



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

TESI DOCTORAL

Fenotips de resistència a antibiòtics en
Stenotrophomonas maltophilia:
Impacte en la susceptibilitat a la colistina

SÒNIA MARTÍNEZ-SERVAT

Juny 2018



Universitat Autònoma de Barcelona

Parc de Recerca UAB

Institut de Biotecnologia i Biomedicina

Departament de Genètica i Microbiologia – Facultat de Biociències



Fenotips de resistència a antibiòtics en
Stenotrophomonas maltophilia:
Impacte en la susceptibilitat a la colistina

Tesi doctoral presentada per **Sònia Martínez-Servat** per optar al grau de **Doctora** en **Microbiologia** per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Vist-i-plau dels Directors de la Tesi,

Dr. Isidre Gibert González

Dr. Daniel Yero Corona

Bellaterra, Juny 2018

A la meva mare, al meu pare, a en Genís i a l'Adrià.



AGRAÏMENTS

AGRAÏMENTS

M'agradaria que aquestes línies servissin per expressar el meu agraïment a totes aquelles persones que amb la seva ajuda han col·laborat en la realització d'aquesta tesi.

En primer lloc, m'agradaria agrair al Dr. Isidre Gibert la gran confiança que ha dipositat en mi com a director d'aquesta tesi. Gràcies per la teva generositat, ajuda permanent i pel respecte mostrat en tot moment, però sobretot, per la motivació i recolzament rebut al llarg d'aquests anys.

De manera especial expresso el meu més sincer agraïment al codirector d'aquesta tesi, al Dr. Daniel Yero, qui, a més a més de contribuir directament en la conformació tant teòrica com empírica de la present investigació, ha mostrat un estil de treball cooperatiu, professional i humà que representa un model a seguir. Gràcies pel teu optimisme, pels teus inestimables consells i per la teva gran experiència.

Als meus estimats companys de laboratori, Xavi, Celeste, Paula, Pol, Meissi, Pablo, amb qui hem après i compartit moltes experiències, vull agrair-los que, malgrat les dificultats d'aquest camí, hem aconseguit que només els somriures acompanyin el nostre treball diari. I, en especial, al Pol, per les seves oportunes i intel·ligents observacions que han contribuït de forma significativa a millorar aquesta tesi doctoral. També a tot als companys del IBB, en particular, al grup de Bioinformàtica, Xavi Daura, Òscar gràcies per tota l'ajuda i col·laboració.

Vull recordar-me també dels estudiants que han realitzat els seus projectes de final de carrera amb mi (Pablo, Míriam, Alba, Marta, Bea, Roser, Paula, Albert i Gara). El seu treball també ha estat important per tal que aquesta tesi arribés a bon port.

Als meus amics, Iris, Roger, Lola, Oriol, Clara, Tània, Montse, Pell, TQs, Uni... a qui he robat hores de companyia i que sempre han confiat en la meua capacitat per finalitzar aquest treball.

A la família, per tota l'estima que m'han mostrat al llarg d'aquests anys i, en especial, als meus pares; papa, mama, gràcies per recolzar-me en totes les decisions que he pres al llarg de la vida i, especialment, per ensenyar-me a lluitar per tot el que vull i acabar el que començo. Sou el més important per mi.

I, finalment, a tu, Adrià, per ser el principal responsable que aquest treball arribi a la seva fi, estant incondicionalment sempre al meu costat, en els bons i mals moments, animant-me sempre a continuar. Et dono les gràcies per tots els esforços que has fet, per fer-me creure cada dia que ho podia aconseguir, per tota la teva ajuda i, principalment, per fer-me feliç. Per tot això i molt més, aquesta tesi també és teva.

ÍNDEX

ÍNDEX

RESUM	XIX
ABSTRACT	XXI
ABREVIATURES I ACRÒNIMS.....	XXV
1. INTRODUCCIÓ	3
1.1. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>: característiques generals.....	3
1.1.1. Taxonomia	3
1.1.2. Microbiologia i habitat	3
1.1.3. Genoma	4
1.2. Importància clínica de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4
1.2.1. Incidència.....	5
1.2.2. Manifestacions clíniques i factors de risc de mortalitat.	5
1.2.3. Estratègies per al tractament terapèutic	7
1.3. El resistoma en <i>S. maltophilia</i>	9
1.3.1. Resistoma intrínsec: Resistència intrínseca.....	10
1.3.1.1. Lipopolisacàrid.....	11
1.3.2. Resistoma intrínsec: Resistència fenotípica	12
1.3.2.1. Formació de biofilms.....	12
1.3.2.2. <i>Quorum sensing</i>	13
1.3.2.3. Dormència o inactivitat.....	14
1.3.2.4. Resistència adaptativa	14
1.3.2.5. Regulació o modificació post-transcripcional i post-traducciona	15
1.3.2.6. Altres factors descrits en <i>S. maltophilia</i>	15
1.3.3. Mecanismes específics de resistència a antibiòtics en <i>S. maltophilia</i>	15
1.3.3.1. β -lactamases	15
1.3.3.2. Bombes d'expulsió	15
1.3.3.3. Mecanismes de resistència a TMP/SMX	16
1.3.3.4. Mecanismes de resistència a quinolones	16
1.3.3.5. Mecanismes de resistència a aminoglicòsids	16
1.4. La colistina	18
1.4.1. Estructura química	18
1.4.2. Mode d'acció	19
1.4.3. Espectre d'acció	21
1.4.4. Toxicitat.....	21
1.4.5. Teràpia combinada.....	22

1.4.6.	Resistència a la colistina	23
1.4.6.1.	Resistència intrínseca o natural.....	23
1.4.6.2.	Modificació del LPS	23
1.4.6.3.	RamA	26
1.4.6.4.	Polisacàrids capsulars	26
1.4.6.5.	Bombes d'expulsió.....	27
1.4.6.6.	Gens <i>mcr</i> (<i>mobile colistin resistance</i>)	27
1.4.6.7.	Heteroresistència a la colistina.....	29
1.4.6.8.	Resistència adaptativa a la colistina	29
1.4.7.	Metòdes per determinar la susceptibilitat a la colistina	30
2.	OBJECTIUS	35
3.	MATERIALS I MÈTODES	39
3.1.	Soques bacterianes, condicions de creixement i solucions estoc	39
3.1.1.	Soques bacterianes	39
3.1.1.1.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	39
3.1.1.2.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
3.1.1.3.	<i>Escherichia coli</i>	41
3.1.2.	Condicions de creixement	42
3.1.3.	Condicions de conservació i manteniment	42
3.1.4.	Medis de cultiu	42
3.1.5.	Antibiòtics.....	44
3.1.6.	Altres solucions	44
3.2.	Caracterització genotípica dels aïllats de <i>S. maltophilia</i>	45
3.3.	Proves fenotípiques per a <i>S. maltophilia</i>	45
3.3.1.	Susceptibilitat a antibiòtics	45
3.3.1.1.	Estudis de susceptibilitat i fenotips de resistència a la colistina	46
•	BMD (Broth microdilution method).....	46
•	Corbes de creixement	48
•	Heteroresistència	49
3.3.2.	Formació de biofilms.....	50
3.3.3.	Determinació de la virulència en el model de <i>Caenorhabditis elegans</i>	50
3.3.3.1.	Soques de <i>C. elegans</i> utilitzades	50
3.3.3.2.	Preparació de plaques amb <i>C. elegans</i> i el seu manteniment	51
3.3.3.3.	Conservació i recuperació de <i>C. elegans</i>	51
3.3.3.4.	Sincronització de <i>C. elegans</i>	52
3.3.3.5.	Infecció de <i>C. elegans</i>	52

3.4. Generació de mutants en <i>S. maltophilia</i>	53
3.4.1. Disseny de l'estratègia	55
3.4.2. Plasmidis, oligonucleòtids i soques.....	56
3.4.3. Tècniques generals de biologia molecular per obtenir els plasmidis per mutar i complementar	59
3.4.4. Obtenció de mutants en <i>S. maltophilia</i> K279a.....	61
3.4.5. Complementació de mutants	63
3.5. Anàlisi de seqüències.....	63
3.6. Anàlisi estadístic.....	64
4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	67
4.1. Caracterització fenotípica i genotípica de les 81 soques clíniques.....	67
4.1.1. Caracterització molecular i classificació de les soques de <i>S. maltophilia</i> en grups genòmics.....	67
4.1.2. Susceptibilitat antimicrobiana	70
4.1.3. Formació de biofilm	73
4.1.4. Determinació de la virulència en <i>C. elegans</i>	75
4.1.5. Associació dels grups genòmics amb totes les variables fenotípiques estudiades	78
4.2. Estudis fenotípics associats a la resistència heterogènia a la colistina	83
4.2.1. Problemàtica en la interpretació de la susceptibilitat a la colistina mitjançant el mètode de referència BMD.....	83
4.2.2. Resistència heterogènia observada amb el mètode Etest	86
4.2.3. Fenòmens implicats en la resistència a colistina en <i>S. maltophilia</i>	89
4.3. Determinants genètics associats a la resistència a la colistina	93
4.3.1. Predicció per homologia dels determinants a la resistència a la colistina (resistoma) en <i>S. maltophilia</i>	93
4.3.2. Selecció de gens candidats mitjançant la validació del sistema ortòleg en <i>P. aeruginosa</i>	96
4.3.3. Dianes seleccionades per a la generació de mutants en <i>S. maltophilia</i> K279a.....	97
4.3.4. Anàlisi fenotípic de mutants per als homòlegs a <i>S. maltophilia</i> dels gens <i>mcr</i>	98
4.3.5. Anàlisi fenotípic d'un mutant deficient en ParS en <i>S. maltophilia</i>	103
4.3.6. Anàlisi fenotípic d'un mutant deficient en la bomba d'expulsió SmeGH en <i>S. maltophilia</i> .	107
5. DISCUSSIÓ GENERAL	113
6. CONCLUSIONS	123
7. BIBLIOGRAFIA	127
8. ANNEX.....	139



RESUM/ABSTRACT

RESUM

Stenotrophomonas maltophilia és un patògen oportunista de rellevància creixent a causa de la seva ascendent prevalença com a nosocomial. Tot i que es tracta d'un microorganisme ambiental amb una virulència limitada, *S. maltophilia* presenta resistència intrínseca a múltiples antibiòtics i pot produir múltiples infeccions, especialment en pacients immunocompromesos o amb fibrosi quística. Aquest treball de tesi s'engloba dins d'un projecte enfocat a la recerca i estudi de determinants de virulència i resistència a *S. maltophilia*, i el seu objectiu general és l'estudi de fenotips de resistència, en particular front colistina. La colistina és un antibiòtic polipeptídic que s'està utilitzant cada vegada més com a opció alternativa o "d'últim recurs" per tractar infeccions causades per organismes gramnegatius multiresistents.

