE, Emery JA, Sargent JL, Harris JM, Semmler AB, Young MD, Mattick JS, Wozniak DJ.** 2002. Phosphorylation of the *Pseudomonas aeruginosa* response regulator AlgR is essential for type IV fimbria-mediated twitching motility. *J Bacteriol.*; 184(16):4544-54.
- Wilhelm S, Tommassen J, Jaeger KE.** 1999. A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 181(22):6977-86.
- Woodruff WA & Hancock REW.** 1988. Construction and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* protein F-deficient mutants after in vitro and in vivo insertion mutagenesis of the cloned gene. *J Bacteriol.*; 170, 2592–2598.
- Xie Z-D, Hershberger CD, Shankar S, Ye RW, Chakrabarty AM.** 1996. Sigma factor anti- sigma factor interaction in alginate synthesis: inhibition of AlgT by MucA. *J. Bacteriol.*; 178: 4990-4996.

- Yankaskas JR, Marshall BC, Sufian B, Simon RH, Rodman D.** 2004. Cystic fibrosis adult care: consensus conference report. *Chest.*;125(1 Suppl):1S-39S. *Review.*
- Yokoyama K, Doi Y, Yamane K.** 2003. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*; 362:1888–93.
- Zamorano L, Juan C, Fernández-Olmos A, Ge Y, Cantón R, Oliver A.** 2010. Activity of the new cephalosporin CXA-101 (FR264205) against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically-infected cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect.*;16(9):1482-7.
- Zhanel GG, Baudry PJ, Tailor F, Cox L, Hoban DJ, Karlowsky JA.** 2009. Determination of the pharmacodynamic activity of clinically achievable tigecycline serum concentrations against clinical isolates of *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases, AmpC beta-lactamases and reduced susceptibility to carbapenems using an in vitro model. *J Antimicrob Chemother.*;64(4):824-8.
- Zhang Y, Bao Q, Gagnon LA, Huletsky A, Oliver A, Jin S, Langaee T.** 2010. *ampG* gene of *Pseudomonas aeruginosa* and its role in β -lactamase expression. *Antimicrob Agents Chemother.*;54(11):4772-9.
- Zhao W H & Hu Z Q.** 2010. β -lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit. Rev. Microbiol.* 36, 245–258.

7 ANEXO I

7 ANEXO I

REACTIVOS CAMPO PULSADO

TRIS-HCl (pH 7,6) 2M	Desoxicolato 10%
NaCl 5M	Sarcosil 20%
EDTA 0,5M (pH 7,6)	Bromuro de etidio 500µg/mL
EDTA 0,5M (pH 9-9,5)	Brij58 5%
RNAsa 10mg/mL	Proteinasa K
Lisozima 10mg/mL	Enzimas de restricción: <i>SpeI</i>
BSA	Agarosa "low-melt" y megabase

Solución TE (1L):

EDTA (pH 7,6) 0,5M	2mL
TRIS-HCl (pH 7,6) 2M	5mL
Agua destilada estéril	hasta 1L

Solución TBE 5X (1L):

Acido bórico	27,5g
TRIS	54g
EDTA (pH 7,6) 0,5M	20mL
Agua destilada estéril	hasta 1L

Solución de lisis EC (30mL):

TRIS-HCl (pH 7,6) 2M	90µL
NaCl 5M	6mL
EDTA (pH 7,6) 0,5M	6mL
Brij58 5%	3mL
Desoxicolato 10%	600 µL
Sarcosil 20%	1500µL
RNAsa 10 µg/mL	60 µL
Lisozima 10 µg/mL	300 µL
Agua destilada estéril	hasta 30mL

Solución ESP (30mL):

EDTA (pH 9-9,5) 0,5M	28,5mL
Proteínasa K	1,5mg
Sarcosil 20%	1500 µL

Solución PIV (30mL):

TRIS-HCl (pH 7,6) 2M	0,15mL
NaCl 5M	6mL
Agua destilada estéril	24mL

REACTIVOS ELECTROPORACIÓN

LB líquido

MgCl₂ 1M

Glucosa 1M

MgSO₄ 1M

HEPES 0,5M (pH 7,0)

NaCl 5M

KCl 1M

Solución SMEB (500mL):

HEPES	1mL
MgCl ₂ 1M	0,5mL
Sacarosa	51,3g
Agua destilada	hasta 500mL

Solución SOB (100mL):

Triptona	2g
Extracto de levadura	0,5g
NaCl 5M	200 µL
KCl 1M	250µL
MgCl ₂ 1M	1mL
MgSO ₄ 1M	1mL
Agua destilada	hasta 100mL

Solución SOC (20mL):

Glucosa 1M	0,4mL
SOB	20mL

MEZCLAS PCR Y RT-PCR EN TIEMPO REAL**PCR**

Master MIX (volumen final: 100 µl por reacción)	
Reactivos	Volumen (µl por reacción)
Buffer II (10x)	10
DMSO	10
MgCl ₂ (25 mM)	6
dNTPs (10mM)	2
Taq polimerasa (5 unidades/µl)	1
Cebador F (100 µm)	1
Cebador R (100 µm)	1
Agua destilada	69
ADN molde	1

RT-PCR en tiempo real

Master MIX (volumen final: 25.25 µl por reacción)	
Reactivos	Volumen (µl por reacción)
2X RT-PCR master mix	12.5
Quantitec RT mix	0.25
Cebador F (100µm)	0.1
Cebador R (100µm)	0.1
Agua destilada (libre de RNAsa)	11.3
ARN molde (50ng/ µL)	1

8 ANEXO II

8 ANEXO II

ARTICULOS PUBLICADOS

1. Zamorano L, Moyá B, Juan C, Oliver A. 2010. Differential beta-lactam resistance response driven by ampD or dacB (PBP4) inactivation in genetically diverse *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Antimicrob Chemother.*;65(7):1540-2. Epub 2010 Apr 30.

2. Zamorano L, Reeve TM, Deng L, Juan C, Moyá B, Cabot G, Vocadlo DJ, Mark BL, Oliver A. 2010. NagZ inactivation prevents and reverts beta-lactam resistance, driven by AmpD and PBP 4 mutations, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*;54(9):3557-63. Epub 2010 Jun 21

3. Zamorano L, Reeve TM, Juan C, Moyá B, Cabot G, Vocadlo DJ, Mark BL, Oliver A. 2011. AmpG inactivation restores susceptibility of pan-beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother.*;55(5):1990-6. Epub 2011 Feb 28.

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dkq142

Differential β -lactam resistance response driven by *ampD* or *dacB* (PBP4) inactivation in genetically diverse *Pseudomonas aeruginosa* strains

Laura Zamorano, Bartolomé Moyá, Carlos Juan and Antonio Oliver*

Servicio de Microbiología and Unidad de Investigación, Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS), Palma de Mallorca, Spain

*Corresponding author. Servicio de Microbiología, Hospital Son Dureta, C. Andrea Doria N° 55, 07014 Palma de Mallorca, Spain.
Tel: +34-971-175-148; Fax: +34-971-175-185;
E-mail: antonio.oliver@ssib.es

Keywords: AmpC, antibiotic resistance, β -lactamases

Sir,
The hyperproduction of the chromosomal β -lactamase AmpC is the most frequent and relevant mechanism of resistance to penicillins and cephalosporins in *Pseudomonas aeruginosa*.^{1,2} The aim of this study was to explore whether the available information on the *P. aeruginosa* PAO1 background,³ showing that *dacB* (encoding PBP4) inactivation leads to AmpC hyperproduction and the specific activation of the CreBC (BlrAB) system, determining high-level β -lactam resistance, in contrast to classical *ampD* inactivation,⁴ is a general principle in *P. aeruginosa*.

For this purpose, *ampD* and *dacB* knockout mutants of strains PAO1, PA14 and eight genetically unrelated ceftazidime-susceptible clinical isolates were constructed following well-established procedures based on the *cre-lox* system for gene deletion and antibiotic resistance marker recycling in *P. aeruginosa*.^{3,4} All clinical isolates were obtained from blood cultures of patients admitted to Son Dureta Hospital Intensive Care Unit (ICU) during 2008. Isolates were selected using the following criteria: (i) wild-type ceftazidime susceptibility (defined as MICs <4 mg/L); and (ii) each belonging to a different PFGE clonal type.

The MICs (Etest) of ceftazidime, cefepime, piperacillin/tazobactam, imipenem and meropenem, and the *ampC* and *creD* expression levels, determined by real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) as previously described,³ for wild-type strains and their respective *ampD* or *dacB* mutants are shown in Table 1. The inactivation of *ampD* or *dacB* significantly increased *ampC* expression, but a remarkable variability was observed between strains, ranging from 1.6- to 294-fold (median 67-fold) for *ampD* and from 5.6- to 298-fold (median 106-fold)

for *dacB*. The lowest increases were observed for PA14, while PAO1 showed increases close to the median values (Table 1). Despite diversity, no significant differences were observed in the quantitative effect on *ampC* expression produced by *ampD* or *dacB* inactivation. On the other hand, *dacB* inactivation produced significantly higher MICs of antipseudomonal penicillins and cephalosporins than *ampD* inactivation (Table 1). As an example, while *ampD* inactivation produced a median ceftazidime MIC increase of 2 log₂, *dacB* inactivation produced a 3.5 log₂ increase ($P=0.001$, paired *t*-test). In agreement with previous data for PAO1, increased MICs correlated with the activation of the CreBC (BlrAB) system; whereas *ampD* inactivation did not significantly modify the expression of *creD* (*blrD*), a gene known to be regulated by this system, *dacB* inactivation resulted in *creD* overexpression in all strains (median increase 7.5-fold).

The presence of frequent additional resistance mechanisms that could modify β -lactam susceptibility was explored in the clinical strains. The expression of genes coding for MexAB-OprM (*mexB*) and MexXY-OprM (*mexY*) efflux pumps was determined by real-time RT-PCR, following previously described protocols,⁵ and *ampC* and *oprD* genes (the latter only for imipenem-resistant isolates) were fully sequenced in the studied strains from two independent PCR products. None of them overexpressed *mexB*, whereas three (AAR, JCC and FRM) overexpressed *mexY* (19- to 41-fold higher expression than PAO1), probably accounting for the observed higher basal cefepime MICs, compared with those of ceftazidime, in these strains. Additionally, one of the clinical strains (GGF) was carbapenem resistant, due to a G to A mutation in nucleotide 1017 of *oprD*, leading to the origination of a premature stop codon (W339X).

The polymorphisms detected in AmpC sequences of the clinical isolates and strain PA14, compared with PAO1, are also shown in Table 1. Previously reported polymorphisms T21A, G27D, A55T, T105A and L176R were detected in several isolates.⁶ The T105A substitution has been previously detected in a high proportion of imipenem non-susceptible strains, and has been shown to enhance hydrolysis of cefepime and imipenem.⁶ For this reason, AmpC enzymes containing this polymorphism have been designated extended-spectrum AmpC (ESAC). We nevertheless did not observe any effect of this polymorphism on cefepime or imipenem MICs, either for wild-type strains or for their respective *ampD* or *dacB* AmpC-hyperproducing mutants (Table 1).

In conclusion, *dacB* inactivation leads to increased β -lactam MICs and *ampC* and *creD* (*blrD*) overexpression in diverse *P. aeruginosa* strains, but with a significant strain-specific variability with regard to the quantitative effect.

Funding

This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain and Instituto de Salud Carlos III, through the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI C03/14 and RD06/0008), and grants SAF2006-08154 and PS09/00033.

Table 1. Effects of *ampD* or *dacB* inactivation on the 10 *P. aeruginosa* strains with regard to β -lactam MICs and *ampC* and *creD* (*blrD*) expression

Strain	MIC (\log_2 MIC increase) ^a							ampC level ^b (fold increase)	blrD level ^b (fold increase)	AmpC polymorphisms ^c
	CAZ	FEP	TZP	IPM	MEM					
PAO1	1.5	1.5	3	1.5	0.38			1	1	
Δ <i>ampD</i>	6 (2)	3 (1)	16 (2.5)	1.5 (0)	1 (1.5)			45 (45)	1.2 (1.2)	
Δ <i>dacB</i>	32 (4.5)	12 (3)	96 (5)	1.5 (0)	0.5 (0.5)			80 (80)	95 (95)	
PA14	1.5	1.5	4	0.75	0.19			6.4	11	G27D/A55T/T105A/G391A
Δ <i>ampD</i>	3 (1)	2 (0.5)	6 (0.5)	0.75 (0)	0.19 (0)			10 (1.6)	6.5 (0.6)	
Δ <i>dacB</i>	4 (1.5)	4 (1.5)	8 (1)	0.75 (0)	0.19 (0)			36 (5.6)	21 (1.9)	
AAR	1.5	8	4	1	0.25			2.5	2.7	G27D/A55T/T105A/G391A
Δ <i>ampD</i>	8 (2.5)	12 (0.5)	24 (2.5)	1.5 (0.5)	0.75 (1.5)			221 (88)	1.2 (0.4)	
Δ <i>dacB</i>	16 (3.5)	12 (0.5)	32 (3)	1 (0)	0.25 (0)			422 (169)	24 (8.9)	
EAL	1.5	1.5	3	1.5	0.25			0.3	1.2	G27D/T105A/G391A
Δ <i>ampD</i>	2 (0.5)	2 (0.5)	6 (1)	2 (0.5)	0.5 (0.5)			4.3 (14)	3.1 (2.6)	
Δ <i>dacB</i>	6 (2)	4 (1.5)	16 (2.5)	1.5 (0)	0.19 (-0.5)			23 (77)	18 (15)	
JW	2	3	6	1.5	0.25			0.9	1.9	none
Δ <i>ampD</i>	192 (6.5)	32 (3.5)	>256 (>5.5)	1.5 (0)	0.75 (1.5)			265 (294)	2.5 (1.3)	
Δ <i>dacB</i>	192 (6.5)	32 (3.5)	>256 (>5.5)	1.5 (0)	0.38 (0.5)			240 (267)	15 (7.9)	
GGF	2	2	4	>32	12			0.9	1.5	L176R
Δ <i>ampD</i>	8 (2)	8 (2)	32 (3)	>32	>32 (>1.5)			154 (171)	1.5 (1)	
Δ <i>dacB</i>	32 (4)	24 (3.5)	96 (4.5)	>32	12 (0)			268 (298)	5.6 (3.7)	
JCC	3	4	8	1.5	3			0.8	6.5	none
Δ <i>ampD</i>	4 (0.5)	4 (0)	16 (1)	2 (0.5)	4 (0.5)			12 (15)	5.3 (0.8)	
Δ <i>dacB</i>	6 (1)	6 (0.5)	16 (1)	2 (0.5)	3 (0)			9.4 (12)	17 (2.6)	
FRM	2	12	4	3	0.125			6.1	3.1	T21A/G391P
Δ <i>ampD</i>	32 (4)	16 (0.5)	>256 (>6)	3 (0)	0.38 (0.5)			1776 (291)	1.7 (0.5)	
Δ <i>dacB</i>	128 (6)	32 (1.5)	>256 (>6)	3 (0)	0.125 (0)			1111 (182)	43 (14)	
GPP	3	2	2	0.75	0.38			5.3	2.7	G27D/A55T/G391A
Δ <i>ampD</i>	16 (2.5)	6 (1.5)	32 (4)	1 (0.5)	0.75 (1)			490 (92)	2.9 (1.1)	
Δ <i>dacB</i>	32 (3.5)	12 (2.5)	32 (4)	0.75 (0)	0.25 (-0.5)			613 (116)	19 (7)	
LDP	2	2	3	1	0.125			0.7	3.4	T105A/L176R
Δ <i>ampD</i>	6 (1.5)	3 (0.5)	12 (2)	1 (0)	0.38 (1.5)			32 (46)	4.2 (1.2)	
Δ <i>dacB</i>	12 (2.5)	6 (1.5)	12 (2)	1 (0)	0.19 (0.5)			68 (97)	23 (6.8)	

^aCAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; TZP, piperacillin/tazobactam; IPM, imipenem; MEM, meropenem.

^bRelative mRNA level with respect to wild-type PAO1.

^cAmpC polymorphisms with respect to the wild-type PAO1 sequence.

Transparency declarations

None to declare.

References

- 1 Juan C, Maciá MD, Gutiérrez O *et al.* Molecular mechanisms of β -lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 4733–8.
- 2 Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 2009; **22**: 582–610.
- 3 Moyá B, Döstch A, Juan C *et al.* β -Lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS Pathog* 2009; **5**: e1000353.
- 4 Juan C, Moyá B, Pérez JL *et al.* Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level β -lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 1780–7.
- 5 Oh H, Stenhoff S, Jalal S *et al.* Role of efflux pumps and mutations in genes for topoisomerases II and IV in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Microb Drug Res* 2003; **8**: 323–8.
- 6 Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 1766–71.

NagZ Inactivation Prevents and Reverts β -Lactam Resistance, Driven by AmpD and PBP 4 Mutations, in *Pseudomonas aeruginosa*[∇]

Laura Zamorano,¹ Thomas M. Reeve,² Lehua Deng,³ Carlos Juan,¹ Bartolomé Moyá,¹ Gabriel Cabot,¹ David J. Vocado,³ Brian L. Mark,² and Antonio Oliver^{1*}

Servicio de Microbiología and Unidad de Investigación, Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS), Palma de Mallorca, Spain¹; Department of Microbiology, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada²; and Department of Chemistry, Simon Fraser University, Burnaby, British Columbia, Canada³

Received 22 March 2010/Returned for modification 31 May 2010/Accepted 13 June 2010

AmpC hyperproduction is the most frequent mechanism of resistance to penicillins and cephalosporins in *Pseudomonas aeruginosa* and is driven by *ampD* mutations or the recently described inactivation of *dacB*, which encodes the nonessential penicillin-binding protein (PBP) PBP 4. Recent work showed that *nagZ* inactivation attenuates β -lactam resistance in *ampD* mutants. Here we explored whether the same could be true for the *dacB* mutants with *dacB* mutations alone or in combination with *ampD* mutations. The inactivation of *nagZ* restored the wild-type β -lactam MICs and *ampC* expression of PAO1 *dacB* and *ampD* mutants and dramatically reduced the MICs (for example, the MIC for ceftazidime dropped from 96 to 4 $\mu\text{g/ml}$) and the level of *ampC* expression (from ca. 1,000-fold to ca. 50-fold higher than that for PAO1) in the *dacB-ampD* double mutant. On the other hand, *nagZ* inactivation had little effect on the inducibility of AmpC. The NagZ inhibitor *O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-*N*-phenylcarbamate attenuated the β -lactam resistance of the AmpC-hyperproducing strains, showing a greater effect on the *dacB* mutant (reducing the ceftazidime MICs from 24 to 6 $\mu\text{g/ml}$) than the *ampD* mutant (reducing the MICs from 8 to 4 $\mu\text{g/ml}$). Additionally, *nagZ* inactivation in the *dacB* mutant blocked the overexpression of *creD* (*blrD*), which is a marker of the activation of the CreBC (BlrAB) regulator involved in the resistance phenotype. Finally, through population analysis, we show that the inactivation of *nagZ* dramatically reduces the capacity of *P. aeruginosa* to develop ceftazidime resistance, since spontaneous mutants were not obtained at concentrations $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ (the susceptibility breakpoint) for the *nagZ* mutant but were obtained with wild-type PAO1. Therefore, NagZ is envisaged to be a candidate target for preventing and reverting β -lactam resistance in *P. aeruginosa*.

The increasing prevalence of nosocomial infections produced by multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* strains severely compromises the selection of appropriate treatments and is therefore associated with significant morbidity and mortality (23, 33). Indeed, one of the most striking features of *P. aeruginosa* is its extraordinary capacity for developing resistance to almost any available antibiotic by the selection of mutations in chromosomal genes (26, 29). Among the mutation-mediated β -lactam resistance mechanisms, particularly noteworthy are those that lead to the repression or inactivation of the porin OprD, which confers resistance to carbapenems (12, 36), or those leading to the hyperexpression of the chromosomal cephalosporinase AmpC, which confers resistance to penicillins, cephalosporins, and monobactams (11, 17).

AmpC is a chromosomally encoded group I, class C cephalosporinase produced by *P. aeruginosa*, as well as many other nonfermenting Gram-negative bacilli and most *Enterobacteriaceae* family members (6). Although AmpC is produced at very low basal levels in wild-type strains, its expression is highly inducible in the presence of certain β -lactams (β -lactamase inducers), such as ceftaxime and imipenem (IMP) (28). In fact,

the activities of the antipseudomonal penicillins (such as ticarcillin and piperacillin [PIP]), cephalosporins (such as ceftazidime [CAZ] and cefepime [FEP]), and monobactams (such as aztreonam [ATM]) rely on the fact that they are very weak AmpC inducers, since they, too, are hydrolytically inactivated by this enzyme (28). For this reason, during treatment with these weak inducers, mutants showing constitutive high-level AmpC production (AmpC derepressed mutants) are frequently selected, leading to the failure of antimicrobial therapy (11, 16, 17, 27).

There are several genes involved in the regulation of *ampC* expression, a process that was first investigated in the *Enterobacteriaceae* and found to be intimately linked to peptidoglycan recycling (32, 35). *ampG* encodes an inner membrane permease for GlcNAc-1,6-anhydromuropeptides, which are peptidoglycan catabolites that, upon entry into the cytosol, are processed by β -*N*-acetylglucosaminidase, known as NagZ, to generate 1,6-anhydromuropeptides. The 1,6-anhydromuropeptide products of NagZ are thought to induce AmpC production by interacting with the LysR-type transcriptional regulator AmpR (9, 14, 15, 21, 24). During regular bacterial growth, 1,6-anhydromuropeptides are processed by the *N*-acetyl-anhydromuramyl-L-alanine amidase AmpD, preventing *ampC* induction (13, 35). On the other hand, during growth in the presence of strong β -lactamase inducers, large amounts of muropeptides are generated and accumulate in the cytoplasm, which leads to the AmpR-mediated induction of *ampC* expression (9, 14, 15, 24). It is also well known that the mutational

* Corresponding author. Mailing address: Servicio de Microbiología, Hospital Son Dureta, C. Andrea Doria No. 55, 07014 Palma de Mallorca, Spain. Phone: 34 971 175 148. Fax: 34 971 175 185. E-mail: antonio.oliver@ssib.es.

[∇] Published ahead of print on 21 June 2010.

TABLE 1. Strains and plasmids used or constructed

Strain or plasmid	Genotype/relevant characteristics ^a	Reference or source
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Reference strain completely sequenced	Laboratory collection
PAΔD	PAO1 Δ <i>ampD</i> :: <i>lox</i>	18
PAΔdB	PAO1 Δ <i>dacB</i> :: <i>lox</i>	31
PAdacB	1A1 spontaneous <i>dacB</i> null mutant (W273X) of PAO1	31
PAdacBΔD	PAdacB Δ <i>ampD</i> :: <i>lox</i>	31
PAΔDDh2Dh3	PAO1 Δ <i>ampD</i> :: <i>lox</i> Δ <i>ampDh2</i> :: <i>lox</i> Δ <i>ampDh3</i> :: <i>lox</i>	18
PAΔR	PAO1 Δ <i>ampR</i> :: <i>lox</i>	31
PAΔC	PAO1 Δ <i>ampC</i> :: <i>lox</i>	30
PAΔnZ	PAO1 Δ <i>nagZ</i> :: <i>lox</i>	This work
PAΔDnZ	PAO1 Δ <i>ampD</i> :: <i>lox</i> Δ <i>nagZ</i> :: <i>lox</i>	This work
PAΔdBnZ	PAO1 Δ <i>dacB</i> :: <i>lox</i> Δ <i>nagZ</i> :: <i>lox</i>	This work
PAdacBΔDnZ	PAdacB Δ <i>ampD</i> :: <i>lox</i> Δ <i>nagZ</i> :: <i>lox</i>	This work
PAΔDDh2Dh3nZ	PAO1 Δ <i>ampD</i> :: <i>lox</i> Δ <i>ampDh2</i> :: <i>lox</i> Δ <i>ampDh3</i> :: <i>lox</i> Δ <i>nagZ</i> :: <i>lox</i>	This work
<i>E. coli</i>		
XL1-Blue	F':Tn10 <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ(<i>lacZ</i>)M15/ <i>recA1 endA1 gyrA96</i> (Nal ^r) <i>thi hsdR17</i> (<i>r</i> _k ⁻ <i>m</i> _k ⁻) <i>mcrB1</i>	Laboratory collection
S17-1	<i>RecA pro</i> (RP4-2Tet:: Mu Kan::Tn7)	Laboratory collection
Plasmids		
pEX100Tlink	Ap ^r <i>sacB</i> , pUC19-based gene replacement vector with an MCS	37
PUCGm <i>lox</i>	Ap ^r Gm ^r , pUC18-based vector containing the <i>lox</i> -flanked <i>aacC1</i> gene	37
pCM157	Tc ^r , <i>cre</i> expression vector	37
PEXnZ	pEX100Tlink containing 5' and 3' flanking sequences of <i>nagZ</i>	This work
PEXnZGm	pEX100Tlink containing 5' and 3' flanking sequences of <i>nagZ</i> ::Gm <i>lox</i>	This work

^a MCS, multiple cloning site; Ap^r, ampicillin resistant; Gm^r, gentamicin resistant; Tc^r, tetracycline resistant.

inactivation of AmpD leads to the accumulation of 1,6-anhydromuropeptides and high-level *ampC* expression, even in the absence of β-lactamase inducers, producing the classical constitutively derepressed phenotype of AmpC production (25). Additionally, given that NagZ removes GlcNAc to produce the 1,6-anhydromuropeptides (7, 40), inhibitors of this enzyme have been shown to mitigate AmpC-driven resistance (39).

In contrast to the classical fully derepressed phenotypes observed in the *Enterobacteriaceae*, the inactivation of *ampD* in *P. aeruginosa* was shown to lead to a partially derepressed phenotype, characterized by a moderately high level of basal *ampC* expression that is still further inducible (22). Further studies showed that the partial derepression of the *P. aeruginosa ampD* mutant is due to the presence of two additional *ampD* genes in this species, designated *ampDh2* and *ampDh3* (18). Furthermore, the sequential inactivation of these three *ampD* homologues was shown to lead to the stepwise upregulation of *ampC* expression, reaching full derepression with very high level basal *ampC* expression (over 1,000-fold compared to that of the wild type) in the triple mutant (18). While inactivation of *ampD*, producing moderate β-lactam resistance, is frequently observed in the clinical setting (5, 17), high-level resistance caused by inactivation of multiple *ampD* genes has not been observed (30, 38), most likely due to the high biological cost associated with inactivation of more than one of these genes (30).