La primera part del treball confirma l'heterogeneïtat fenotípica i genotípica de *S. maltophilia* en una col·lecció de 78 aïllats clínics europeus. Els genotips s'han determinat mitjançant l'estudi del perfil MLST i el gen *rpff*. També s'ha avaluat la susceptibilitat antimicrobiana, la formació de biofilms i la virulència. De manera general, no existeix associació entre les variables genotípiques i els fenotips de resistència i virulència avaluats, tot i que hi ha un grup genòmic, àmpliament distribuït geogràficament, que destaca per la seva capacitat de formar biofilm i la seva virulència. A més a més, s'ha demostrat que les soques amb variant *rpff-2* són més formadores de biofilm que les de la variant *rpff-1*. S'ha confirmat que els antibiòtics més eficaços contra *S. maltophilia* són el trimetoprim-sulfametoxazol i la minociclina, malgrat hi hagi un 68,8% de soques multiresistents (MDR) i detectar-se una gran heterogeneïtat en la resistència a la colistina dins de cada soca.

A la segona part, s'han estudiat les possibles causes de la resistència heterogènia a la colistina. Per tal d'avaluar la resistència adaptativa i l'heteroresistència, els aïllats van ser sotmesos a assajos Etest consecutius, a anàlisis de taxes de creixement i a assajos PAP (Perfil d'anàlisi poblacional). Els resultats han revelat que la majoria (78,7%) dels aïllats de *S. maltophilia* presenten una varietat de mecanismes de resistència poblacional diferents, incloent resistència adaptativa i heteroresistència. Curiosament, el desenvolupament de la subpoblació resistent ha estat reversible. Aquest fenotip complex de resistència a colistina, que hem anomenat "heteroresistència adaptativa", es presenta de manera diferent entre els aïllats i afecta significativament les proves recomanades de susceptibilitat a la colistina.

Finalment, a l'últim apartat d'aquest treball, s'han descrit els possibles determinants genètics que participen en els fenotips de resistència a la colistina. Específicament, s'han validat experimentalment els homòlegs cromosòmics dels gens *mcr* d'*E. coli* (*smlt2804* i *smlt3571*), i els que codifiquen per a la bomba d'expulsió SmeGH (*smlt3170-3171*) i un component del sistema regulador ParRS. Mitjançant mutants de la soca K279a, s'ha demostrat que *smlt3571* està directament implicat en la resistència a la colistina ja que la soca deficient per aquest gen és més susceptible. D'altra banda, *smlt2804* probablement té un paper important en la resistència adaptativa a colistina també mitjançant modificació del lipopolisacàrid (LPS). Així mateix, s'ha demostrat que ParRS contribueix a la resistència adaptativa a colistina però dependent de la concentració de Mg²⁺. La bomba d'expulsió SmeGH no s'ha associat a la resistència a la colistina,

però s'ha determinat que l'eliminació de SmeGH redueix la formació de biofilms induïda per antibiòtics.

Tenint present tot el que s'ha exposat en aquest treball, *S. maltophilia* té la capacitat d'adaptar-se i esdevenir més resistent a la colistina mitjançant una combinació de mecanismes reguladors que podrien provocar, en última instància, la modificació del LPS. Aquests mecanismes, a més a més, varien tant a nivell poblacional dins d'una mateixa soca com entre les diferents soques circulants. Per aquests motius, doncs, la colistina no hauria de ser considerada com una opció terapèutica rutinària contra aquest bacteri. Malgrat això, no s'ha de descartar com fàrmac d'últim recurs i, consegüentment, són necessaris més estudis sobre els mecanismes de resistència a aquest fàrmac, així com també, estudis per al disseny de noves estratègies antimicrobianes.

ABSTRACT

Stenotrophomonas maltophilia is an opportunistic pathogen of growing relevance due to its increasing prevalence in the nosocomial settings. Albeit an environmental microorganism with limited virulence, *S. maltophilia* shows intrinsic resistance to multiple antibiotics and can produce a broad spectrum of clinical infections, especially in immunocompromised patients or people with cystic fibrosis. This thesis is a part of a project dealing with the search and study of virulence and resistance determinants in *S. maltophilia*, and its main objective is to study resistance phenotypes, particularly to colistin. Colistin is a polypeptide antibiotic that is being used increasingly as alternative or “last-resort” option to treat infections by multiresistant Gram-negative bacteria.

In the first part of this work, the phenotypic and genotypic heterogeneity of *S. maltophilia* is confirmed in a collection of 78 European clinical isolates. Genotypes were determined by analyzing MLST profiles and sequences of the *rpfF* gene. Antimicrobial susceptibility, biofilm formation and virulence were also determined in all isolates. In general, no associations between genotypic and phenotypic variables were found, although there was a genomic group, widely distributed geographically, which stood out due to the ability to form biofilm and the virulence of its members. In addition, *rpfF-2* strains were more biofilm producer than *rpfF-1*. It was confirmed that the most effective antibiotics against *S. maltophilia* are trimethoprim-sulfamethoxazole and minocycline, despite most of isolates (68.8%) were considered MDR and to identify heterogeneous resistance phenotypes to colistin.

In the second part, we investigated that heterogeneous resistance to colistin. To evaluate adaptive resistance and heteroresistance, the isolates were subjected to serial Etest assays, growth rate analyses, and the population analysis profile test. Our studies revealed that most of our *S. maltophilia* isolates (78.7%) display different populational resistance mechanisms including adaptive resistance and heteroresistance. Interestingly, the development of the resistant subpopulation was reversible. This complex colistin-resistance phenotype, we have termed adaptive hetero-resistance, was displayed differently by the isolates and significantly affected to recommended colistin susceptibility testing.

Finally, in the last part of this work, possible genetic determinants for colistin resistance were described. Among them we validated two chromosomal homologs of the *E. coli* *mcr* genes (*smlt2804* and *smlt3571*), and those encoding for the SmeGH efflux pump (*smlt3170-3171*) and a component of the ParRS regulatory system. By site-specific mutagenesis in the K279a strain, we have shown that *smlt3571* is directly involved in colistin resistance since a strain defective in this enzyme is more susceptible to this antibiotic. On the other hand, *smlt2804* probably plays an important role in adaptive resistance to colistin also by modification of lipopolysaccharide (LPS). Moreover, we demonstrated that ParRS contributed to adaptive resistance to colistin, but in this case in response to the extracellular concentration of Mg²⁺. The SmeGH efflux pump was not associated to colistin resistance, but we demonstrated that deletion of the *smeGH* operon reduce antibiotic-induced biofilm formation.

Taking all together, we have shown that *S. maltophilia* has the ability to adapt and to become more resistant to colistin by a combination of regulatory mechanisms that could cause, ultimately, modifications in the LPS. Moreover, these mechanisms vary both at a population level within the same strain and between different circulating strains. For these reasons, colistin should not be considered as a routine therapeutic option against this bacterium. However, it should not be ruled out as a last-resort drug and, consequently, further studies about the mechanisms of colistin resistance are needed, as well as for the design of novel antimicrobial strategies.



ABREVIATURES I ACRÒNIMS

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

ABC	Família de bombes d'expulsió del tipus <i>ATP-binding cassette</i>
AK	Amikacina
ATCC	Col·lecció americana de cultius tipus (<i>American type culture collection</i>)
ATP	Trifosfat d'adenosina
BGN	Bacil gramnegatiu
BMD	Mètode per microdilució (<i>Broth microdilution method</i>)
BSA	Albúmina de sèrum boví (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CAMHB	Medi Muller-Hinton amb cations ajustats (<i>Cation-Adjusted Mueller-Hinton Broth</i>)
CAZ	Ceftazidima
CGC	Centre Genètic <i>Caenorhabditis</i> (<i>Caenorhabditis Genetics Center</i>)
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
Cm	Cloramfenicol
CMI	Concentració mínima inhibidora
CPS	Polisacàrid capsular
Cpx	Expressió del pilus conjugatiu (<i>conjugative pilus expression</i>)
CS	Colistina
CV	Cristall violeta
DNA	Àcid desoxiribonucleic (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DO	Densitat òptica
DSF	Molècula senyal (<i>Diffusible signal factor</i>)
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FQ	Fibrosi quística
GC	Guanina i Citosina
h	Hora
ISCR	Seqüències d'inserció CR (<i>Insertion sequence common region</i>)
L-Ara₄N	4-amino-4-desoxi-L-arabinosa
LB	Medi Luria-Bertani
LEV	Levofloxacina
LOS	Lipooligosacàrid
LPS	Lipopolisacàrid
LT₅₀	Temps letal 50 o mitjà (<i>Letal time 50</i>)
MCR	Resistència a colistina mòbil (<i>Mobile colistin resistance</i>)

MCS	Lloc de clonatge múltiple (<i>Multiple cloning site</i>)
MDR	Resistent a múltiples fàrmacs (<i>Multidrug Resistant</i>)
MFS	Família de bombes d'expulsió del tipus MFS (<i>Major facilitator superfamily</i>)
MHA	Medi Mueller-Hinton Agar
MHB	Medi de caldo Mueller-Hinton (<i>Mueller-Hinton Broth</i>)
Min	Minuts
MLST	Seqüenciació multilocular MLST (<i>MultiLocus Sequence Typing</i>)
MN	Minociclina
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ND	No determinat
NGM	Medi per al creixement de nematodes (<i>Nematode Growth Medium</i>)
pb	Parell de bases
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pEtN	Fosfoetanolamina
PAP	Perfil d'anàlisi poblacional (<i>population analysis profile</i>)
Rcs	Regulador de la síntesi de càpsula (<i>regulator of capsule synthesis</i>)
RND	Família de bombes d'expulsió del tipus RND (<i>Resistance nodulation cell division</i>)
rpf	Regulació de factors de patogenicitat (<i>Regulation of pathogenicity factors</i>)
rpm	Revolucions per minut
rRNA	Àcid ribonucleic ribosòmic (<i>Ribosomal ribonucleic acid</i>)
SMR	Família de bombes d'expulsió del tipus SMR (<i>Small multidrug resistance</i>)
SOB	Medi súper optimitzat (<i>Super Optimised Broth</i>)
sRNA	RNA no codificant petit
THG	Transferència horitzontal de gens
TMP / SMX	Trimetoprim-sulfametoxazol
TTC	Ticarcil·lina-clavulànic
UCI	Unitat de cures intensives
UFC	Unitat formadora de colònia
XDR	Extensament resistent a fàrmacs (<i>Extensively drug resistant</i>)
WT	Soca salvatge (<i>Wild Type</i>)



INTRODUCCIÓ

Investigar és veure allò que tothom ha vist i és pensar en allò que ningú més ha pensat.

Albert Szent-Györgyi (1893-1986)

1. INTRODUCCIÓ

1.1. *Stenotrophomonas maltophilia*: característiques generals

1.1.1. Taxonomia

Stenotrophomonas maltophilia és un bacteri gramnegatiu classificat, filogenèticament, dins de la classe dels gammaproteobacteris [1]. El gènere *Stenotrophomonas* és heterogeni tant genèticament com fenotípicament i, fins a la data, s'han descrit catorze espècies: *S. maltophilia*, *S. nitritireducens*, *S. rhizophila*, *S. acidaminiphila*, *S. korensis*, *S. chelatiphaga*, *S. terrae*, *S. humi*, *S. ginsengisoli*, *S. panacihumi*, *S. daejeonensis*, *S. pavanii*, *S. tumulicola* i *S. bentonitica* [2].

El gènere *Stenotrophomonas* prové etimològicament del grec: *stenos* que significa estret, escàs; *trophus*, que significa qui menja; i *monas*, que significa unitat. Se li va atorgar aquest nom fent referència a la poca varietat de compostos que els bacteris d'aquest gènere són capaços de metabolitzar en la naturalesa. El primer bacteri classificat dins d'aquest gènere va ser *S. maltophilia* (*malt*, de l'anglès antic: maltosa; i *philia*, del grec, que vol dir amistat).

La primera *S. maltophilia* aïllada va ser a l'any 1943 sota el nom de *Bacterium bookeri*. No obstant això, l'any 1958, Hugh i Ryschenkow [3] van aïllar una soca procedent d'un pacient amb un carcinoma oral, la qual es va considerar com una soca tipus (ATCC 13637) i la van anomenar *Pseudomonas maltophilia*. Anys més tard, anàlisis del rRNA van determinar que era més apropiat anomenar-la *Xanthomonas maltophilia* [4], [5]. Finalment, la insatisfacció amb la classificació d'aquest organisme, després de diferents estudis fenotípics i genotípics, va donar lloc a la proposta de crear un gènere nou, *Stenotrophomonas*, i el bacteri va passar a anomenar-se amb el nom actual de *Stenotrophomonas maltophilia* [4], [6].

1.1.2. Microbiologia i habitat

S. maltophilia és un bacteri gramnegatiu no fermentador, aerobi obligat, allargat i amb dos flagels polars, capaç de sobreviure en ambients pobres en nutrients [7]. Es tracta d'un microorganisme mesòfil capaç de créixer entre 5 i 40°C, essent 35°C la seva temperatura òptima de creixement. És catalasa positiu, oxidasa negatiu, tot i que s'han descrit algunes soques oxidasa positiu [8], i requereix metionina per al seu creixement [6], [7]. Posseeix una gran versatilitat metabòlica [1] i, malgrat ser un aerobi obligat, algunes soques poden créixer sense oxigen, amb nitrogen com a acceptor terminal de la cadena d'electrons [9].

S. maltophilia es troba en una àmplia varietat d'ambients i regions geogràfiques, fins i tot a l'Antàrtida [10], i ocupa nínxols ecològics, tant dins com fora dels hospitals. Ha estat aïllat en un gran nombre de fonts d'aigua incloent rius, pous, llacs, aigües minerals i aigües residuals. També s'ha recuperat a partir d'una gran varietat de sòls i en la rizosfera de diverses plantes, com ara blat, blat de moro, civada, cogombre, patata, remolatxa, canya de sucre, entre altres.[6], [7], [11]. El principal nínxol ecològic de *S. maltophilia* és la rizosfera i, durant els darrers anys, aquesta regió estreta del sòl s'ha considerat com a un important reservori de

patògens humans oportunistes [12]. Gràcies a la seva diversitat metabòlica i ràpida adaptació, aquest microorganisme també s'ha aïllat en animals (peixos, serps, cabres, cocodrils) i invertebrats [11]. A més a més, com a conseqüència de la seva capacitat de formació de biofilms en superfícies abiòtiques, cada vegada més aquest bacteri s'aïlla en material mèdic, com ara catèters, tubs de succió, endoscòpis, tubs d'aspiració dentals i nebulitzadors [13], [14].

Habitualment, *S. maltophilia* és un microorganisme dominant en la comunitat [1], fet que permet que desenvolupi diferents rols en l'ecosistema. S'ha utilitzat en bioremediació, fitoremediació [15], biocotrol en plantes [16] i també juga un paper important en els cicles del nitrogen i del sofre [1]. No obstant això, l'interès creixent d'aquest microorganisme és el seu paper com a patògen nosocomial extremadament resistent als antibiòtics, aïllat en diverses malalties i que, malgrat no ser altament virulent, és capaç de causar infeccions humanes severes [7], [17].

1.1.3. Genoma

La primera soca de *S. maltophilia* en tenir tot el genoma seqüenciat va ser l'aïllat clínic anomenat k279a, aïllada d'una infecció del torrent sanguini d'un pacient amb fibrosi quística que va ser sotmès a quimioteràpia [9]. L'estudi del contingut genòmic d'aquesta soca va posar en manifest l'àmplia gamma de gens de resistència a antibiòtics, incloent, les bombes d'expulsió. Mesos després, es va obtenir el genoma complet de la soca endòfit R551-3, aïllada de *Populus trichocarpa* amb l'objectiu de comparar seqüències genòmiques d'altres endòfits per tal d'iniciar el desxiframent de mecanismes subjacents al creixement de les plantes [18].

Des de la seqüenciació completa d'aquests dos genomes, en la data en la qual s'ha escrit aquesta tesi hi ha un total de 355 genomes ensamblats dipositats al NCBI (National Center of Biotechnology Information, USA).

A grans trets, el genoma de *S. maltophilia* consta d'un gran cromosoma de doble cadena de DNA circular que conté entre 4500000 i 5000000 parells de bases. Generalment, els seus genomes presenten un contingut de GC del 66,7% [9].

Gràcies a l'anàlisi de genòmica funcional, s'han descrit factors de virulència potencials relacionats amb la patogenicitat d'aquest bacteri [7] i s'ha arribat a la conclusió que *S. maltophilia* té una alta heterogeneïtat genètica com a conseqüència de la transferència horitzontal de gens (THG) entre bacteris presents en el seu nínxol natural o patògens nosocomials similars [19].

1.2. Importància clínica de *Stenotrophomonas maltophilia*

Tot i que *S. maltophilia* és un agent poc comú en malalties bacterianes d'humans, recentment és considerat com un patògen oportunista important a tenir en compte com a conseqüència de la seva incidència creixent i la seva dificultat en el tractament. *S. maltophilia* té un fenotip multiresistent que complica l'eradicació de la infecció i el converteix en un organisme anomenat MDRO (de l'anglès, *multiple-drug-resistant organism*) [7]. L'Organització Mundial de la Salut

(OMS) enumera *S. maltophilia* com un dels principals patògens resistents als antibiòtics en hospitals d'arreu del món [20].

1.2.1. Incidència

Hi ha poques dades abans de 1970 pel que fa a la prevalença o característiques clíniques de *S. maltophilia* a causa de la seva raresa i relativa insignificança clínica. No va ser fins a la dècada de 1980 que *S. maltophilia* es va començar a reportar com a patògen nosocomial emergent i fins a finals de 1990 no van sorgir els primers estudis sobre la seva patogenicitat [21].

Mitjançant la comparació de les dades recollides en diferents estudis, es pot estimar que la prevalença en general de *S. maltophilia* va incrementant al llarg del temps. Està reportat que la prevalença d'infeccions d'aquest bacteri en la població general s'ha incrementat de 0,8-1,4% durant els anys 1997-2003 a 1,3-1,68% durant els anys 2007 i 2012 [21].

Si ens centrem en els aïllats clínics, *S. maltophilia* és el tercer bacil gramnegatiu no fermentador més comú responsable d'infeccions que afecten a la salut, per darrera de *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter* spp. [22] i és un dels nou organismes més comuns trobat en mostres de teixits respiratoris extrems de les unitats de cures intensives (UCI) de pacients europeus [23, 24]. La incidència actual d'aquest microorganisme en pacients hospitalaris és de 1-4‰ [24], depenent del grau i severitat d'immunodepressió i de les condicions mèdiques subjacents de la població estudiada. En els darrers 10 anys, en general, aquestes xifres han augmentat, reportant un increment del 30% [11]. Així doncs, per exemple, el centre de càncer MD Anderson (Houston, EEUU) va reportar un increment considerable d'aquest bacteri entre 1986 i 2002, fet que va comportar que passés del novè al cinquè lloc en el rànquing de microorganismes gramnegatius aïllats al centre [25].

Els possibles factors que contribueixen a l'increment de la incidència de *S. maltophilia* són: l'expansió de les poblacions en riscs, l'ús generalitzat de la quimioteràpia intensiva, l'ús prolongat de catèters venosos centrals i la pressió de selecció que ofereix l'ús d'antibiòtics d'ampli espectre [26].

1.2.2. Manifestacions clíniques i factors de risc de mortalitat

S. maltophilia s'associa en una gran varietat de síndromes clínics. Es presenta més freqüentment en infeccions de les vies respiratòries, seguit de les infeccions de la sang i, en rares ocasions, en infeccions de la pell i teixits tous i en infeccions urinàries [21].

El 40% dels aïllats clínics provenen d'infeccions respiratòries, probablement perquè el seu hàbitat natural està associat a ambients aquosos [7]. La prevalença d'infeccions del sistema respiratori per *S. maltophilia* és, generalment, més alta que la d'altres infeccions causades per aquest patògen, però varia àmpliament entre països i continents, reportant valors entre el 1,6 i el 6,3% durant el període 1997-2002 [21]. Durant els darrers 15 anys, *S. maltophilia* ha passat de ser la vuitena a la sisena causa més comuna de les infeccions respiratòries, fet que suggereix una freqüència creixent de l'aparició d'aquest patògen en infeccions de les vies respiratòries [27]. Les infeccions del tracte respiratori solen cursar amb pneumònia, febres, dispnees i tos.

Aproximadament l'1% de totes les bacterièmies nosocomials són causades per *S. maltophilia* [1]. La bacterièmia causada per aquest patògen sovint s'associa per la presència de catèters intravenosos, millorant el pronòstic amb la retirada d'aquests dispositius [28]–[30].

S. maltophilia s'aïlla en menys freqüència en pacients amb infeccions del tracte urinari, infeccions de l'aparell reproductor i en infeccions de la pell, reportant les majors taxes d'aïllament en països de l'Àfrica i Àsia [21].

Així doncs, els pacients de risc a ser colonitzats i infectats per un microorganisme nosocomial oportunista com *S. maltophilia* podrien ser els pacients de la UCI que requereixen amb freqüència intubació i ventilació mecànica [31], pacients amb càncer hematològic, com ara, leucèmia o limfoma [32], pacients en etapa terminal de malalties renals que reben diàlisi peritoneal i hemodiàlisi de manteniment [33], pacients amb cremades importants [34], però, principalment, pacients que tenen problemes d'infeccions en el tracte respiratori, com ara, la fibrosi quística.

Aproximadament el 10-15% dels pacients amb fibrosi quística (FQ) són colonitzats amb *S. maltophilia* [35], [36]. La fibrosi quística és una malaltia hereditària freqüent que causa la formació i acumulació d'un moc espès que afecta, fonamentalment, pulmons, intestins, pàncrees i fetge, provocant discapacitat progressiva i mort prematura. Aquest defecte predispesa al pacient amb FQ a la colonització microbiana i a desenvolupar infeccions que tendeixen a convertir-se en cròniques [37]. Estudis retrospectius recents han mostrat que hi ha una reducció en la prevalença de *P. aeruginosa* i *Burkholderia cepacia*, però, en canvi, hi ha un augment de patògens emergents, com ara *S. maltophilia* [38]. No obstant això, les infeccions polimicrobianes són comunes, especialment amb *P. aeruginosa* com a co-patògen. Cal tenir en compte que s'han aïllat formes variants de colònies petites de *S. maltophilia* provinents dels esputos dels pacients amb FQ. Aquests colònies tenen un creixement més lent i una major resistència als antibiòtics permetent persistència en les vies respiratòries [39].