Recent work (31) showed that one-step high-level (clinical) resistance in *P. aeruginosa* frequently results from the inactivation of *dacB*, encoding the nonessential penicillin-binding protein (PBP) PBP 4 (10, 20). The inactivation of PBP 4 was shown to give rise to a highly efficient and complex β-lactam resistance response, triggering the overproduction of the chro-

mosomal β-lactamase AmpC and the specific activation of the CreBC (BlrAB) two-component regulator (1, 3, 4), which was demonstrated to play a major role in the resistance phenotype (31). Moreover, *dacB* (PBP 4) mutations were observed in a high proportion of AmpC-hyperproducing clinical isolates (31). Recent studies of the structure of PBP 4 have highlighted its potential role as a β-lactam sensor involved in regulating AmpC expression (19).

In a recent work, we showed that *nagZ* inactivation or direct inhibition of the NagZ enzyme by small molecules potentiates β-lactam susceptibility in a *P. aeruginosa ampD* background (2). In the present study, we explored whether the same could be true for the *dacB* (PBP 4) mutants, alone or in combination with *ampD* mutations. Moreover, since previous works have shown that in *P. aeruginosa ampD* or *dacB* mutations are the main mechanisms leading to penicillin and cephalosporin resistance, we investigated whether inactivation of NagZ prevents the emergence of resistant mutants *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids, and susceptibility testing. The bacterial strains and plasmids used or constructed in this study are listed in Table 1. The MICs of CAZ, FEP, ATM, PIP, piperacillin-tazobactam (PTZ), IMP, and meropenem (MER) for all the strains were determined with Etest strips (AB Biodisk, Solna, Sweden) on Mueller-Hinton (MH) agar, according to the manufacturer's recommendations. Additionally, following previously established protocols (2), the MICs of CAZ, ATM, and PIP were determined by microdilution in 100 μl of cation-adjusted MH broth (8) in the presence or absence of 0.5 mM and 5 mM concentrations of the *N*-acetyl-β-glucosaminidase inhibitor *O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-*N*-phenylcarbamate (PUGNAc) (39). The phenotypic determination of AmpC inducibility was performed by assessing the presence of antagonism between IMP and CAZ disks (separated by 5 to 30 mm) in MH agar plates, as described previously (18).

TABLE 2. Primers used for construction of *nagZ*-knockout mutants

Primer	Sequence (5'-3') ^a	Location ^b	PCR product size (bp)
nZF1-BHI	<u>TCGGATCCTCCGGGCGGAACTCCATG</u>	-153 to -135	505
nZR1-Hd3	<u>TCAAGCTTAGCACCGGCGGAACTCA</u>	335 to 353	
nZF2-Hd3	<u>TCAAGCTTAGCGACCTGGTTCCGTTCCG</u>	568 to 586	432
nZR2-ERI	<u>TCGAATTCACATCGACAGCTCCCTCA</u>	980 to 999	

^a The restriction sites for endonucleases are underlined.

^b Location of primers with respect to the *nagZ* start codon.

Construction of *nagZ*-knockout mutants. *nagZ*-knockout mutants of strains PAO1, PAΔD, PAΔdB, PAdacBΔD, and PAΔDDh2Dh3 (Table 1) were constructed following well-established procedures (18, 31), based on the *cre-lox* system for gene deletion and antibiotic resistance marker recycling in *P. aeruginosa* (37). The PCR products of the upstream and downstream sequences (Table 2) of *nagZ* (using PAO1 DNA as the template) were digested with either BamHI or EcoRI and HindIII and cloned by a three-way ligation into pEX100Tlink deleted for the HindIII site and opened by EcoRI and BamHI. The resulting plasmid (pEXnZ) was transformed into the *Escherichia coli* XL1-Blue strain, and transformants were selected in 30 μg/ml ampicillin LB agar plates. The *lox*-flanked gentamicin resistance cassette (*aacI*) obtained by HindIII restriction of plasmid pUCGmlox was cloned into the single site for this enzyme formed by the ligation of the two flanking fragments. The resulting plasmid (pEXnZGm) was again transformed into *E. coli* XL1-Blue, and transformants were selected in 30 μg/ml ampicillin-5 μg/ml gentamicin LB agar plates. The plasmid was then transformed into the *E. coli* S17-1 helper strain. Knockout mutants were generated by conjugation, followed by selection of double recombinants using 5% sucrose-1 μg/ml cefotaxime-30 μg/ml gentamicin LB agar plates. Double recombinants were checked by first screening for carbenicillin (200 μg/ml) susceptibility and afterwards by PCR amplification and sequencing. For the recycling of the gentamicin resistance cassettes, plasmid pCM157 was electroporated into the different mutants. Transformants were selected in LB agar plates with 250 μg/ml tetracycline. One transformant for each mutant was grown overnight in 250 μg/ml tetracycline LB broth in order to allow the expression of the *cre* recombinase. Plasmid pCM157 was then cured from the strains by successive passages in LB broth. Selected colonies were then screened for their tetracycline (250 μg/ml) and gentamicin (30 μg/ml) susceptibilities and checked by PCR amplification and DNA sequencing.

Quantification of gene expression. The relative mRNA levels of *ampC* (18) and *creD* (*blrD*) (31) were determined by real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) following previously described protocols. Briefly, total RNA from logarithmic-phase-grown cultures was obtained with an RNeasy minikit (Qiagen, Hilden, Germany). Fifty nanograms of purified RNA was then used for one-step reverse transcription and real-time PCR, using a QuantiTect SYBR green reverse transcription-PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany), in a SmartCycler II apparatus (Cepheid, Sunnyvale). Previously described conditions and primers

were used (18, 31, 34). *rpsL* housekeeping gene was used to normalize the expression levels, and the results were always referred to the basal level of expression for PAO1. All RT-PCRs were performed in duplicate, and the mean values of mRNA expression resulting from three independent experiments were considered in all cases.

Population analysis of PAO1 and PAΔnZ CAZ susceptibility. Serial dilutions of 10-ml overnight cultures (MH broth) of PAO1 or PAΔnZ were seeded in MH agar plates containing 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, or 16 μg/ml of CAZ. Colonies growing after 24 h of incubation were counted, to plot the numbers of CFU at each antibiotic concentration. All experiments were performed in triplicate, and the results shown are the mean values ± standard deviations. CAZ MICs were determined, after passage in antibiotic-free medium, for selected colonies from MH agar plates containing the concentrations indicated above MIC (2, 4, 8, and 16 μg/ml), to confirm that growth was the consequence of the selection of spontaneous CAZ-resistant mutants and to evaluate their resistance levels. Moreover, the level of *ampC* expression was quantified in these mutants as described above to investigate the resistance mechanism involved.

RESULTS AND DISCUSSION

Inactivation of *nagZ* restores β-lactam susceptibility of PBP 4-knockout mutants. Previous work showed that *nagZ* inactivation markedly increases the β-lactam susceptibilities of PAO1 *ampD* mutants (2). In the present study we explored whether the same could be true for the recently described *dacB* (PBP 4) mutants. Indeed, as shown in Table 3, the deletion of *nagZ* fully restored the susceptibility of the PAΔdB mutant to CAZ, FEP, PTZ, and ATM; a 2-fold reduction of the IMP MICs was also noted. Moreover, the β-lactam MICs against all the *nagZ* mutants of PAO1 (PAΔnZ), PAΔD (PAΔDnZ), and PAΔdB (PAΔdBnZ) were nearly identical or similar to the levels seen for PAO1, despite the important differences in the

TABLE 3. MICs and basal and induced levels of *ampC* and *creD* expression in the studied strains

Strain	MIC (μg/ml)						Relative mRNA level ^a			
							<i>ampC</i>		<i>creD</i> (<i>blrD</i>)	
	CAZ	FEP	IMP	MER	PTZ	ATM	Basal	Induced ^b	Basal	Induced
PAO1	1.5	1.5	2	0.38	2	4	1	78 ± 34	1	24 ± 9.1
PAΔnZ	1	1.5	1	0.38	2	4	-2.1 ± 1.5	469 ± 230	1.1 ± 0.3	54 ± 18
PAΔD	8	4	2	1	32	12	47 ± 9.5	134 ± 11	1.1 ± 0.3	2.7 ± 0.7
PAΔDnZ	2	1.5	1	0.5	3	4	1.0 ± 0.4	483 ± 26	2.8 ± 1.6	99 ± 15
PAΔdB	24	12	2	0.5	64	24	51 ± 16	232 ± 67	83 ± 7	120 ± 29
PAΔdBnZ	1.5	2	1	0.38	3	4	3.0 ± 1.9	661 ± 374	4.0 ± 0.8	95 ± 45
PAdacBΔD	96	48	2	1.5	>256	64	1,770 ± 414	1,950 ± 480	51 ± 24	81 ± 40
PAdacBΔDnZ	4	3	1	0.5	16	8	40 ± 17	906 ± 80	1.9 ± 1.3	418 ± 170
PAΔDDh2Dh3	32	16	2	1	>256	32	1,020 ± 87	1,105 ± 88	1.3 ± 0.3	1.6 ± 0.7
PAΔDDh2Dh3nZ	3	3	1.5	1	8	8	57 ± 31	905 ± 407	-1.4 ± 0.1	1.0 ± 0.3
PAΔR	2	2	0.5	0.25	4	4	3.8 ± 0.4	3.3 ± 0.8	1.6 ± 0.1	189 ± 8
PAΔC	1	1	0.5	0.25	2	2	NA	NA	ND	ND

^a Relative amount of *ampC* or *creD* (*blrD*) mRNA compared to the basal levels ± standard deviation in strain PAO1. NA, not applicable; ND, not determined.

^b Induction experiments were carried out with 50 μg/ml of cefoxitin.

TABLE 4. Susceptibilities of PAO1 and *ampD* and *dacB* null mutants to PIP, ATM, and CAZ in the presence or absence of PUGNAc^a

Strain	MIC ^b (μg/ml)								
	PIP			ATM			CAZ		
	–I	+I (0.5 mM)	+I (5 mM)	–I	+I (0.5 mM)	+I (5 mM)	–I	+I (0.5 mM)	+I (5 mM)
PAO1	4	4	4	3	3	3	2	2	2
PAΔD	48	24	24	6	3	3	8	4	4
PAΔdB	64	32	24	12	4	3	24	8	6
PAdacBΔD	384	256	256	32	32	24	96	64	64

^a The bacterial strains were treated with (+I) the NagZ inhibitor PUGNAc at 0.5 mM and 5 mM concentrations or were not treated (–I) (39).

^b The MIC was determined by the broth microdilution method (8). All measurements were performed in triplicate.

susceptibilities of the parent strains: wild-type, moderate, and high-level resistance, respectively. Further, the CAZ, FEP, PTZ, and ATM MICs were also notably reduced after *nagZ* inactivation in the *ampD-dacB* double mutant (PAdacBΔD), which exhibits extremely high level β-lactam resistance (Table 3). Although wild-type MICs were not fully restored through *nagZ* inactivation, the MICs obtained for PAdacBΔDnZ remained within the CLSI susceptibility breakpoints. Similar results were obtained for the triple *ampD* mutant (PAΔDDh2Dh3) (Table 3).

Inhibition of NagZ with PUGNAc potentiates β-lactam susceptibility of PBP 4-knockout mutants. Previous work has shown that blocking NagZ activity with small-molecule inhibitors based on the PUGNAc scaffold can attenuate β-lactam resistance in the PAO1 *ampD* mutant (2) and in *Escherichia coli* harboring a plasmid-borne *ampR-ampC* operon from *Citrobacter freundii* (39). As expected, PUGNAc did not exhibit antimicrobial properties even when it was tested at a concentration of 5 mM (data not shown). However, as shown in Table 4, we show that when it was coadministered with β-lactams at a concentration of 0.5 mM, PUGNAc sharply attenuates β-lactam resistance in the PAO1 *dacB* mutant and does so to a greater extent, in fact, than that documented for the *ampD* mutant. For example, 0.5 mM PUGNAc reduced the CAZ MICs from 24 to 8 μg/ml in the *dacB* mutant, whereas the reduction was from 8 to 4 μg/ml in the *ampD* mutant (Table 4). The β-lactam MICs of the *dacB* mutant were slightly further decreased in the presence of the higher 5 mM PUGNAc concentration (Table 4). The effect of PUGNAc on the *dacB-ampD* double mutant was much smaller, but it still reduced the β-lactam MICs (Table 4), particularly at a concentration of 5 mM. While NagZ appears to be the only enzyme within PAO1 that exhibits *N*-acetyl-β-glucosaminidase activity (2), a comparison of the MIC results obtained in the presence of PUGNAc (Table 4) with the MICs of PAO1 mutants in which *nagZ* was inactivated genetically (Table 3) suggests that PUGNAc does not inhibit all endogenous NagZ activity, possibly due to the limited permeation of the inhibitor into the cytosol. Further ongoing research will elucidate the effect of efflux pump expression on PUGNAc NagZ-inhibitory activity, as well the potential utility of this compound against clinical multidrug-resistant *P. aeruginosa* strains.