Tot i que és, predominantment, un patògen que causa infeccions en pacients hospitalitzats i immunodeprimits, cada vegada hi ha més estudis que reporten infeccions de *S. maltophilia* adquirides en la comunitat, és a dir, infeccions adquirides per un pacient que no ha estat recentment en una institució d'atenció de la salut o en contacte amb persones que hi hagin estat [26], [40], [41].

La mortalitat atribuïble a la infecció per *S. maltophilia* s'ha estimat entre el 26,7 i el 37,5% [11], elevant a 69% en pacients amb bacterièmia i a 77% en pacients amb càncer i bacterièmia concomitant [17]. Cal tenir en compte que el risc de mortalitat és més alt entre els pacients que, inicialment, han rebut un tractament antimicrobià inadequat [42].

1.2.3. Estratègies per al tractament terapèutic

Les recomanacions actuals per tractar les infeccions causades per *S. maltophilia* estan basades en l'evidència històrica, els informes de casos clínics i els estudis de la susceptibilitat *in vitro* als agents antimicrobians. A la Taula 1 s'exposa un resum de les opcions de tractament.

Taula 1. Opcions per al tractament d'infeccions causades per *S. maltophilia*.

Antibiòtic	Susceptibilitat <i>in vitro</i> (%) ^a	Detalls	Referències
TMP/SMX	34,4 - >90	Bacteriostàtic. Es recomanen dosis altes. La teràpia pot ser limitada per efectes secundaris (reaccions cutànies, etc.). Poden aparèixer resistències durant el tractament.	[11], [43]–[46]
Ticarcil·lina-clavulànic	11,5 - > 70	Bacteriostàtic. S'ha registrat aparició de resistents. L'azetronam-àcid clavulànic (2:1 o 1:1) també demostra activitat <i>in vitro</i> . Altres combinacions com ara ticarcil·lina-sulbactam, piperacil·lina-tazobactam i ampicil·lina-sulbactam no tenen bona activitat.	[11], [22], [45]–[48]
Cefalosporines de quarta generació (ceftazidima)	<53	Mostra alguna activitat <i>in vitro</i> , però les taxes de resistència són altes a causa de la inducció de la producció de β -lactamasa i la baixa activitat β -lactama. Amb combinació amb inhibidors de β -lactamasa no presenta activitat <i>in vitro</i> . EUCAST ^b informa que <i>S. maltophilia</i> pot ser intrínsecament resistent a ceftazidima. L'èxit clínic s'ha reportat quan la ceftazidima s'utilitza amb combinació amb altres antibiòtics.	[11], [45], [46]
Fluoroquinolones (clinafloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina, sitafloxacina, trovafloxacina)	45 - 95	Bactericida. Més actives <i>in vitro</i> que les tradicionals. Ràpida emergència de resistents durant el tractament, especialment si s'administren com monoteràpia.	[11], [46], [49], [50]
Cloramfenicol	11,5 - 81,4	L'experiència clínica és molt limitada com a conseqüència de la seva potencial mielotoxicitat. Mostra alguna activitat <i>in vitro</i> contra <i>S. maltophilia</i> , tot i que hi ha diferències considerables en els perfils de sensibilitat.	[11], [46], [47]
Derivats de la tetraciclina (minociclina, tigeciclina)	66,7 - 100	Limitada experiència clínica. La tigeciclina pot superar els mecanismes de resistència a tetraciclines habituals i s'ha torbat que és actiu enfront de les soques TMP/SMX resistents.	[11], [44], [46], [48], [50]
Colistina, polimixina B	37,5 - 79	Activitat variable segons el mètode utilitzat. S'aplica com a última opció de tractament, sobretot, en aerosol i/o amb combinació amb altres fàrmacs.	[11], [46], [47], [51]–[55]

^aPercentatge estimat de soques capaces de ser tractades amb èxit a les dosis d'antibiòtic habituals.

^bEuropean Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

El trimetoprim/sulfametoxazol (TMP/SMX) es considera l'agent antimicrobià més eficaç contra *S. maltophilia*, amb una taxa de susceptibilitat global superior al 90% [24], [56]. Sader i Jones [22], estudiant 2.076 soques com a part del programa de Vigilància Antimicrobiana mundial SENTRY, reporten que *S. maltophilia* presenta una taxa de resistència del 4,7%. No obstant això, aquesta taxa de resistència de la combinació de fàrmacs TMP/SMX va augmentant [24].

En general, els antibiòtic β -lactàmics mostren baixa activitat contra *S. maltophilia* com a conseqüència dels mecanismes de resistència desenvolupats front a aquest tipus d'antibiòtics. Tot i així, els inhibidors de β -lactamasa, com l'àcid clavulànic, poden augmentar la susceptibilitat de *S. maltophilia* a aquests agents [57]. Així doncs, la combinació ticarcil·lina-àcid clavulànic és la segona opció terapèutica, principalment en pacients que experimenten efectes adversos al tractament amb TMP/SMX [6], [24]. Diversos estudis indiquen que aquesta combinació presenta una eficàcia superior al 70% *in vitro* [45], [48], [58]–[60], malgrat que Sader i Jones [22] mostren que *S. maltophilia* presenta una taxa de resistència del 54,7%. Valors similars han estat reportats per diversos estudis [47], [61].

Les fluoroquinolones s'utilitzen freqüentment per a tractar infeccions causades per *S. maltophilia* [24]. No obstant això, el seu ús excessiu ha comportat l'increment de les taxes de resistència [40], [62]. Les fluoroquinolones com clinafloxacina, levofloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina i sitafloxacina mostren una activitat *in vitro* superior respecte a les quinolones anteriors [24], reportant valors de susceptibilitat superior al 95% [50]. Com a conseqüència de l'increment de les taxes de resistència, recentment s'han desenvolupat diverses noves quinolones i algunes d'elles, com ara la nemonoxacina i la delafloxacina, s'ha provat la seva aplicació clínica [63], [64]. Tanmateix, més estudis *in vivo* són necessaris per a comprendre millor l'eficàcia d'aquestes noves quinolones en el tractament de les infeccions causades per *S. maltophilia* [21].

Les tetraciclines com ara la tigeciclina, minociclina i doxiciclina són alguns dels agents antimicrobians més actius contra *S. maltophilia* [65], [66]. En una gran col·lecció recent d'organismes resistents aïllats a partir del programa SENTRY durant 2007-2011, on hi havia 1706 *S. maltophilia*, la minociclina demostra ser significativament més activa que les altres tetraciclines contra *S. maltophilia* [21], on la taxa de susceptibilitat és superior al 97% en totes les regions geogràfiques i dues vegades més potent que doxiciclina [67]. No obstant això, l'experiència clínica amb aquest fàrmac encara és escassa [68].

Com a conseqüència de la impressionant gamma de mecanismes de resistència als antimicrobians desenvolupats per *S. maltophilia*, s'han estudiat diverses combinacions de fàrmacs amb la finalitat de superar aquestes resistències o per assolir sinergismes.

Combinacions de dos o tres agents amb bons resultats de susceptibilitat, com ara, TMP/SMX, ceftazidima, ticarcil·lina/clavulanat i/o aminoglicòsids, han demostrat efectes sinèrgics a diferents graus en estudis previs [21]. En estudis més recents, combinacions de TMP/SMX o inhibidors de β -lactàmics / β -lactàmics amb antibiòtics nous o antics com ara tigeciclina, fluoroquinolones, televancina [69], rifampicina [70] i la colistina en aerosols han mostrat diversos graus de sinergisme i la capacitat de mantenir l'efectivitat en biofilms [21].

1.3. El resistoma en *S. maltophilia*

La definició clínica de la resistència als antibiòtics es basa principalment en la resposta bacteriana al tractament. D'aquesta manera, doncs, un microorganisme es considera resistent si hi ha una alta probabilitat de fracàs terapèutic en el tractament antibiòtic [71]. Tots els bacteris tenen un conjunt d'elements que contribueixen directa o indirectament a la resistència als antibiòtics, sorgint el concepte de *resistoma*. Alguns d'aquests elements del resistoma són elements de resistència clàssics, com ara la modificació de la permeabilitat de la membrana, la modificació del lloc diana o la inactivació de l'antibiòtic per acció d'enzims, però el resistoma també inclou tots aquells gens implicats en rutes metabòliques o de manteniment i reguladors (Figura 1).

L'adquisició d'un fenotip que provoqui un augment en la resistència a antibiòtics implica un canvi genètic, ja sigui per mutació o com a conseqüència de la transferència horitzontal de gens, esdevenint, doncs, una resistència adquirida (Figura 1). Es parla de resistència adquirida quan un microorganisme determinat adquireix la capacitat de resistir a l'activitat d'un agent antimicrobià concret del qual anteriorment n'era sensible.

Un tipus de resistència adquirida de gran rellevància en la clínica i també en aquest treball és el desenvolupament d'heteroresistència. L'heteroresistència es defineix com l'existència d'una subpoblació de microorganismes resistents dins d'una població bacteriana sensible a un determinat antimicrobià. No existeix un mètode estandarditzat per a la detecció d'heteroresistència en el laboratori i hi ha molt poca informació sobre les variables tècniques que influeixen en la seva detecció. S'han utilitzat tant mètodes complexos i laboriosos (com l'anàlisi del perfil de la població, *population analysis profile*, PAP) com mètodes de fàcil realització com l'observació de colònies en els halus d'inhibició en discs o en les tires Etest [72].

Cal tenir present que, a part del genotip innat dels bacteris, la insensibilitat intrínseca als antibiòtics també pot ser a través de canvis en la fisiologia del bacteri com a resposta a canvis ambientals (Figura 1). Aquest tipus de resistència no heretable, coneguda amb el nom de resistència fenotípica, engloba diferents processos com ara la formació de biofilm, la inactivitat metabòlica o el desenvolupament de diferents motilitats els quals es detallaran més endavant [73].

L'estudi del resistoma és de gran rellevància per tal de preveure l'evolució de la resistència, per comprendre la relació entre la resistència i la virulència, la relació entre bacteris o el metabolisme i, per definir noves dianes per al tractament [71].

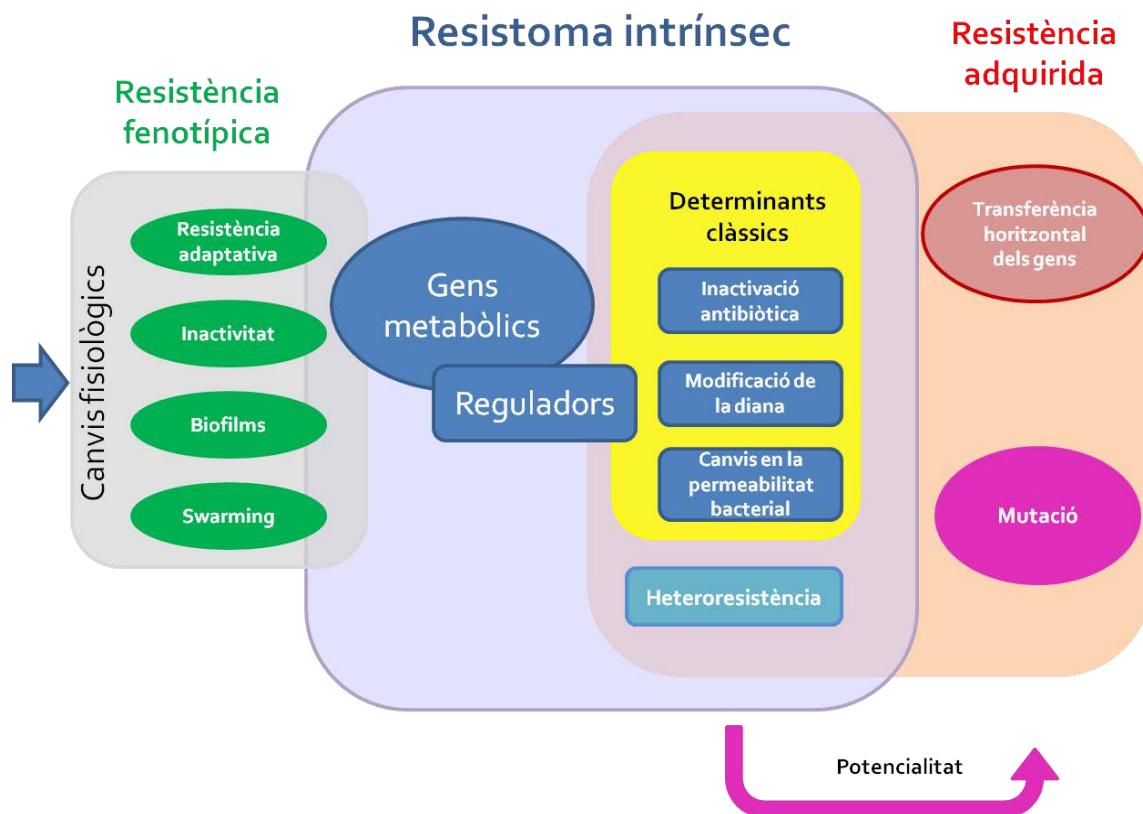


Figura 1. Resistoma intrínsec. El resistoma és un conjunt complex de gens les funcions dels quals actuen directa o indirectament per bloquejar l'activitat dels antibiòtics. Figura adaptada de Olivares *et al.* [71].

1.3.1. Resistoma intrínsec: Resistència intrínseca

El resistoma intrínsec és el conjunt d'elements que contribueixen directament o indirectament a la resistència als antibiòtics, i, la presència és independent de l'exposició prèvia als antibiòtics i no és com a conseqüència de la THG recent.

L'estudi del resistoma intrínsec podria proporcionar noves dianes a antibiòtics i ajudar a predir esdeveniments durant el tractament. Fins a la data, s'ha estudiat exhaustivament el resistoma intrínsec de *P. aeruginosa* i *Escherichia coli* [71], [74], fet que ha comportat la identificació de diversos gens que afecten a la susceptibilitat a antibiòtics en bacils gramnegatius (BGN).

En general, les tres causes més rellevants que confereixen resistència intrínseca en BGN són la pèrdua de la diana, la modificació de la permeabilitat de la membrana i l'activitat de les bombes d'expulsió [71].

Alguns dels mecanismes específics de resistència en *S. maltophilia* seran presentats més endavant; no obstant això, a continuació ens centrarem en el lipopolisacàrid (LPS) com a conseqüència de la seva importància en aquest treball.

1.3.1.1. Lipopolisacàrid

El LPS és una molècula glucolípidica que sovint es relaciona amb l'adhesió dels bacteris, la virulència i la resistència a antibiòtics [71]. El LPS és indispensable per a la supervivència dels bacteris gramnegatius ja que juga un paper fonamental en el manteniment i organització de la membrana externa. La membrana externa dels bacteris gramnegatius és una bicapa lipídica asimètrica, la cara interna de la qual està formada pels fosfolípids i, en canvi, la cara externa està constituïda principalment per LPS [75] (Figura 2).

S. maltophilia presenta una estructura típica del LPS, la qual consta d'una porció polisacàridica (polar) unida covalentment a una porció lipídica (apolar), denominada lípid A. La part polisacàridica consta de dues regions: una fracció més interna i conservada coneguda com el nucli del LPS o *core* (un oligosacàrid) i fracció més externa i variable denominada cadena lateral O o antigen O per les seves propietats immunogèniques (un polímer d'oligosacàrids).

El lípid A és el responsable de les propietats endotòxiques del LPS, fet que provoca que també sigui conegut com a endotoxina. És la part més interna de la molècula, funciona com a àncora del LPS a la membrana externa i correspon a un disacàrid de glucosamina unit per un enllaç β -1'-6, esterificat en quatre posicions amb àcids grassos saturats i fosforilat en els extrems 1' i 4' [76], [77] (Figura 2).

La biosíntesi del LPS és altament complexa i requereix d'una sèrie de passos individuals coordinats entre si que inclou: la síntesi en el citoplasma dels diversos precursors activats (la formació de les unitats polisacàridiques bàsiques, la polimerització de les unitats de repetició i la formació de cada un dels dominis que componen el LPS), la translocació a través de la membrana citoplasmàtica, el transport i integració en la membrana externa de les molècules sintetitzades i la regulació de tots els passos individuals i del procés complet [75].

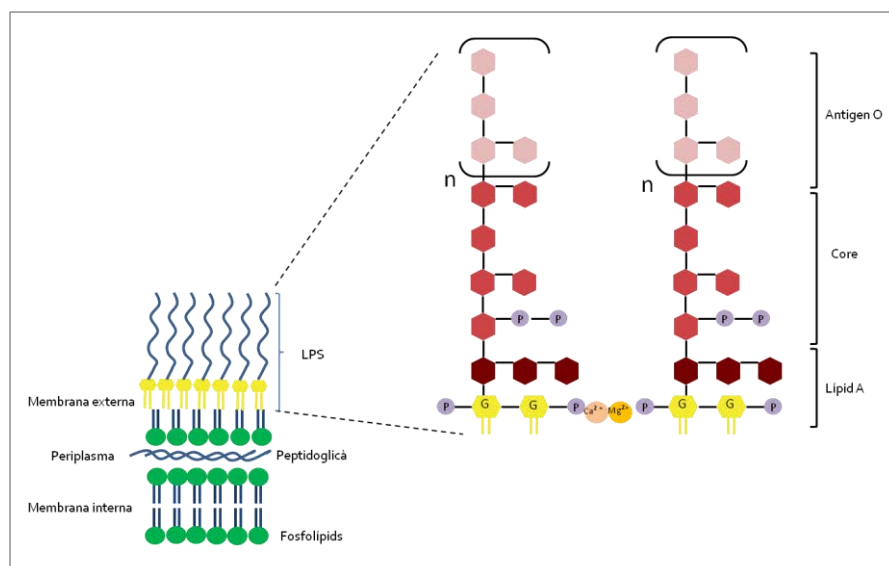


Figura 2. Estructura de la membrana externa. El LPS constitueix la cara externa, conformat per l'antigen O, el nucli *core* i el lípid A; la cara interna és de naturalesa fosfolipídica. El lípid A és un disacàrid de glucosamina unit per un enllaç β -1'-6, esterificat en quatre posicions amb àcids grassos i fosforilat en els extrems 1' i 4'. En relació als fosfoèsters del lípid A, els cations divalents Ca^{2+} i Mg^{2+} uneixen i estableixen les molècules de LPS. LPS: lipopolisacàrid, G: glucosamina; P: fosfat; Ca^{2+} : ió calci; Mg^{2+} : ió magnesi.

Quan el LPS està sense càrrega o carregat positivament influeix augmentant l'adhesió cel·lular. A més a més, les alteracions en l'estructura del LPS solen ser responsables de l'augment en la susceptibilitat a antibiòtics, protegint la cèl·lula d'antibiòtics hidrofòbics i de compostos policatiònics, com ara les polimixines, gentamicina, àcid nalidíxic i vancomicina [78]. La temperatura pot alterar el contingut en fosfat o la mida del O-polisacàrid, generant que els bacteris siguin més resistents als antibiòtics a 30 que a 37°C [16], [57]. També s'ha demostrat que alteracions en l'estructura del LPS redueix la formació de biofilm en *S. maltophilia* [80].

1.3.2. Resistoma intrínsec: Resistència fenotípica

Un tipus de resistència intrínseca de gran rellevància és la resistència fenotípica o altrament anomenada, persistència [81]. La resistència fenotípica es defineix com una situació transitòria en la qual una població bacteriana, generalment susceptible a antibiòtics, esdevé resistent de forma eventual [71], [73], tractant-se, doncs, d'una situació no heretable de la resistència als antibiòtics [82]. Per tant, aquest fenotip de resistència es manifesta sense cap canvi genètic.

Els elements que contribueixen a aquest fenotip, com ara la formació de biofilms, la motilitat *swarming*, el desenvolupament d'inactivitat de les cèl·lules o la resistència adaptativa, formen part del resistoma intrínsec i es veuen influenciats pels canvis ambientals [71], [74]. Aquests factors responsables de la resistència fenotípica poden ser bons objectius per a nous tractaments. No obstant això, el coneixement dels gens responsables d'aquest tipus de resistència segueix sent limitat.

1.3.2.1. Formació de biofilms

La capacitat de sobreviure en biofilms i respondre als factors d'estrès ambiental fa que *S. maltophilia* sigui un patogen persistent i adaptable. Els biofilms estan formats per una comunitat de cèl·lules adherida a una superfície i protegida per una matriu extracel·lular composta de polisacàrids i proteïnes [83]. *S. maltophilia* és capaç de colonitzar i formar biofilms en cèl·lules epitelials del pulmó [37], o en diferents tipus de superfícies abiòtiques així com implants mèdics, catèters i instrumental mèdic [80], [84], [85]. La producció de biofilms s'associa amb la resistència a factors ambientals, la resistència a l'activitat fagocítica i altres factors immunes de l'hoste, al blindatge de l'activitat antimicrobiana i a una major difusió al llarg de superfícies a través de la motilitat bacteriana [37], [86], [87]. La formació de biofilms no és un mecanisme específic de resistència, però sí incrementa la resistència en general als antimicrobians, que no aconsegueixen eradicar els biofilms [88]. La reducció en la susceptibilitat als antibiòtics que ofereix els biofilms es deu, en primer lloc, a la dificultat de l'antibiòtic per entrar en contacte amb els bacteris i, a més a més, pels bacteris que tenen un estat metabòlic diferent entre les diferents capes que formen el biofilm i respecte a la dels seus homòlegs que no formen biofilm (com a conseqüència de les diferències en la disponibilitat de nutrients i oxigen, etc.) [74].