Effect of *nagZ* inactivation on *ampC* basal expression and *ampC* inducibility. The results for basal and cefoxitin-induced *ampC* expression in the studied strains is shown in Table 3. In agreement with the susceptibility data, the inactivation of *nagZ* in the *dacB* or *ampD* mutant dramatically reduced the level of

ampC expression, yielding values close to the basal levels of wild-type strain PAO1. Similarly, a marked decrease (from approximately 1,000-fold to approximately 50-fold) was also observed for the *ampD-dacB* double mutant and the *ampD* triple mutant, although consistent with the results of the antibiotic susceptibility assays, the wild-type basal expression levels were not fully restored. On the other hand, *nagZ* inactivation did not impair the *ampC* inducibility of wild-type PAO1 or the *ampD* and *dacB* mutants. These results are consistent with previous findings showing that *nagZ* inactivation has little effect on the cefoxitin-induced β-lactamase activity of PAO1 or its *ampD* mutants (2). Moreover, we show that inducible AmpC-mediated β-lactam resistance still occurs in the *nagZ* background (PAΔnZ, PAΔDnZ, and PAΔdBnZ), as demonstrated by the antagonism (Fig. 1) between IMP (a classical potent AmpC inducer) and CAZ (a poor AmpC inducer). In contrast, *ampR* inactivation completely abolished *ampC* inducibility (Table 1) and inducible resistance (Fig. 1). All together, these results strongly suggest that NagZ plays a major role in determining the basal level of *ampC* expression (and is therefore necessary for constitutive *ampC* overexpression) but not in cases wherein *ampC* is induced by classical β-lactam inducers, such as cefoxitin and imipenem. While it is clear that AmpR is necessary for both the constitutive overexpression and induction of *ampC*, there is still controversy over the true identity of the molecules that activate this transcriptional regulator in these two situations (35). Our results suggest that the product of NagZ, 1,6-anhydro-acetylmuramoyl peptides, is necessary for the activation of AmpR in the absence of classical β-lactam inducers and is therefore necessary for resistance to antipseudomonal penicillins, cephalosporins, and monobactams that is driven by constitutive AmpC overexpression (as caused by AmpD and/or PBP 4 inactivation). On the other hand, the absence of a significant effect on the inducibility of AmpC arising from the loss of *nagZ* suggests that a different molecule, not necessarily one produced by NagZ, activates AmpR in the presence of classical AmpC inducers. These results are consistent with previous data obtained with the *Enterobacteriaceae* model showing that the constitutive overexpression of AmpC resulted from the cytosolic accumulation of 1,6-anhydro-acetylmuramoyl tripeptide (15), a NagZ product, whereas the molecules that accumulated during induction when the classical β-lactam inducers were used were mainly free pentapeptides and a small amount of 1,6-anhydro-acetylmuramoyl pentapeptide (35). These observations therefore raise the interesting possibility that the pentapeptide itself may act as an inducer (35), a scenario we are currently investigating.

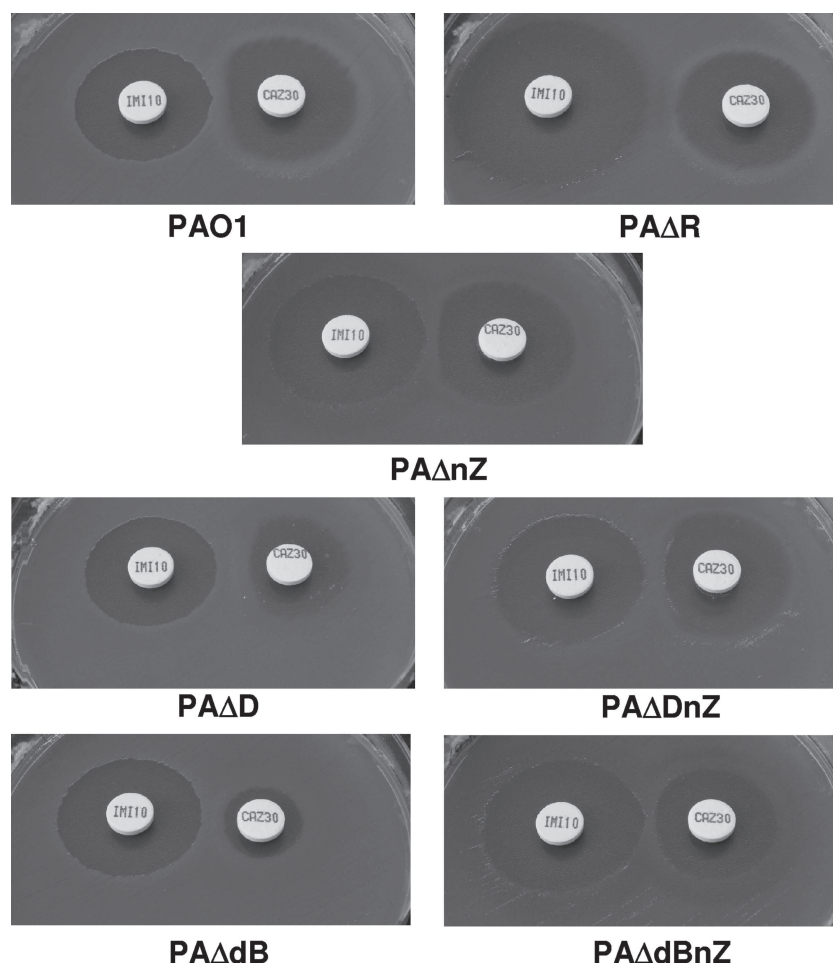


FIG. 1. Double-disk (IMP-CAZ) AmpC induction test with strains PAO1, PA Δ D (*ampD*), and PA Δ dB (*dacB*) and their respective *nagZ* mutants, PA Δ nZ, PA Δ DnZ, and PA Δ dBnZ. The results for the *ampR* mutant of PAO1 (PA Δ R) are also included for comparison.

Effect of *nagZ* inactivation on basal level of *creD* (*blrD*) expression and inducibility. In a previous study, we have shown that the inactivation of *dacB* in PAO1 leads to the activation of the CreBC (BlrAB) two-component regulator, evidenced by the overexpression of *creD* (*blrD*) mRNA (31). Moreover, we showed that *creD* is highly inducible by a classical AmpC inducer (cefotaxime) in wild-type PAO1, but the inducibility is abolished in an *ampD* background. Finally, we showed that the activation of the CreBC system caused by mutation of *dacB* (but not by mutation of the *ampD* genes) dramatically increases the β -lactam MICs. Therefore, the inactivation of *dacB* apparently leads to the specific activation of the CreBC (BlrAB) two-component regulator, which in turn gives rise to a high-level β -lactam-resistant phenotype. This information obtained in a PAO1 background was recently validated in genetically diverse *P. aeruginosa* clinical strains (41). In the present work, we evaluated whether the inactivation of *nagZ* (in wild-type PAO1 and its *ampD* and *dacB* mutants) affects *creD* expression or its inducibility. Remarkably, as shown in Table 3, the inactivation of *nagZ* attenuated *creD* overexpression in the *dacB* mutant. Also noteworthy is that the inactivation of *nagZ* restored the *creD* inducibility in the single *ampD* mutant, although, intriguingly, not in the triple *ampD*

mutant. Therefore, through unknown mechanisms, NagZ products and/or substrates appear to be connected to the CreBC (BlrAB) regulatory pathway, governing the differential response driven by *dacB* and *ampD* inactivation. Collectively, these results suggest that *nagZ* inactivation in the *dacB* mutant reverts the two factors responsible for the high-level β -lactam resistance response, constitutive AmpC overexpression and constitutive activation of the CreBC two-component regulator.

Inactivation of *nagZ* prevents the emergence of high-level CAZ-resistant mutants. The results presented so far suggest that NagZ is necessary for resistance acquired through mutations (AmpD and/or PBP 4) that lead to constitutive AmpC overexpression. Since previous studies have shown that in *P. aeruginosa* AmpC overexpression is the main mechanism leading to resistance to antipseudomonal β -lactams such as CAZ *in vitro*, *in vivo*, and in the clinical setting, we hypothesized that blocking the NagZ function should prevent the selection of CAZ-resistant mutants. To test this hypothesis we performed a population analysis of PAO1 and PA Δ nZ CAZ susceptibilities, and the results are shown in Fig. 2. Four differentiated features could be observed in the population analysis curves. First, no differences between PAO1 and PA Δ nZ population sizes (approximately 10^9 CFU/ml) were observed in the absence or in

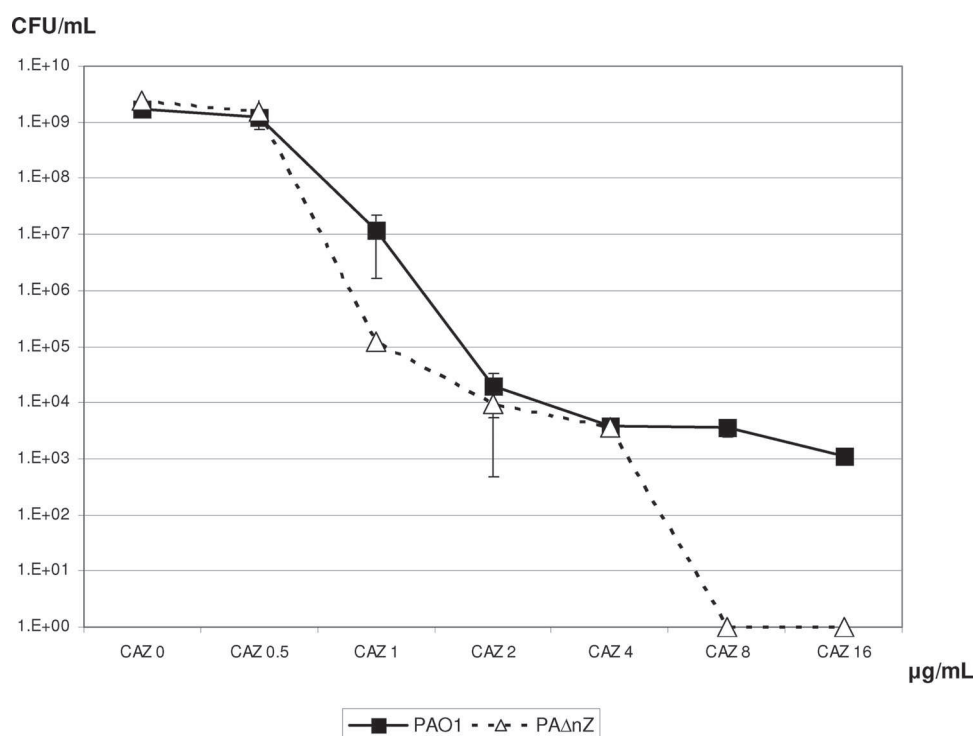


FIG. 2. Population analysis of PAO1 and PAΔnZ CAZ susceptibility. Overnight cultures of PAO1 or PAΔnZ were plated in MH agar containing 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, and 16 µg/ml of CAZ; and the numbers of CFU were enumerated after 24 h of incubation. The results shown here are the mean values of three experiments ± standard deviations.

the presence of subinhibitory concentrations of antibiotic (0.5 µg/ml). Second, at perinhibitory concentrations (1 µg/ml), the number of PAΔnZ cells (approximately 10⁵ CFU/ml) was significantly less than the number of PAO1 cells (approximately 10⁷ CFU/ml), likely reflecting the slightly increased CAZ susceptibility of the *nagZ* mutant, as already documented in Table 3 through MIC determination. Third, the numbers of PAO1 and PAΔnZ cells were again similar (approximately 10⁴ CFU/ml) for low suprainhibitory concentrations (2 and 4 µg/ml), suggesting that low-level resistance occurs (through spontaneous mutation) at similar rates for both strains. Fourth and most relevant, while a significant number (approximately 10³ CFU/ml) of high-level-resistant mutants (growing at 8 and 16 µg/ml, concentrations defining CLSI clinical resistance breakpoints) were still observed for PAO1, not a single CFU was recovered from PAΔnZ cultures at concentrations of ≥8 µg/ml. Moreover, the PAΔnZ mutants recovered at 2 to 4 µg/ml showed MICs (Etest) between 2 and 6 µg/ml, and none of them showed AmpC hyperproduction, as demonstrated through quantification of *ampC* expression. On the other hand, all PAO1 mutants growing at concentrations above 2 µg/ml had MICs >8 µg/ml. Data from our previous works had already shown that all spontaneous PAO1 CAZ-resistant mutants, selected at concentrations ranging from 4 to 16 µg/ml, are hyperproducers of AmpC, mainly through PBP 4 inactivation (31). In summary, loss of *nagZ* results in impairment of the ability of *P. aeruginosa* to acquire resistance to β-lactams arising through mechanisms leading to AmpC hyperproduction.

Concluding remarks. Collectively, these results show that blocking NagZ restores β-lactam susceptibility in *ampD* and

dacB mutants, which is the most frequent mechanism leading to AmpC hyperproduction and penicillin and cephalosporin resistance in *P. aeruginosa*. Moreover, we show that the inactivation of *nagZ* dramatically reduces the capacity of *P. aeruginosa* to develop CAZ resistance through the selection of chromosomal mutations. Therefore, NagZ is envisaged to be a candidate target for preventing and reverting β-lactam resistance in *P. aeruginosa*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain and Instituto de Salud Carlos III, through the Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (grants REIPI C03/14 and RD06/0008) and grant PS09/00033, as well as by the Canadian Institutes of Health Research and the Canadian Cystic Fibrosis Foundation. D.J.V. is a Tier II Canada Research Chair in Chemical Glycobiology and a scholar of the Michael Smith Foundation for Health Research.