La producció de biofilms és causada per la interacció de múltiples factors de virulència com ara els flagels [89], [90], fímbries, pili, adhesina afimbrial [9], [88] i el lipopolisacàrid de la membrana externa [1], [9], [91]. Més concretament, en primer lloc, es produeix la unió de les cèl·lules a una superfície sòlida gràcies a l'acció dels flagels altament immunogènics i pilis.

Després de l'adhesió, les cèl·lules formen una monocapa a la superfície amb l'ajuda de les fimbries i els pilis, sobretot del tipus IV, relacionats amb l'autoagregació i la motilitat del tipus *twitching* [92]. Posteriorment, es formen petits grups de cèl·lules anomenades microcolònies. La diferenciació d'aquestes microcolònies donarà lloc a la complexa arquitectura del biofilm madur i a la producció de la matriu d'exopolisacàrid que cimentarà tot el conjunt [83], [93] (Figura 3).

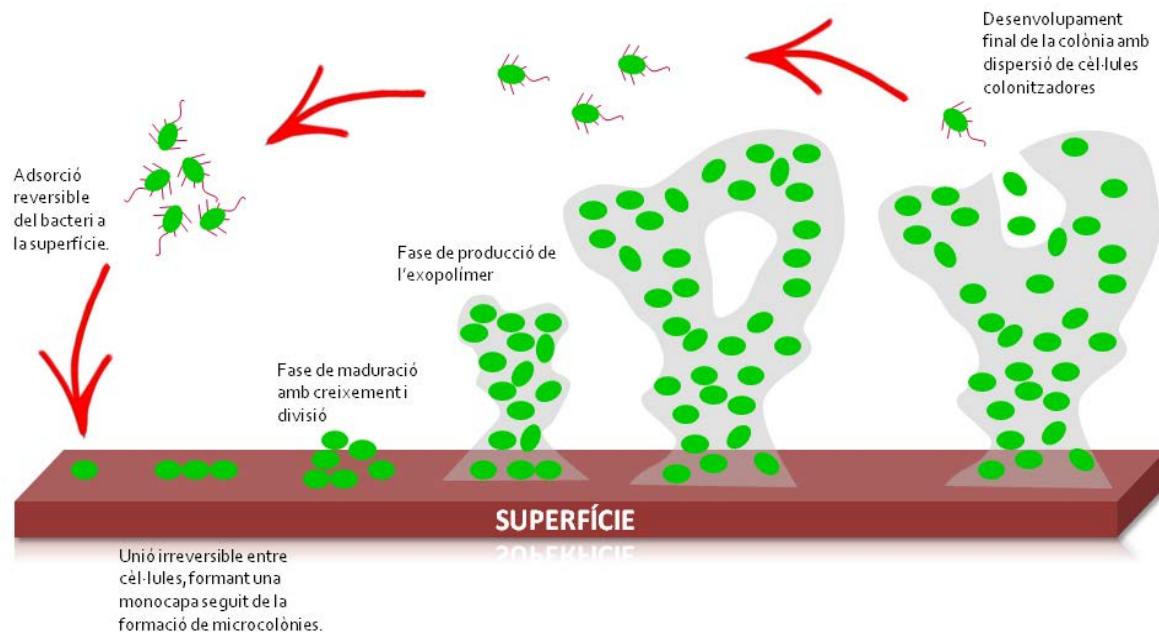


Figura 3. Diagrama de la formació de biofilm especificant les diferents fases. Les fases són: 1. Adsorció reversible del bacteri a la superfície, 2. Unió irreversible entre cèl·lules, formant una monocapa seguida de la formació de microcolònies, 3. Fase de maduració amb creixement i divisió, 4. Fase de producció de l'exopolímer i, finalment, 5. Desenvolupament final de la colònia amb dispersió de cèl·lules colonitzadores.

En *S. maltophilia* s'han estudiat diferents factors que intervenen en la formació de biofilms. Per exemple, s'ha vist que la supressió dels diferents gens relacionats amb la regulació i l'estructura dels flagels i relacionats amb la síntesi d'exopolisacàrids afecta a la formació de biofilm [80], [94]. No obstant això, altres components relacionats amb la formació de biofilms, com ara el DNA extracel·lular, s'han analitzat en microorganismes com *P. aeruginosa* i *Salmonella enterica* [95], [96], però la literatura no conté cap informació per a *S. maltophilia*.

1.3.2.2. *Quorum sensing*

El *quorum sensing* (QS) és un mecanisme de comunicació que, mitjançant senyals extracel·lulars, regula l'expressió dels gens en funció de la densitat cel·lular. Aquest mecanisme té lloc gràcies a l'alliberació de molècules senyal anomenades autoinductores (AI), denominades així perquè poden actuar sobre la mateixa cèl·lula que les allibera, capaces de desencadenar l'expressió genètica en tota la població, provocant una resposta global. La concentració de la AI serà determinant per a l'inici del QS, ja que com major sigui la densitat poblacional, major serà la concentració de AI en el medi extern estimulants l'expressió de gens [97].

El QS controla la resistència a antibiòtics, l'agregació i formació de biofilm, la virulència en models de nematodes i la motilitat com el *twitching*, el *swimming* i el *swarming* [9]. Existeixen

diversos sistemes de QS ja que cada sistema s'ha adaptat i optimitzat en funció del nínxol ecològic on viu cada espècie bacteriana, de manera que, els tipus de senyals extracel·lulars, receptors, mecanismes de transducció de senyals i la regulació dels gens diana són característics i específics de cada espècie [98].

Fins a la data, l'únic sistema QS descrit en *S. maltophilia* és el sistema mediat per la molècula DSF (Diffusible signal factor), el qual presenta el cluster *rpfBFCG* genèticament molt relacionat al descrit a *Xanthomonas campestris pv. campestris* [99], [100]. El gen *rpfF* forma part del *rpf* (*regulation of pathogenicity factors*) i els seus mutants tenen menor mobilitat del tipus *swimming*, menor producció de proteasa extracel·lular, tenen alterada l'estructura del LPS i tenen menor tolerància als antibiòtics i metalls pesants [99]. Recentment, s'ha descrit l'existència de dues variants del gen *rpfF*: la variant *rpfF-1* i la variant *rpfF-2* [101].

1.3.2.3. Dormència o inactivitat

Els bacteris que mostren una baixa susceptibilitat als antibiòtics, però que són genèticament idèntics a la soca susceptible, poden arribar a ser persistents o adquirir un estat d'inactivitat o dormència. Les cèl·lules persistents són una subpoblació de bacteris metabòlicament inactiva, per la qual cosa, són altament tolerants als antibiòtics tradicionals que són eficaços contra cèl·lules amb un creixement actiu. El percentatge de cèl·lules persistents en un cultiu pot arribar a ser un 1% de les cèl·lules en fase estacionària per diversos microorganismes [102] i l'establiment d'una subpoblació persistent no requereix l'exposició prèvia a l'antibiòtic.

S'han identificat diferents gens implicats en la persistència en *E. coli*, com el cas dels gens que codifiquen per als sistemes de toxina / antitoxina i el regulador *phoU* [71]. No obstant això, tot i que hi ha fenòmens de persistència descrits en *S. maltophilia* [7], els mecanismes responsables d'aquest fenotip segueixen essent desconeguts.

1.3.2.4. Resistència adaptativa

La resistència adaptativa és una classe específica de resistència no mutacional que es caracteritza per la seva naturalesa transitòria [103]. Hi ha molts senyals ambientals que poden contribuir a l'adquisició temporal de resistència a un antibiòtic, com ara la concentració d'ions, la temperatura o l'exposició a dosis no letals de l'antibiòtic. Així doncs, la resistència adaptativa es podria definir com un fenomen pel qual l'exposició d'un organisme a nivells subinhibitoris d'un antibiòtic li confereix resistència transitòria a les dosis letals d'exposició [104].

Aquest tipus de resistència té una gran rellevància clínica ja que es pot desenvolupar durant els tractaments d'exposició repetida i prolongada d'antimicrobians, i que podria explicar com soques, aparentment sensibles, no es poden eradicar fàcilment en la clínica amb teràpia antimicrobiana.

La resistència adaptativa s'ha estudiat en una gran varietat de bacteris, tant gramnegatius com grampositius, com *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *E. coli* [105]–[107].

1.3.2.5. Regulació o modificació post-transcripcional i post-traducciona

La regulació o modificació post-transcripcional i post-traducciona també poden alterar la resistència a antibiòtics. En *S. maltophilia*, però, poc se sap sobre aquest tipus de regulació. En *S. maltophilia*, s'han identificat 60 candidats de RNA petit no codificant (sRNA) i un gen *hfq* i un mutant Δhfq s'ha associat amb canvis en la susceptibilitat als antibiòtics, la producció de biofilm, la motilitat i l'expressió de diversos sRNAs [108]. No obstant això, es necessiten més estudis per determinar el paper de sRNAs en la susceptibilitat als antibiòtics.

1.3.2.6. Altres factors descrits en *S. maltophilia*

El creixement en format de colònies petites és un altre factor de virulència desenvolupat per *S. maltophilia*. La disminució en la mida i el desenvolupament més lent de les colònies està relacionat amb l'adquisició de resistència a antibiòtics i solen estar present en infeccions latents o recurrents [39].

1.3.3. Mecanismes específics de resistència a antibiòtics en *S. maltophilia*

S. maltophilia té diversos mecanismes moleculars que contribueixen a la seva àmplia resistència als antimicrobians. Aquests mecanismes poden ser intrínsecs o adquirits. Els patrons de resistència són, en gran part, com a conseqüència de les β -lactamases, bombes d'expulsió, enzims de modificació d'antibiòtics, canvis de la membrana externa i modificació del lloc diana [11]. Els mecanismes es resumeixen a la Taula 2. No obstant, a continuació, s'exposen les descripcions detallades dels principals mecanismes de resistència.

1.3.3.1. β -lactamases

La resistència a β -lactàmics és a través de dues β -lactamases cromosòmiques, L1 i L2, que s'hidrolitzen i desactiven aquests antibiòtics [109], [110]. La L1 és una metallo- β -lactamasa depenent de zinc que utilitza el sistema d'exportació Sec, aportant resistència als carbapenems, però no a altres β -lactàmics. Per al contrari, la β -lactamasa L2 utilitza el sistema d'exportació Tat amb translocació al periplasma i, a diferència de la L1, no aporta resistència als carbapenems o penicil·lines, però sí a cefalosporines i monobactams [111]. L'expressió d'aquests dos enzims és regulada per *ampR* i induïda per la presència d'antibiòtics β -lactàmics [110], [112], [113]. Per altra banda, l'expressió d'aquests enzims a *S. maltophilia* també està subjecte a una xarxa complexa de regulació. La supressió de l'operó *ampN-ampG* impedeix la inducció de β -lactamases [114], mentre que la inactivació de *mcrA*, que codifica una proteïna d'unió a penicil·lines (PBP1A), o de *ampD1*, que codifica una amidasa citoplasmàtica N-acetil-muramyl-l-alanina, provoca la hiperproducció de les β -lactamases L1 i L2 [74]. L'àcid clavulànic és un potent inhibidor de β -lactamases eficaç contra L2 però no de L1 [115]. Addicionalment, s'han observat sinergies entre ceftacídima, cefotaxime o cefepime i àcid clavulànic, fet que evidencia que *S. maltophilia* té β -lactamases d'ampli espectre (ESBL): TEM-2 i CTX-M [116].