We thank V. Larmour for technical assistance.

REFERENCES

- Alksne, L. E., and B. A. Rasmussen. 1996. Expression of the AsbA1, OXA-12, and AsbM1 beta-lactamases in *Aeromonas jandaei* AER 14 is coordinated by a two-component regulon. *J. Bacteriol.* **179**:2006–2013.
- Asgarali, A., K. A. Stubbs, A. Oliver, D. J. Voadlo, and B. J. Mark. 2009. Inactivation of the glycoside hydrolase NagZ attenuates antipseudomonal β-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:2274–2275.
- Avison, M. B., R. E. Horton, T. R. Walsh, and P. M. Bennett. 2001. *Escherichia coli* CreBC is a global regulator of gene expression that responds to growth in minimal media. *J. Biol. Chem.* **276**:26955–26961.
- Avison, M. B., P. Niumpup, K. Nurmahomed, T. R. Walsh, and P. M. Bennett. 2004. Role of the 'cre/blr-tag' DNA sequence in regulation of gene expression by the *Aeromonas hydrophila* beta-lactamase regulator, BlrA. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**:197–202.

5. Bagge, N., O. Ciofu, M. Hentzer, J. I. A. Campbell, M. Givskov, and N. Hoiby. 2002. Constitutive high expression of chromosomal β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in *ampD*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3406–3411.
6. Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1211–1233.
7. Cheng, Q., H. Li, K. Merdek, and J. T. Park. 2000. Molecular characterization of the β -N-acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and its role in cell wall recycling. *J. Bacteriol.* **182**:4836–4840.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, sixth edition (M7-A6). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
9. Dietz, H., D. Pfeifle, and B. Wiedemann. 1997. The signal molecule for β -lactamase induction in *Enterobacter cloacae* is the anhydromuramyl-pentapeptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2113–2120.
10. Ghosh, A. S., C. Chowdhury, and D. E. Nelson. 2008. Physiological functions of D-alanine carboxypeptidases in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* **16**:309–317.
11. Giwercman, B., P. A. Lambert, V. T. Rosdahl, G. H. Shand, and N. Hoiby. 1990. Rapid emergence of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients due to in-vivo selection of stable partially derepressed β -lactamase producing strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **26**:247–259.
12. Gutiérrez, O., C. Juan, E. Cercenado, F. Navarro, E. Bouza, P. Coll, J. L. Pérez, and A. Oliver. 2007. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:4329–4335.
13. Höltje, J. V., U. Kopp, A. Ursinus, and B. Wiedemann. 1994. The negative regulator of β -lactamase induction AmpD is a N-acetyl-anhydromuramyl-L-alanine amidase. *FEMS Microbiol. Lett.* **122**:159–164.
14. Honore, N., M. H. Nicolas, and S. T. Cole. 1986. Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. *EMBO J.* **5**:3709–3714.
15. Jacobs, C., L. Huang, E. Bartowsky, S. Normark, and J. T. Park. 1994. Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for β -lactamase induction. *EMBO J.* **13**:4684–4694.
16. Juan, C., O. Gutiérrez, A. Oliver, J. I. Ayestarán, N. Borrell, and J. L. Pérez. 2005. Contribution of clonal dissemination and selection of mutants during therapy to *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance in an intensive care unit setting. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**:887–892.
17. Juan, C., M. D. Maciá, O. Gutiérrez, C. Vidal, J. L. Pérez, and A. Oliver. 2005. Molecular mechanisms of β -lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4733–4738.
18. Juan, C., B. Moyá, J. L. Pérez, and A. Oliver. 2006. Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high level beta-lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1780–1787.
19. Kawai, F., T. B. Clarke, D. I. Roper, G. J. Han, K. Y. Hwang, S. Unzai, E. Obayashi, S. Y. Park, and J. R. Tame. 2010. Crystal structures of penicillin-binding proteins 4 and 5 from *Haemophilus influenzae*. *J. Mol. Biol.* **396**:634–645.
20. Kishida, H., S. Unzai, D. I. Roper, A. Lloyd, S. Y. Park, and J. R. Tame. 2005. Crystal structure of penicillin binding protein 4 (dacB) from *Escherichia coli*, both in the native form and covalently linked to various antibiotics *Biochemistry* **45**:783–792.
21. Korfmann, G., and C. C. Sanders. 1989. *ampG* is essential for high level expression of AmpC beta-lactamase in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1946–1951.
22. Langae, T. Y., L. Cagnon, and A. Huletsky. 2000. Inactivation of the *ampD* gene in *Pseudomonas aeruginosa* leads to moderate-basal-level and hyperinducible AmpC β -lactamase expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:583–589.
23. Leibovici, L., I. Shraga, M. Drucker, H. Konigsberger, Z. Samra, and S. D. Pitliks. 1998. The benefit of appropriate empirical antibiotic treatment in patients with bloodstream infection. *J. Intern. Med.* **244**:379–386.
24. Lindberg, F., L. Westman, and S. Normark. 1985. Regulatory components in *Citrobacter freundii ampC* β -lactamase induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**:4620–4624.
25. Lindberg, F., S. Lindquist, and S. Normark. 1987. Inactivation of the *ampD* gene causes semiconstitutive overproduction of the inducible *Citrobacter freundii* β -lactamase. *J. Bacteriol.* **169**:1923–1928.
26. Lister, P. D., D. J. Wolter, and N. D. Hanson. 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**:582–610.
27. Livermore, D. M. 1987. Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **6**:439–445.
28. Livermore, D. M. 1995. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**:557–584.
29. Livermore, D. M. 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin. Infect. Dis.* **34**:634–640.
30. Moya, B., C. Juan, S. Alberti, J. L. Perez, and A. Oliver. 2008. Benefit of having multiple *ampD* genes for acquiring β -lactam resistance without losing fitness and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:3694–3700.
31. Moya, B., A. Döstch, C. Juan, J. Blázquez, L. Zamorano, S. Haussler, and A. Oliver. 2009. β -Lactam resistance triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS Pathog.* **5**:e1000353.
32. Normark, S. 1995. β -Lactamase induction in Gram-negative bacteria is intimately linked to peptidoglycan recycling. *Microb. Drug Resist.* **1**:111–114.
33. Obritsch, M. D., D. N. Fish, R. MacLaren, and R. Jung. 2004. National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4606–4610.
34. Oh, H., S. Stenhoff, S. Jalal, and B. Wretling. 2003. Role of efflux pumps and mutations in genes for topoisomerases II and IV in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Microb. Drug Resist.* **8**:323–328.
35. Park, J. T., and T. Uehara. 2008. How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**:211–227.
36. Quale, J., S. Bratu, J. Gupta, and D. Landman. 2006. Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1633–1641.
37. Quéneé, L., D. Lamotte, and B. Polack. 2005. Combined *sacB*-based negative selection and *cre-lox* antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechniques* **38**:63–67.
38. Schmidtke, A. J., and N. D. Hanson. 2008. Role of *ampD* homologs in overproduction of AmpC in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:3922–3927.
39. Stubbs, K. A., M. Balcewich, B. L. Mark, and D. J. Voadlo. 2007. Small molecule inhibitors of a glycoside hydrolase attenuate inducible AmpC-mediated β -lactam resistance. *J. Biol. Chem.* **282**:21382–21391.
40. Vösch, W., and M. F. Templin. 2000. Characterization of a β -N-acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and elucidation of its role in muropeptide recycling and β -lactamase induction. *J. Biol. Chem.* **275**:39032–39038.
41. Zamorano, L., B. Moya, C. Juan, and A. Oliver. 2010. Differential β -lactam resistance response driven by *ampD* or *dacB* (PBP4) inactivation in genetically-diverse *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**:1540–1542.

AmpG Inactivation Restores Susceptibility of Pan- β -Lactam-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains[∇]

Laura Zamorano,¹ Thomas M. Reeve,² Carlos Juan,¹ Bartolomé Moyá,¹ Gabriel Cabot,¹
David J. Vocado,³ Brian L. Mark,² and Antonio Oliver^{1*}

Servicio de Microbiología and Unidad de Investigación, Hospital Son Espases, Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS), Palma de Mallorca, Spain¹; Department of Microbiology, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada²; and Department of Chemistry, Simon Fraser University, Burnaby, British Columbia, Canada³

Received 5 December 2010/Returned for modification 28 January 2011/Accepted 17 February 2011

Constitutive AmpC hyperproduction is the most frequent mechanism of resistance to the weak AmpC inducers antipseudomonal penicillins and cephalosporins. Previously, we demonstrated that inhibition of the β -N-acetylglucosaminidase NagZ prevents and reverts this mechanism of resistance, which is caused by *ampD* and/or *dacB* (PBP4) mutations in *Pseudomonas aeruginosa*. In this work, we compared NagZ with a second candidate target, the AmpG permease for GlcNAc-1,6-anhydromuropeptides, for their ability to block AmpC expression pathways. Inactivation of *nagZ* or *ampG* fully restored the susceptibility and basal *ampC* expression of *ampD* or *dacB* laboratory mutants and impaired the emergence of one-step ceftazidime-resistant mutants in population analysis experiments. Nevertheless, only *ampG* inactivation fully blocked *ampC* induction, reducing the MICs of the potent AmpC inducer imipenem from 2 to 0.38 μ g/ml. Moreover, through population analysis and characterization of laboratory mutants, we showed that *ampG* inactivation minimized the impact on resistance of the carbapenem porin OprD, reducing the MIC of imipenem for a PAO1 OprD mutant from >32 to 0.5 μ g/ml. AmpG and NagZ targets were additionally evaluated in three clinical isolates that are pan- β -lactam resistant due to AmpC hyperproduction, OprD inactivation, and overexpression of several efflux pumps. A marked increase in susceptibility to ceftazidime and piperacillin-tazobactam was observed in both cases, while only *ampG* inactivation fully restored wild-type imipenem susceptibility. Susceptibility to meropenem, cefepime, and aztreonam was also enhanced, although to a lower extent due to the high impact of efflux pumps on the activity of these antibiotics. Thus, our results suggest that development of small-molecule inhibitors of AmpG could provide an excellent strategy to overcome the relevant mechanisms of resistance (OprD inactivation plus AmpC induction) to imipenem, the only currently available β -lactam not significantly affected by *P. aeruginosa* major efflux pumps.

The increasing prevalence of nosocomial infections produced by multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* strains severely compromises the selection of appropriate treatments and is therefore associated with significant morbidity and mortality (21, 34). Indeed, one of the most striking features of *P. aeruginosa* is its extraordinary capacity for developing resistance to almost any available antibiotic by the selection of mutations in chromosomal genes (24, 28). Among the mutation-mediated β -lactam resistance mechanisms, particularly noteworthy are those leading to the constitutive overexpression of the inducible chromosomal cephalosporinase AmpC, which confers resistance to penicillins, cephalosporins, and monobactams (7, 14). Additionally, mutations that lead to the repression or inactivation of the porin OprD, acting synergistically with inducible or constitutively overexpressed AmpC, confer resistance to carbapenems (8, 26, 37).

AmpC is a chromosomally encoded group I, class C cephalosporinase produced by *P. aeruginosa*, as well as many other nonfermenting Gram-negative bacilli and most *Enterobacteriaceae* (3). Although AmpC is produced at very low basal levels in wild-type strains, its expression is inducible in the presence

of certain β -lactams (β -lactamase inducers), such as ceftazidime and imipenem (27). In fact, the activity of the antipseudomonal penicillins (such as ticarcillin and piperacillin), cephalosporins (such as ceftazidime and cefepime), and monobactams (such as aztreonam) relies on the fact that they are very weak AmpC inducers, since they too are hydrolytically inactivated by this enzyme (27). For this reason, during treatment with these weak inducers, mutants showing constitutive high-level AmpC production (AmpC derepressed mutants) are frequently selected, leading to the failure of antimicrobial therapy (7, 13, 14, 24, 25).

There are several genes involved in the regulation of *ampC* expression, a process that was first investigated in the *Enterobacteriaceae* and found to be intimately linked to peptidoglycan recycling (33, 36). *ampG* encodes an inner membrane permease for GlcNAc-1,6-anhydromuropeptides, which are peptidoglycan catabolites that, upon entry into the cytosol, are processed by the β -N-acetylglucosaminidase, known as NagZ, to generate 1,6-anhydromuropeptides (4, 18, 40). The 1,6-anhydromuropeptide products of NagZ are thought to induce AmpC production by interacting with the LysR-type transcriptional regulator AmpR (2, 6, 11, 12, 22). During regular bacterial growth, 1,6-anhydromuropeptides are processed by the N-acetyl-anhydromuramyl-L-alanine amidase AmpD, avoiding *ampC* induction (10, 20, 36). On the other hand, during growth in the presence of strong β -lactamase inducers, large amounts of muropeptides are generated and accumulate in the cytoplasm,

* Corresponding author. Mailing address: Servicio de Microbiología, Hospital Son Espases, Ctra. Valldemossa 79, 07010 Palma de Mallorca, Spain. Phone: 34 871 20 62 62. Fax: 34 871 90 97 08. E-mail: antonio.oliver@ssib.es.

[∇] Published ahead of print on 28 February 2011.