1.3.3.2. Bombes d'expulsió

L'extraordinària resistència de *S. maltophilia* a la majoria d'antibiòtics d'ampli espectre es deu a la seva baixa permeabilitat de la membrana i, principalment, a la presència de bombes d'expulsió [117]. Les bombes d'expulsió consten d'una proteïna de fusió de membrana, un

transportador depenent d'energia i una proteïna de membrana externa [7] i, globalment, s'han descrit cinc famílies: RND (*resistance nodulation cell division*), MFS (*major facilitator superfamily*), SMR (*small multidrug resistance*), MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) i ABC (*ATP-binding cassette*) [118]. En *S. maltophilia* s'han descrit dues bombes tipus ABC (SmrA, MacABCsm), una bomba de tipus MFS (EmrCABsm), una bomba d'extrusió d'àcid fusàric (FuaABC) i sis dels vuit sistemes de RND: SmeABC, SmeEF, SmeIJK, SmeOP, SmeVWX i SmeYZ (incloent SmeGH i SmeMN) [21].

1.3.3.3. Mecanismes de resistència a TMP/SMX

El gen *sul1*, provinent de l'integró de classe 1, i el gen *sul2*, vinculat als elements de seqüències d'inserció comuna (ISCR), són coneguts per ser els responsables de la resistència a TMP/SMX en *S. maltophilia* [43], [119], [120]. El gen *dfrA*, que està localitzat en integrons de classe 1 i que codifica per l'enzim dihidrofolat reductasa, també confereix alts nivells de resistència a TMP/SMX [121]. D'altra banda, recentment s'ha reportat que les bombes d'expulsió SmeDEF, TolCsm i SmeYZ estan associades a la resistència de TMP/SMX [158], [173].

1.3.3.4. Mecanismes de resistència a quinolones

Dos dispositius s'associen amb la resistència de *S. maltophilia* a les quinolones: les bombes d'expulsió i un gen *qnr* (Smqnr) codificat cromosòmicament que protegeix tant la girasa com la topoisomerasa IV de les quinolones [109]. A diferència d'altres bacteris, els aïllats clínics de *S. maltophilia* resistents a les quinolones no presenten mutacions en les topoisomerases [124]. Fins a la data, els determinants genètics caracteritzats per la resistència a quinolones són *smeDEF*, *smeIJK*, *smeABC*, *smeVWX*, i els gens *Smqnr* [21]. *Smqnr* confereix nivells baixos de resistència intrínseca a les quinolones [125], mentre que les bombes d'expulsió, com ara la SmeDEF, comporten alts nivells de resistència adquirida a les quinolones [126].

1.3.3.5. Mecanismes de resistència a aminoglicòsids

Els mecanismes de resistència a aminoglicòsids desenvolupats per *S. maltophilia* principalment involucren enzims modificadors d'aminoglicòsids i bombes d'expulsió. Els enzims reportats fins a la data inclouen AAC(6')-Iz [127], APH(3')-IIc [128] i un nou enzim, la AAC(6')-Iak, que recentment va ser identificat en una soca multiresistent (en anglès, *multidrug resistant* –MDR) del Nepal [129]. Les bombes d'expulsió, que inclou les bombes SmeABC, SmeYZ, SmeOP-TolCsm, i MacABCsm també s'associen amb la resistència a aminoglicòsids [21].

Taula 2. Mecanismes moleculars de resistència a antibiòtics en *S. maltophilia*.

Mecanisme		Determinants associats	Resistència als antibiòtics associada	Resistència intrínseca	Resistència adquirida	Referències
B-Lactamases	L1	<i>ampR</i> depenent (que implica <i>ampR</i> , operó <i>ampN-ampG</i> , <i>ampD</i> , i <i>mrcA</i>)	B-lactàmics	SÍ	SÍ	[112], [114], [130]–[132]
	L2			SÍ	SÍ	
	TEM-2			ND	ND	
Bombes d'expulsió	Família RND	<i>SmeABC</i>	Aminoglicòsids, B-lactàmics i quinolones	NO	SÍ	[133]
		<i>SmeDEF</i>	Cloramfenicol, macròlids, tetraciclins, macròlids, TMP/SMX	SÍ	SÍ	[134], [135]
		<i>SmeGH</i>	ND	ND	ND	[9]
		<i>SmeIJK</i>	Aminoglicòsids, tetraciclins, ciprofloxacina	SÍ	SÍ	[136]
		<i>SmeMN</i>	ND	ND	ND	[9]
		<i>SmeOP</i>	Aminoglicòsids, macròlids, TMP/SMX, doxiciclina, àcid nalidíxic, cloramfenicol	SÍ	NO	[123]
		<i>SmeVWX</i>	Cloramfenicol, quinolones, tetraciclins	NO	SÍ	[137]
		<i>SmeYZ</i>	Aminoglicòsids, TMP/SMX	SÍ	SÍ	[136]
	Família ABC	<i>SmrA</i>	Fluoroquinolones i tetraciclins	ND	SÍ	[138]
		<i>MacABCsm</i>	Aminoglicòsids, macròlids, polimixines	SÍ	ND	[139]
	Família MFS	<i>EmrCABsm</i>	Àcid nalidíxic i eritromicina	NO	SÍ	[140]
Àcid Fusàric	<i>FuaABC</i>	Àcid fusàric	ND	ND	[141]	
Integrans Classe 1 i elements ISCR		<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA</i>	TMP/SMX	ND	ND	[43], [119]–[121]
Qnr		<i>Smqnr</i>	Quinolones i tetraciclins	SÍ	SÍ	[125], [126], [142]
Enzims modificadors d'antibiòtics		AAC(6')-Iz, APH(3')-IIc, AAC(6')-Iak	Aminoglicòsids	SÍ	SÍ	[127]–[129]
Lipopolisacàrid (LPS)		<i>SpgM</i>	Aminoglicòsids, polimixina B, ticarcil·lina/àcid clavulànic i piperacilina/tazobactam	ND	ND	[78]

1.4. La colistina

La introducció de les polimixines (polimixina B i colistina) com a teràpia d'última línia per al tractament d'infeccions per BGN multi o extensament resistents a fàrmacs (MDR- *multidrug resistant* o XDR – *Extensively drug resistant*) és un dels fets més importants de l'era post-antimicrobiana.

La colistina (també coneguda amb el nom de polimixina E) és un antibiòtic polipeptídic que originalment es va aïllar l'any 1947 del bacteri *Paenibacillus polymyxa* subsp. *colistinus* [143]. Va ser introduïda en la pràctica clínica a la dècada dels 50, però va ser reemplaçada per altres agents actius sobre BGN els quals se'ls associava menors fenòmens de toxicitat [144]. No obstant això, l'increment sostingut de la resistència antimicrobiana, particularment en BGN, i l'absència del desenvolupament de nous fàrmacs actius sobre aquest tipus de microorganismes en els darrers 30 anys, ha motivat la reintroducció sistemàtica de la colistina [144]. Així doncs, actualment, el seu ús s'ha incrementat de forma notable i, com a conseqüència, l'aparició de resistències.

1.4.1. Estructura química

Les polimixines són lipopèptids cíclics caracteritzats per una cadena peptídica (decapèptid) que es troba unida a un àcid gras. Aquest decapeptid conté un *loop* cíclic de set aminoàcids entre el grup amino de la cadena lateral de l'àcid di-amino-butíric en posició 4 i el grup carboxil del carboni terminal del residu 10 de treonina. Aquest *loop* s'uneix a través d'una cadena de tres aminoàcids a l'àcid gras amino terminal (Figura 4). A més a més, inclou residus d'àcid α - γ -di-amino-butíric, el qual fa que aquesta molècula a pH 7,4 sigui policatiònica. Al mateix temps, la presència de la cadena lateral d'àcids grassos i els substituents en posicions 6 i 7 expliquen la hidrofobicitat de la molècula [145], [146]. Aquesta barreja de grups hidro i lipofílics fa que les polimixines siguin molècules amfipàtiques, una propietat fisico-química que és essencial per al mecanisme d'acció d'aquest antimicrobià.

S'han caracteritzat diferents tipus de polimixines i cada grup és definit per una lletra (des d'A a T), d'acord amb els residus d'aminoàcids presents a la seva seqüència, especialment en base a la diferència dels aminoàcids en posició 6 i 7 [146]. Al mateix temps, cada un d'aquests ha estat subclassificat segons l'àcid gras present en el grup amino terminal.

Dels diferents grups de polimixines identificats fins al moment, només les polimixines B i E tenen ús clínic.

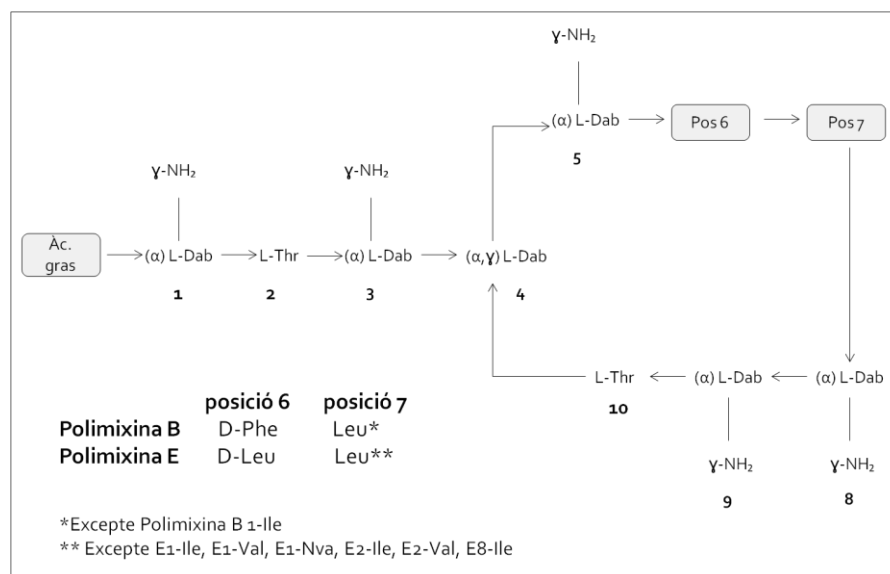


Figura 4. Estructura bàsica de les polimixines. L: Levogir; D: dextrogir, Dab: àcid diaminobutíric; Thr: treonina; Phe: fenilalanina; Leu: leucina; Ile: isoleucina; Val: valina; Nva: norvalina. S'aprecia el *loop* cíclic de set aminoàcids (posició 4-10) units a través d'una cadena de tres aminoàcids (posició 1-3) a un àcid gras. A més a més, els diferents residus en posició 6 i 7 determinen les diferents polimixines. Finalment, l'àcid gras determina el subtipus. Figura adaptada de Poirel *et al.* [147].