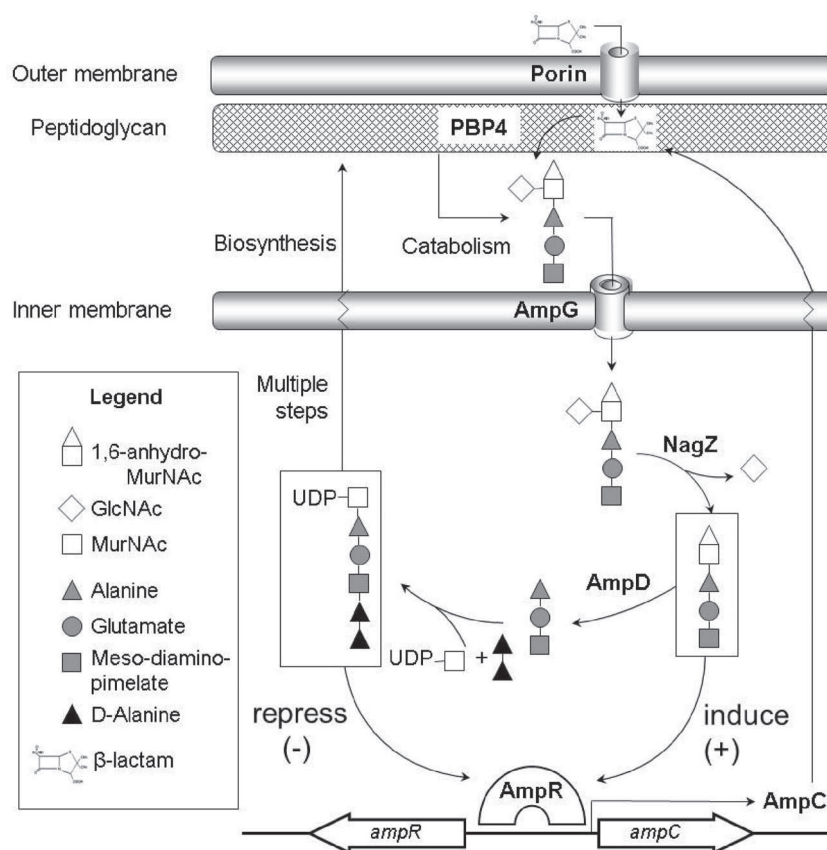


FIG. 1. Schematic representation of the interplay between peptidoglycan recycling, *ampC* regulation, and β -lactam resistance.

which leads to the AmpR-mediated induction of *ampC* expression (6, 11, 12, 22). It is also well-known that the mutational inactivation of AmpD leads to the accumulation of 1,6-anhydromuropeptides and high-level *ampC* expression, even in the absence of β -lactamase inducers, producing the classical constitutively derepressed phenotype of AmpC production (23).

Pseudomonas aeruginosa AmpG (17, 43), AmpR (16), NagZ (1), and AmpD (19) homologues have been identified. Further studies showed that *P. aeruginosa* has 3 *ampD* genes (*ampD*, *ampDh2*, and *ampDh3*) and that their sequential inactivation leads to a stepwise upregulation of *ampC* expression, reaching full derepression with very high level basal *ampC* expression in the triple mutant (15). Recent work showed, however, that one-step high-level resistance in *P. aeruginosa* frequently results, in clinical strains, from the inactivation of *dacB*, encoding the nonessential penicillin-binding protein 4 (PBP4) (31). The inactivation of PBP4 was shown to give rise to a complex β -lactam resistance response, triggering overproduction of the chromosomal β -lactamase AmpC and the specific activation of the CreBC (BlrAB) two-component regulator (31). A schematic representation of the interplay between peptidoglycan recycling, *ampC* regulation, and β -lactam resistance is shown in Fig. 1.

Development of strategies for combating these resistance mechanisms is crucial for preserving the activity of needed β -lactam antibiotics (29). Given that NagZ removes GlcNAc to produce the 1,6-anhydromuropeptides (4, 40), inhibitors of this enzyme have been shown to mitigate AmpC-driven resistance

(39). In previous studies, we have demonstrated that inactivation or direct inhibition of NagZ in *P. aeruginosa* prevents and reverts resistance to the weak AmpC inducers antipseudomonal penicillins and cephalosporins driven by constitutive overexpression of AmpC caused by either AmpD or PBP4 mutations (1, 42). NagZ inactivation also attenuated the high-level resistance of the AmpD-PBP4 double mutant, although wild-type susceptibility was not fully restored (42). Additionally, NagZ inactivation did not block *ampC* inducibility in the presence of the strong inducer cefoxitin (42). The molecular basis for this incomplete inhibition of the AmpC regulatory pathway remains unclear, although the possibility that it could arise from the interaction of the accumulated NagZ substrates (GlcNAc-1,6-anhydromuropeptides) with AmpR cannot be ruled out. In any event, we speculate that blocking peptidoglycan recycling earlier in the pathway could be more efficient. Thus, in this work we comparatively evaluated NagZ with a second candidate target, AmpG, in a collection of *P. aeruginosa* laboratory mutants and well-characterized pan- β -lactam-resistant clinical strains.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids, and susceptibility testing. The bacterial strains and plasmids used or constructed in this study are listed in Table 1. MICs of ceftazidime, cefepime, aztreonam, piperacillin-tazobactam, imipenem, meropenem, and ciprofloxacin were determined using Etest strips (AB Biodisk, Solna, Sweden) on Mueller-Hinton (MH) agar, according to the manufacturer's recommendations.

TABLE 1. Strains and plasmids used or constructed

Strain or plasmid	Genotype/relevant characteristics ^a	Reference or source
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Reference strain completely sequenced	Laboratory collection
PAΔD	PAO1 Δ <i>ampD</i> :: <i>lox</i>	15
PAΔdB	PAO1 Δ <i>dacB</i> :: <i>lox</i>	31
PAdacB	1A1 spontaneous <i>dacB</i> mutant (W273X) of PAO1	31
PAdacBΔD	PAdacB Δ <i>ampD</i> :: <i>lox</i>	31
PAΔR	PAO1 Δ <i>ampR</i> :: <i>lox</i>	31
PAΔC	PAO1 Δ <i>ampC</i> :: <i>lox</i>	30
PAΔnZ	PAO1 Δ <i>nagZ</i> :: <i>lox</i>	42
PAΔDnZ	PAO1 Δ <i>ampD</i> :: <i>lox</i> Δ <i>nagZ</i> :: <i>lox</i>	42
PAΔdBnZ	PAO1 Δ <i>dacB</i> :: <i>lox</i> Δ <i>nagZ</i> :: <i>lox</i>	42
PAdacBΔDnZ	PAdacB Δ <i>ampD</i> :: <i>lox</i> Δ <i>nagZ</i> :: <i>lox</i>	42
PAΔG	PAO1 Δ <i>ampG</i> :: <i>lox</i>	This work
PAΔDG	PAO1 Δ <i>ampD</i> :: <i>lox</i> Δ <i>ampG</i> :: <i>lox</i>	This work
PAΔDBG	PAO1 Δ <i>dacB</i> :: <i>lox</i> Δ <i>ampG</i> :: <i>lox</i>	This work
PAdacBΔDG	PAdacB Δ <i>ampD</i> :: <i>lox</i> Δ <i>ampG</i> :: <i>lox</i>	This work
PAOD1	Spontaneous <i>oprD</i> null mutant (W65X) of PAO1	32
PAOD1ΔnZ	PAOD1 Δ <i>nagZ</i> ::Gm <i>lox</i>	This work
PAOD1ΔG	PAOD1 Δ <i>ampG</i> ::Gm <i>lox</i>	This work
JSG2A1	Pan-β-lactam resistant <i>P. aeruginosa</i> clinical strain	14
JSG2A1ΔnZ	JSG2A1 Δ <i>nagZ</i> ::Gm <i>lox</i>	This work
JSG2A1ΔG	JSG2A1 Δ <i>ampG</i> ::Gm <i>lox</i>	This work
MQB1C5	Pan-β-lactam-resistant <i>P. aeruginosa</i> clinical strain	14
MQB1C5ΔnZ	MQB1C5 Δ <i>nagZ</i> ::Gm <i>lox</i>	This work
MQB1C5ΔG	MQB1C5 Δ <i>ampG</i> ::Gm <i>lox</i>	This work
OFC2I4	Pan-β-lactam-resistant <i>P. aeruginosa</i> clinical strain	14
OFC2I4ΔnZ	OFC2I4 Δ <i>nagZ</i> ::Gm <i>lox</i>	This work
OFC2I4ΔG	OFC2I4 Δ <i>ampG</i> ::Gm <i>lox</i>	This work
<i>E. coli</i>		
XL1-Blue	F':Tn10 <i>proA</i> ⁺ <i>proB</i> ⁺ <i>lacI</i> ⁺ Δ(<i>lacZ</i>)M15/ <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> (Nal ^r) <i>thi</i> <i>hsdR17</i> (<i>r_k</i> ⁻ <i>m_k</i> ⁻) <i>mcrB1</i>	Laboratory collection
S17.1	<i>recA pro</i> (RP4-2Tet::Mu Kan::Tn7)	Laboratory collection
Plasmids		
pUCP26	Tc ^r , pUC-18-based <i>Escherichia-Pseudomonas</i> shuttle vector	41
pUCP26ampG	pUC26 containing PAO1 <i>ampG</i> gene	This work
pEX100Tlink	Ap ^r <i>sacB</i> , pUC19-based gene replacement vector with an MCS	38
pEX18Tc	Tc ^r <i>sacB</i> , pUC18-based gene replacement vector with an MCS	9
pUCGmlox	Ap ^r Gm ^r , pUC18-based vector containing the <i>lox</i> -flanked <i>aacCI</i> gene	38
pCM157	Tc ^r , <i>cre</i> expression vector	38
pEXnZ	pEX100Tlink containing 5' and 3' flanking sequence of <i>nagZ</i>	42
pEXnZGm	pEX100Tlink containing 5' and 3' flanking sequence of <i>nagZ</i> ::Gm <i>lox</i>	42
pEXTcΔ <i>ampG</i> ::Gm	pEX18Tc containing 5' and 3' flanking sequence of <i>ampG</i> ::Gm <i>lox</i>	This work

^a MCS, multiple cloning site; Ap^r, ampicillin resistant; Gm^r, gentamicin resistant; Tc^r, tetracycline resistant.

Additionally, MICs of ceftazidime were determined by microdilution in 100 μl of cation-adjusted MH broth following CLSI guidelines (5). The phenotypic determination of AmpC inducibility was performed by assessing MH agar plates for the presence of antagonism between imipenem and ceftazidime disks (separated 5 to 30 mm) as previously described (15).

Construction of *nagZ*- and *ampG*-knockout mutants. The *nagZ*- and *ampG*-knockout mutants generated in this study from several PAO1 derivative mutants

and pan-β-lactam-resistant clinical strains are shown in Table 1. Knockout mutants were constructed following well-established procedures (15, 31) based on the *cre-lox* system for gene deletion and antibiotic resistance marker recycling in *P. aeruginosa* (38). The previously constructed plasmid pEXnZGm (Δ*nagZ*::Gm) (42) was used as the donor for the generation of *nagZ*-knockout mutants. For the construction of *ampG*-knockout mutants, upstream and downstream PCR products (Table 2) of *ampG* (using PAO1 DNA as the template) were digested with

TABLE 2. Primers used for cloning and construction of *ampG* knockout mutants

Primer	Sequence (5'-3') ^a	PCR product size (bp)	Use
AGF1-ERI	GATATAGAATTCCGGTCCGCGGGCCACCATCTG	823	<i>ampG</i> inactivation
AGR1-XbI	TATATCTCTAGAGCTGGCGGGAGACTTGTAGGC		
AGF2-XbI	GATATATCTAGATACGTCACCGCGGTGATGGGC	621	
AGR2-HD3	TATATCAAGCTTGTGCTGATCCTGCTGTTCGCG		
AGF-ERI	GATATAGAATTCAAGAAGGAGATATACATATGACTCAGCAATCCTGG	1,785	<i>ampG</i> cloning
AGR-HD3	TATATCAAGCTTTCAGTGTGCTCGGCGTTCTGGTGTCCC		

^a Restriction sites for endonucleases are underlined.

either EcoRI or HindIII and XbaI and cloned by a three-way ligation into pEX18Tc (9). The resulting plasmid (pEXTcΔampG) was transformed into *Escherichia coli* NM522, and transformants were selected on LB agar plates supplemented with 5 μg/ml tetracycline. The *lox*-flanked gentamicin resistance cassette (*aac1*) obtained by XbaI restriction of plasmid pUCGmlox was cloned into the single site for this enzyme formed by the ligation of the two flanking fragments. The resulting plasmid (pEXTcΔampG::Gm) was again transformed into *E. coli* NM522, and transformants were selected on LB agar plates supplemented with 5 μg/ml tetracycline and 5 μg/ml gentamicin. The plasmid was then transformed into the *E. coli* S17.1 helper strain. The different *nagZ*- or *ampG*-knockout mutants were then generated by conjugational transfer of pEXnZGm or pEXTcΔampG::Gm from *E. coli* S17.1 to the corresponding *P. aeruginosa* strains, followed by selection of double recombinants on LB agar containing 10% sucrose and 30 μg/ml gentamicin. Double recombinants were checked first by screening for carbenicillin (for pEXnZGm) or tetracycline (for pEXTcΔampG::Gm) susceptibility and then by PCR amplification and sequencing. For the recycling of the gentamicin resistance cassettes, plasmid pCM157 was electroporated into the different mutants. Transformants were selected on LB agar plates supplemented with 250 μg/ml tetracycline. One transformant for each mutant was grown overnight in LB broth with 250 μg/ml tetracycline in order to allow the expression of the *cre* recombinase. Plasmid pCM157 was then cured from the strains by successive passages on LB broth. Selected colonies were then screened for tetracycline (250 μg/ml) and gentamicin (30 μg/ml) susceptibility and checked by PCR amplification and DNA sequencing.

Cloning of wild-type *ampG* gene and complementation experiments. The wild-type PAO1 *ampG* gene was PCR amplified using the primers listed in Table 2. The PCR product was digested with EcoRI and HindIII and ligated into plasmid pUCP26. The ligation reaction was used to transform chemically competent *E. coli* NM522 cells, and transformants were selected on LB agar supplemented with 5 μg/ml tetracycline. The recombinant plasmid was isolated from a single transformant, and its presence was verified by restriction analysis and DNA sequencing. The resulting *ampG* expression plasmid (pUCPampG) and pUCP26 (control vector), were electroporated into the *ampG*-knockout mutant of PAO1 (PAΔG). Cefoxitin MICs were determined in triplicate by the broth microdilution method in 100 μl of cation-adjusted Mueller-Hinton broth. Tetracycline (50 μg/ml) was added to the broth in order to maintain the complementation plasmid.

Quantification of basal and induced *ampC* expression. The relative levels of *ampC* mRNA were determined by real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) following previously described protocols (15). Briefly, total RNA from logarithmic-phase-grown cultures (with and without 50 μg/ml of cefoxitin) was obtained with an RNeasy minikit (Qiagen, Hilden, Germany). Fifty nanograms of purified RNA was then used for one-step reverse transcription and real-time

PCR, using a QuantiTect SYBR green reverse transcription-PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany) in a SmartCycler II apparatus (Cepheid, Sunnyvale, CA). Previously described conditions and primers were used (15). The *rpsL* house-keeping gene was used to normalize the expression levels, and results were always referred to PAO1 basal expression. All RT-PCRs were performed in duplicate, and the mean values of mRNA expression resulting from three independent experiments were considered in all cases.

Population analysis of ceftazidime and imipenem susceptibility and resistance emergence. Serial dilutions of 10-ml overnight cultures (MH broth) of PAO1, PAΔnZ, or PAΔG were seeded on MH agar plates containing 0, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, or 16 μg/ml of ceftazidime or imipenem. Colonies growing after 24 h of incubation were counted, to plot the numbers of CFU at each antibiotic concentration. All experiments were performed in triplicate, and the results are shown as mean values ± standard deviations.

Characterization of pan-β-lactam-resistant clinical isolates. Three isolates resistant to all β-lactams tested (including penicillins, cephalosporins, monobactams, and carbapenems), each recovered from a different intensive care unit patient as part of a previous study (14), were used. Each isolate belonged to a different clone, and all were known to overexpress *ampC* due to *ampD* and/or *dacB* (BPB4) mutations (14, 31). The involvement of efflux pump overexpression in the resistance phenotype was also explored in this work. For this purpose, the expression of the genes encoding the four major *P. aeruginosa* efflux pumps, MexAB-OprM (*mexB*), MexCD-OprJ (*mexD*), MexEF-OprN (*mexF*), and MexXY-OprM (*mexY*), was determined by real-time RT-PCR following previously described protocols (35). Briefly, total RNA from logarithmic-phase-grown cultures was obtained with an RNeasy minikit (Qiagen, Hilden, Germany). Fifty nanograms of purified RNA was then used for one-step reverse transcription and real-time PCR, using a QuantiTect SYBR green reverse transcription-PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany) in a SmartCycler II apparatus (Cepheid, Sunnyvale). Previously described conditions and primers were used (35). The *rpsL* house-keeping gene was used to normalize the expression levels, and results were always referred to PAO1 basal expression. All RT-PCRs were performed in duplicate, and the mean values of mRNA expression resulting from three independent experiments were considered in all cases. Overexpression was considered when the corresponding mRNA level was at least 3-fold (*mexB*) or 10-fold (*mexD*, *mexF*, *mexY*) higher than that for PAO1. The involvement of *oprD* inactivation in carbapenem resistance was explored through PCR amplification, followed by sequencing, using previously described primers and conditions (8).

RESULTS AND DISCUSSION

Comparison of AmpG and NagZ as targets to suppress AmpC-driven β-lactam resistance. In previous work (1, 42), we

TABLE 3. MICs and basal and induced *ampC* expression in the studied strains

Strain ^a	MIC (μg/ml) ^b							Relative mRNA level ^c	
	CAZ	FEP	IMP	MER	PTZ	ATM	FOX	Basal	Induced ^d
PAO1	1	1	2	0.5	3	3	2,048	1	78 ± 34
PAΔnZ	1	1	1	0.38	3	3	1,024	-2.1 ± 1.5	469 ± 230
PAΔG	1	1	0.38	0.38	3	2	64	-1.1 ± 0.4	1.9 ± 1.0
PAΔD	8	4	2	1.5	32	8	4,096	47 ± 9.5	134 ± 11
PAΔDnZ	2	2	1	0.75	6	3	1,024	1.0 ± 0.4	483 ± 26
PAΔDG	1	1.5	0.38	0.5	3	1.5	64	-1.5 ± 0.6	1.6 ± 0.8
PAΔdB	24	12	2	0.75	64	16	2,048	51 ± 16	232 ± 67
PAΔdBnZ	1.5	1.5	1	0.5	4	3	1,024	3.0 ± 1.9	661 ± 374
PAΔdBG	1	0.75	0.38	0.38	2	1.5	64	-1.1 ± 1.3	1.2 ± 0.9
PAdacBΔD	96	32	2	2	>256	48	4,096	1,770 ± 414	1,950 ± 480
PAdacBΔDnZ	4	2	1.5	0.75	24	6	1,024	40 ± 17	906 ± 80
PAdacBΔDG	0.75	1	0.38	0.25	1.5	1.5	64	1.7 ± 0.6	1.8 ± 1.5
PAΔR	1.5	1.5	0.5	0.25	4	4	64	3.8 ± 0.4	3.3 ± 0.8
PAΔC	1	1	0.5	0.25	3	3	64	NA	NA

^a PAO1 mutants: PAΔnZ, *nagZ*; PAΔG, *ampG*; PAΔD, *ampD*; PAΔDnZ, *ampD-nagZ*; PAΔDG, *ampD-ampG*; PAΔdB, *dacB*; PAΔdBnZ, *dacB-nagZ*; PAΔdBG, *dacB-ampG*; PAdacBΔD, *dacB-ampD*; PAdacBΔDnZ, *dacB-ampD-nagZ*; PAdacBΔDG, *dacB-ampD-ampG*; PAΔR, *ampR*; PAΔC, *ampC*. Complementation of the PAO1 *ampG* mutant (PAΔG) with plasmid pUCPampG fully restored wild-type cefoxitin MICs.

^b CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; IMP, imipenem; MER, meropenem; PTZ, piperacillin-tazobactam; ATM, aztreonam; FOX, cefoxitin.

^c Relative amount of *ampC* mRNA compared to PAO1 basal levels ± standard deviation. *ampC* expression data for *nagZ* mutants obtained in previous work (42) were included for comparative purposes. NA, not applicable.

^d Induction experiments were carried out with 50 μg/ml of cefoxitin.

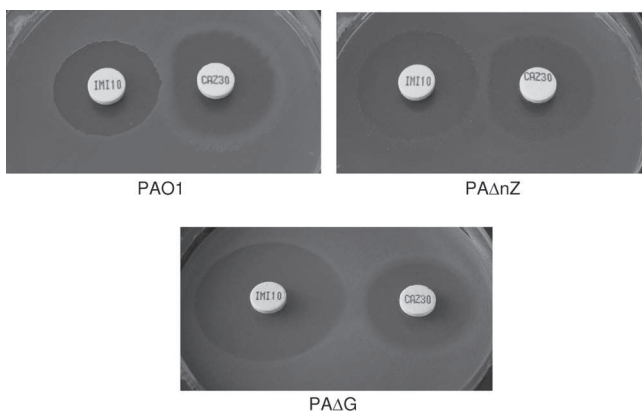


FIG. 2. Double-disk (imipenem-ceftazidime) AmpC induction test with strains PAO1, PA Δ nZ, and PA Δ G.

showed that the inactivation of *nagZ* fully restored susceptibility and basal *ampC* expression of *ampD* or *dacB* single mutants. Major reductions of MICs and *ampC* expression were also observed for the *ampD-dacB* double mutant, although wild-type levels were not fully reached. Furthermore, we showed that *nagZ* inactivation had little effect on *ampC* inducibility. In order to identify effective targets for suppressing AmpC-driven resistance in *P. aeruginosa*, here we compared the effects of *ampG* and *nagZ* inactivation, and the results are shown in Table 3. As shown, *ampG* inactivation fully restored susceptibility and basal *ampC* expression in *ampD* and *dacB* single and double mutants. More importantly, in contrast to *nagZ* inactivation, it fully blocked AmpC inducibility, as evidenced by *ampC* expression data (Table 3), results of the imipenem-ceftazidime double-disk AmpC induction test (Fig. 2), or the marked hypersusceptibility of the *ampG* mutants to the AmpC inducers imipenem and ceftazidime.

Blocking *ampC* induction through AmpG inactivation prevents and reverts imipenem resistance driven by lack of OprD expression. The results presented above suggested that both

NagZ and *AmpG* are necessary for resistance to the weak inducers, including antipseudomonal penicillins and cephalosporins, acquired through *AmpD* or *PBP4* mutations that lead to constitutive *AmpC* overexpression. Indeed, through a population analysis of ceftazidime susceptibility (Fig. 3A), we documented that the behaviors of *nagZ* and *ampG* mutants are essentially identical: deletion of either gene impaired the emergence of one-step ceftazidime-resistant mutants at concentrations of ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ (susceptibility breakpoint), in sharp contrast to results for wild-type PAO1, in which mutants were still readily selected at concentrations of at least 16 $\mu\text{g/ml}$. On the other hand, major differences were observed between *nagZ* and *ampG* mutants in the population analysis of susceptibility to the potent AmpC inducer imipenem (Fig. 3B). While PAO1 imipenem-resistant mutants were detected at concentrations of up to 8 $\mu\text{g/ml}$ (resistance breakpoint), *nagZ* inactivation significantly increased imipenem susceptibility and reduced the highest concentration yielding mutants by 4-fold (to 2 $\mu\text{g/ml}$). Nevertheless, remarkably, this effect was far more intense for the *ampG* mutant, which yielded no imipenem-resistant mutants at concentrations above 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (16-fold lower than that for PAO1).

These results suggested that *ampG* inactivation might minimize the impact of the most relevant imipenem resistance mechanism in *P. aeruginosa*, the inactivation of the carbapenem porin OprD. To test this possibility, we constructed and analyzed the *nagZ* and *ampG* mutants of a previously generated *oprD* mutant of PAO1 (32). Indeed, as shown in Table 4, imipenem MICs of the PAO1 *oprD* mutant (>32 $\mu\text{g/ml}$) were reduced to 6 $\mu\text{g/ml}$ in the *nagZ* mutant and to 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (below wild-type PAO1 MICs) in the *ampG* mutant. These results clearly indicate that inducible *ampC* expression (which is blocked through *AmpG* inactivation) is necessary for OprD inactivation-driven imipenem resistance, in agreement with previous evidence (26).

Comparison of AmpG and NagZ as targets for restoring susceptibility in pan- β -lactam-resistant *P. aeruginosa* clinical strains. *P. aeruginosa* pan- β -lactam resistance in the clinical

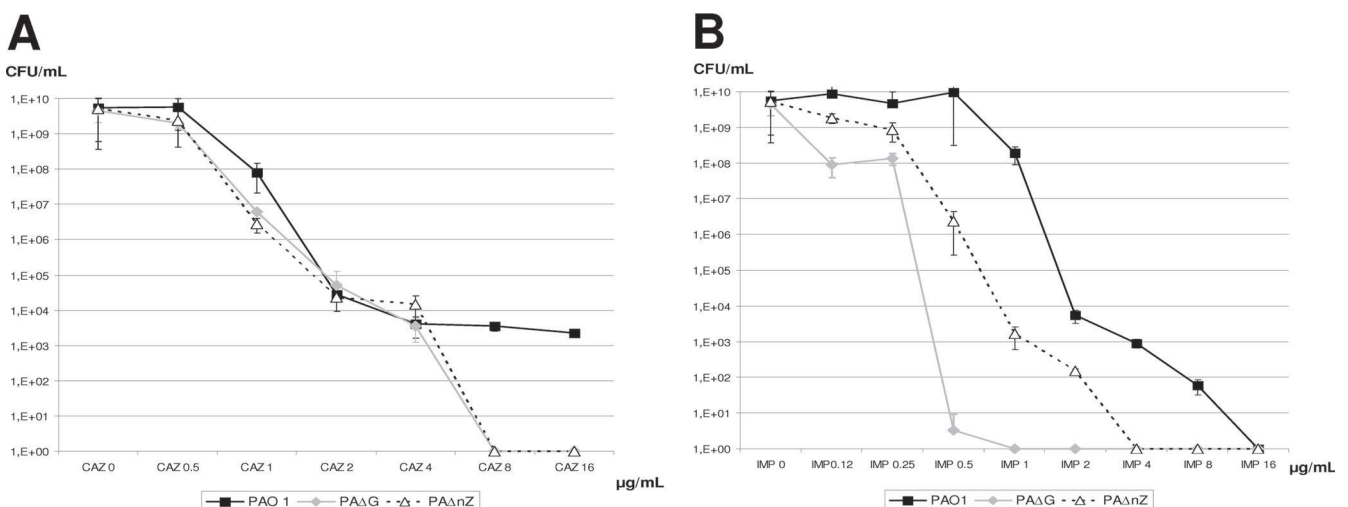


FIG. 3. Population analysis of PAO1, PA Δ nZ, and PA Δ G ceftazidime (CAZ) (A) and imipenem (IMP) (B) susceptibility. Overnight cultures of PAO1, PA Δ nZ, or PA Δ G were plated on MH agar containing 0, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, and 16 $\mu\text{g/ml}$ of ceftazidime or imipenem, and the CFU counts were enumerated after 24 h of incubation. The results are shown as mean values of 3 experiments \pm standard deviations.

TABLE 4. MICs of *nagZ* and *ampG* mutants of pan- β -lactam-resistant *P. aeruginosa* clinical strains

Strain ^a	Resistance mechanism				MIC (μ g/ml) ^d						
	AmpD ^b	PBP4 ^b	OprD	Efflux ^c	CAZ	FEP	IMP	MER	PTZ	ATM	CIP ^e
PAO1					1.5	1.5	2	0.38	2	4	0.094
PAOD1			W65X		1.5	1.5	>32	2	1.5	4	0.094
PAOD1 Δ nZ					1.5	1.5	6	2	2	2	0.094
PAOD1 Δ G					1.5	1.5	0.5	2	2	2	0.094
JSG2A1	Ins. 1 bp (C) in nt 481	T428P	Δ oprD	<i>mexB</i> (6.5-fold)	192	96	>32	>32	>256	128	3
JSG2A1 Δ nZ					8	16	>32	>32	24	32	3
JSG2A1 Δ G					3	8	1.5	24	8	32	3
MQB1C5	Q155X		W339X	<i>mexB</i> (14-fold) <i>mexY</i> (21-fold)	24	24	>32	>32	96	64	1
MQB1C5 Δ nZ					3	16	>32	>32	12	32	1
MQB1C5 Δ G					3	8	2	>32	12	32	0.75
OFC2I4	Δ ampDE	M200I, del. D201	Δ oprD	<i>mexY</i> (12-fold) <i>mexF</i> (10-fold)	48	24	>32	>32	>256	32	0.38
OFC2I4 Δ nZ					3	12	>32	6	16	4	0.38
OFC2I4 Δ G					1.5	8	1.5	3	3	4	0.38

^a *nagZ* (Δ nZ) and *ampG* (Δ G) mutants of the OprD mutant of PAO1 (PAOD1) and pan- β -lactam-resistant clinical strains JSG2A1, MBQ1C5, and OFC3I4.

^b Mutations in *ampD* and *dacB* (PBP4) were documented in previous studies (14, 31). Ins., insertion; nt, nucleotide; del., deletion.

^c Relative expression of efflux pump-encoding genes compared to that in wild-type PAO1. Breakpoints used for defining overexpression were \geq 3-fold for *mexB* and \geq 10-fold for *mexY*, *mexD*, and *mexF*.

^d CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; IMP, imipenem; MER, meropenem; PTZ, piperacillin-tazobactam; ATM, aztreonam; CIP, ciprofloxacin.

^e Ciprofloxacin MICs were included as a control to evaluate the specificity of the effect of *nagZ* and *ampG* inactivation on β -lactam susceptibility.

setting is known to frequently result from the interplay of AmpC hyperproduction, OprD inactivation, and the overexpression of efflux pumps (24, 28). Thus, we evaluated the effect of *nagZ* and *ampG* inactivation in three different clones of well-characterized pan- β -lactam-resistant *P. aeruginosa* clinical isolates. These strains were already known to overexpress *ampC* due to *ampD* and/or *dacB* (PBP4) mutations (14, 31). In this work, we documented that all three isolates additionally presented *oprD*-inactivating mutations and overexpressed one or several efflux pumps (Table 4). Both *nagZ* and *ampG* inactivation notably increased β -lactam susceptibility in the clinical strains, although important differences were again observed (Table 4). A marked effect on ceftazidime and piperacillin-tazobactam susceptibility was observed in both cases, although knocking out *ampG* had a greater effect in the two *ampD*-*dacB* double mutants. Again, the sharpest differences were observed for imipenem, with *ampG* inactivation fully restoring wild-type susceptibility for the three isolates. Susceptibility to meropenem, cefepime, and aztreonam was also enhanced, although to a lower extent, consistent with the higher impact of efflux pump overexpression on the activity of these antibiotics. It should thus be noted that imipenem is likely the optimal candidate for combination with future potential AmpG inhibitors, given that this strategy impairs the interplay of the most relevant mechanism of resistance (OprD inactivation and AmpC induction) to this antibiotic, which is the only currently available β -lactam not significantly impacted by any of the *P. aeruginosa* major efflux pumps (24).

Concluding remarks. In summary, we show that NagZ and AmpG are excellent targets for reverting and preventing the emergence of resistance to the weak AmpC inducers antipseudomonal penicillins and cephalosporins, driven by AmpC overexpression due to an AmpD and/or DacB mutation. Indeed, we have already shown the potential utility of small-molecule NagZ inhibitors for this purpose (1, 42), and research directed

to the identification of AmpG inhibitors is ongoing. The latter strategy is highly encouraging, since we show that *ampG* inactivation fully blocks *ampC* induction, additionally minimizing the impact of OprD inactivation on imipenem resistance both in laboratory mutants and in pan- β -lactam-resistant clinical strains.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain and the Instituto de Salud Carlos III through the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI C03/14 and RD06/0008) and grant PS09/00033, as well as the Canadian Institutes of Health Research and the Canadian Cystic Fibrosis Foundation.

D.J.V. is a Tier II Canada Research Chair in Chemical Glycobiology and a scholar of the Michael Smith Foundation for Health Research. We thank V. Larmour for technical assistance.

REFERENCES

1. Asgarali, A., K. A. Stubbs, A. Oliver, D. J. Voadlo, and B. J. Mark. 2009. Inactivation of the glycoside hydrolase NagZ attenuates antipseudomonal β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:2274–2275.
2. Balcewich, M. D., et al. 2010. Crystal structure of the AmpR effector binding domain provides insight into the molecular regulation of inducible AmpC β -lactamase. *J. Mol. Biol.* **400**:998–1010.
3. Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1211–1233.
4. Cheng, Q., H. Li, K. Merdek, and J. T. Park. 2000. Molecular characterization of the β -N-acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and its role in cell wall recycling. *J. Bacteriol.* **182**:4836–4840.
5. CLSI/NCCLS. 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 6th ed. (M7-A6). CLSI/NCCLS, Wayne, PA.
6. Dietz, H., D. Pfeifle, and B. Wiedemann. 1997. The signal molecule for β -lactamase induction in *Enterobacter cloacae* is the anhydromuramyl-pentapeptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2113–2120.
7. Givercman, B., P. A. Lambert, V. T. Rosdahl, G. H. Shand, and N. Hoiby. 1990. Rapid emergence of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients due to in-vivo selection of stable partially derepressed β -lactamase producing strains. *J. Antimicrob. Chemother.* **26**:247–259.
8. Gutiérrez, O., et al. 2007. Molecular epidemiology and mechanisms of car-

- bapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:4329–4335.
9. **Hoang, T. T., R. R. Karkhoff-Schweizer, A. J. Kutchma, and H. P. Schweizer.** 1998. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**:77–86.
 10. **Höltje, J. V., U. Kopp, A. Ursinus, and B. Wiedemann.** 1994. The negative regulator of β -lactamase induction AmpD is a N-acetyl-anhydromuramyl-L-alanine amidase. *FEMS Microbiol. Lett.* **122**:159–164.
 11. **Honore, N., M. H. Nicolas, and S. T. Cole.** 1986. Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. *EMBO J.* **5**:3709–3714.
 12. **Jacobs, C., L. Huang, E. Bartowsky, S. Normark, and J. T. Park.** 1994. Bacterial cell wall recycling provides cytosolic muropeptides as effectors for β -lactamase induction. *EMBO J.* **13**:4684–4694.
 13. **Juan, C., et al.** 2005. Contribution of clonal dissemination and selection of mutants during therapy to *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance in an intensive care unit setting. *Clin. Microbiol. Infect.* **11**:887–892.
 14. **Juan, C., et al.** 2005. Molecular mechanisms of β -lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4733–4738.
 15. **Juan, C., B. Moyá, J. L. Pérez, and A. Oliver.** 2006. Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high level beta-lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1780–1787.
 16. **Kong, K. F., et al.** 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.
 17. **Kong, K. F., A. Aguila, L. Schneper, and K. Mathee.** 2010. *Pseudomonas aeruginosa* beta-lactamase induction requires two permeases, AmpG and AmpP. *BMC Microbiol.* **10**:328.
 18. **Korfmann, G., and C. C. Sanders.** 1989. *ampG* is essential for high level expression of AmpC beta-lactamase in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1946–1951.
 19. **Langae, T. Y., L. Cagnon, and A. Huletsky.** 2000. Inactivation of the *ampD* gene in *Pseudomonas aeruginosa* leads to moderate-basal-level and hyperinducible AmpC β -lactamase expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:583–589.
 20. **Lee, M., et al.** 2009. Bacterial AmpD at the crossroads of peptidoglycan recycling and manifestation of antibiotic resistance. *J. Am. Chem. Soc.* **131**:8742–8743.
 21. **Leibovici, L., et al.** 1998. The benefit of appropriate empirical antibiotic treatment in patients with bloodstream infection. *J. Intern. Med.* **244**:379–386.
 22. **Lindberg, F., L. Westman, and S. Normark.** 1985. Regulatory components in *Citrobacter freundii ampC* β -lactamase induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**:4620–4624.
 23. **Lindberg, F., S. Lindquist, and S. Normark.** 1987. Inactivation of the *ampD* gene causes semiconstitutive overproduction of the inducible *Citrobacter freundii* β -lactamase. *J. Bacteriol.* **169**:1923–1928.
 24. **Lister, P. D., D. J. Wolter, and N. D. Hanson.** 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**:582–610.
 25. **Livermore, D. M.** 1987. Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **6**:439–445.
 26. **Livermore, D. M.** 1992. Interplay between impermeability and chromosomal β -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:2046–2048.
 27. **Livermore, D. M.** 1995. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**:557–584.
 28. **Livermore, D. M.** 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin. Infect. Dis.* **34**:634–640.
 29. **Llarrull, L. I., S. A. Testero, J. F. Fisher, and S. Mobashery.** 2010. The future of β -lactam antibiotics. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**:551–557.
 30. **Moya, B., C. Juan, S. Alberti, J. L. Perez, and A. Oliver.** 2008. Benefit of having multiple *ampD* genes for acquiring β -lactam resistance without losing fitness and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:3694–3700.
 31. **Moya, B., et al.** 2009. β -Lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS Pathog.* **5**:e1000353.
 32. **Moya, B., et al.** 2010. Activity of a new cephalosporin, CXA-101 (FR264205), against β -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants selected in vitro and after antipseudomonal treatment of intensive care unit patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:1213–1217.
 33. **Normark, S.** 1995. β -Lactamase induction in Gram-negative bacteria is intimately linked to peptidoglycan recycling. *Microb. Drug Resist.* **1**:111–114.
 34. **Obritsch, M. D., D. N. Fish, R. MacLaren, and R. Jung.** 2004. National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:4606–4610.
 35. **Oh, H., S. Stenhoff, S. Jalal, and B. Wretling.** 2003. Role of efflux pumps and mutations in genes for topoisomerases II and IV in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Microb. Drug Resist.* **8**:323–328.
 36. **Park, J. T., and T. Uehara.** 2008. How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**:211–227.
 37. **Quale, J., S. Bratu, J. Gupta, and D. Landman.** 2006. Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1633–1641.
 38. **Quéné, L., D. Lamotte, and B. Polack.** 2005. Combined *sacB*-based negative selection and *cre-lox* antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechniques* **38**:63–67.
 39. **Stubbs, K. A., M. Balcewich, B. L. Mark, and D. J. Vocado.** 2007. Small molecule inhibitors of a glycoside hydrolase attenuate inducible AmpC-mediated β -lactam resistance. *J. Biol. Chem.* **282**:21382–21391.
 40. **Vöstch, W., and M. F. Templin.** 2000. Characterization of a β -N-acetylglucosaminidase of *Escherichia coli* and elucidation of its role in muropeptide recycling and β -lactamase induction. *J. Biol. Chem.* **275**:39032–39038.
 41. **West, S. E., H. P. Schweizer, C. Dall, A. K. Sample, and L. J. Runyen-Janecky.** 1994. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **148**:81–86.
 42. **Zamorano, L., et al.** 2010. NagZ inactivation prevents and reverts β -lactam resistance, driven by AmpD and PBP4 mutations, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:3557–3563.
 43. **Zhang, Y., et al.** 2010. *ampG* gene of *Pseudomonas aeruginosa* and its role in β -lactamase expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:4472–4479.