1.4.2. Mode d'acció

Els bacteris gramnegatius tenen una estructura especial, la membrana externa, que actua com a barrera de pas per moltes substàncies, entre elles els antimicrobians. Aquesta membrana posseeix una capa interna, de naturalesa fosfolipídica i una externa, formada majoritàriament de LPS.

Per entendre el mecanisme d'acció de la colistina cal saber que hi ha dos cations bivalents, Mg²⁺ i Ca²⁺, associats als fosfoèsters del lípid A, els quals tenen un paper estructural molt rellevant en tenir la funció d'unir i estabilitzar les molècules de LPS adjacents. D'aquesta manera, la membrana externa del bacteri gramnegatiu es configura com una barrera no només mecànica, sinó també electrostàtica, amb una elevada càrrega aniónica repulsiva, conferida per les fraccions fosfoèster del lípid A, així com també pels fosfats i carboxilats dels sucres de les altres dues estructures del LPS (*core* i antigen O).

El punt d'unió primari de les polimixines és el lípid A del LPS i per la seva acció és crucial la naturalesa amfipàtica d'aquests antimicrobians. Les polimixines a pH fisiològic (7,4) configuren una molècula policatiónica que genera, inicialment, una atracció electrostàtica entre la molècula de polimixina i els fosfats del lípid A carregats negativament. Després d'aquesta interacció inicial, es produeix un desplaçament dels cations bivalents, Ca²⁺ i Mg²⁺, els quals tenen com a funció estabilitzar el LPS bacterià (Figura 5A). Un cop desestructurat el LPS, s'insereix la molècula antimicrobiana a la membrana externa a través dels seus segments hidròfobs, és a dir, mitjançant la cua d'àcid gras de la posició amino-terminal i a través dels residus hidròfobs de la posició 6 i 7 de l'antimicrobià (Figura 5A). Després de ser insertada la molècula de polimixina, es condiciona un deteriorament de l'acoblament dels àcids grassos de la molècula del lípid A, provocant una expansió estructural de la membrana externa.

Posteriorment, es genera una fusió de la capa interna de la membrana externa (la qual es troba orientada cap a l'espai periplasmàtic) amb la cara externa de la membrana citoplasmàtica. Es creu que això genera canvis en la seva estructura fosfolipídica, augmentant la permeabilitat de la membrana bacteriana que finalment determina que es perdi la resistència osmòtica del bacteri. Aquest fet dóna lloc a fugites del contingut citoplasmàtic i, en última instància, la mort cel·lular, comportant l'efecte bactericida d'aquest antimicrobià [145], [146] (Figura 5B).

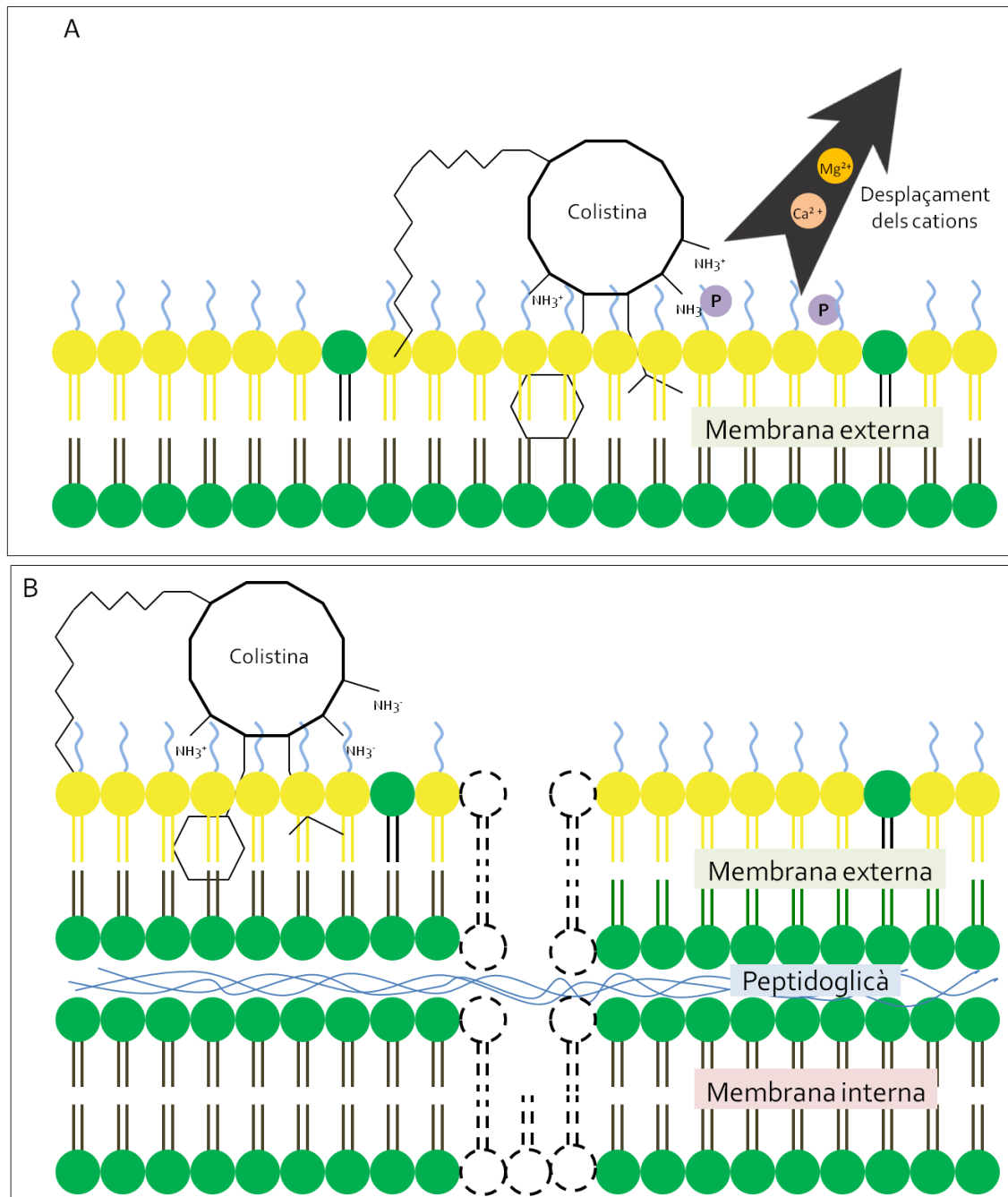


Figura 5. Mode d'acció proposat de les polimixines. **A)** Inicialment, es genera una atracció electrostàtica entre la polimixina, de càrrega neta positiva, i el lípid A, de càrrega negativa, fet que genera el desplaçament repulsiu dels cations divalents que estableixen el LPS. Seguidament, té lloc la inserció de l'antimicrobià a través dels seus residus hidrofòbics en la membrana externa. **B)** Una vegada insertada la polimixina, es genera una alteració estructural de la membrana citoplasmàtica que produirà la lisi bacteriana. En groc estan representats els LPS i en verd els fosfolipids. Figura adaptada de Bialvaei i Samadi [148].

La interrupció i/o permeabilització de la membrana citoplasmàtica dels bacteris gramnegatius s'ha suggerit com el principal mecanisme d'acció de les polimixines. No obstant això, en els darrers anys, com a conseqüència de l'increment en el seu ús, s'ha intensificat la investigació sobre els seus mecanismes d'acció ja que el dubte pel que fa a la singularitat del mecanisme principal proposat és elevada.

Així doncs, un altre mecanisme antibacterià exposat és l'efecte endotoxina. L'endotoxina de patògens gramnegatius correspon a la part de lípid A del LPS. Les polimixines tenen la capacitat d'unir-se al lípid A i neutralitzar aquesta molècula LPS alliberat durant la lisi cel·lular [147]. Una altra manera d'acció de les polimixines és la inhibició dels enzims respiratoris vitals (inhibició oxidoreductases NADH-quinona de tipus II [NDH-2]) a la membrana interna bacteriana [147]. Finalment, hi ha grups que han explorat la capacitat de les polimixines per unir-se a ribosomes [149].

1.4.3. Espectre d'acció

En general, l'espectre clínic de totes les polimixines és similar i només existeixen algunes petites diferències quantitatives de la seva activitat *in vitro*. L'espectre antimicrobià de la colistina és estret, principalment, contra bacteris gramnegatius. És activa enfront de la majoria dels membres de la família *Enterobacteriaceae*, incloent *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp. i *Shigella* spp. Per contra, algunes espècies són naturalment resistents a les polimixines, com ara *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Serratia marcescens*, *Pseudomonas mallei*, *B. cepacia*, *Chromobacterium* spp., *Edwardsiella* spp., *Brucella* spp., *Legionella* spp., *Campylobacter* spp., i *Vibrio cholerae*. Tampoc tenen activitat contra cocs gramnegatius (*Neisseria* spp.), els bacteris grampositius i els bacteris anaerobis [147].

La importància de l'ús de colistina radica en la seva acció contra a patògens gramnegatius MDR, com ara *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* i *S. maltophilia* [144].

Tant pel Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) com per la *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), els punts de tall (en anglès, clinical breakpoints), per a *P. aeruginosa* i *A. baumannii* estan definits per una concentració mínima inhibidora (CMI) ≤ 2 µg/mL [150], [151].

1.4.4. Toxicitat

Anys enrere, es va reportar que l'ús de polimixines estava associat amb una alta incidència de toxicitat, com nefrotoxicitat, neurotoxicitat i bloqueig neuromuscular, a vegades amb conseqüències fatals. Per aquest motiu, l'ús de la colistina va ser limitat a finals dels anys setanta, llevat per al tractament de pacients amb FQ. No obstant això, estudis recents han demostrat que la incidència de la nefrotoxicitat és menys comú i amb menor gravetat en comparació amb els estudis antics i els efectes neurotòxics de les polimixines són, generalment, lleus i es resolen immediatament després de la interrupció de l'antibiòtic [148].

La nefrotoxicitat és la principal i més preocupant reacció adversa descrita per colistina ja que s'acumula en les cèl·lules tubulars renals comportant citotoxicitat [152]. La dosi utilitzada s'ha relacionat de forma directament proporcional amb la incidència d'aquest esdeveniment advers on, recentment, s'han descrit taxes de nefrotoxicitat fins al 85% quan s'utilitzen dosis superiors a 2,2 µg / mL [153]. La informació sobre l'impacte de la nefrotoxicitat durant el tractament amb colistina és escassa i amb dades contradictòries ja que alguns estudis han reportat taxes de mortalitat més altes en pacients amb nefrotocixitat i d'altres no han trobat aquesta associació [154].

1.4.5. Teràpia combinada

La colistina s'utilitza amb freqüència com a teràpia combinada per tal de millorar la seva activitat antibacteriana, ja que s'ha descrit que l'ús de la monoteràpia afavoreix l'aparició d'heteroresistència en BGN MDR [148]. Per tal reduir els fenòmens de resistència, un augment de la dosi de colistina no seria aconsellable com a conseqüència de la seva toxicitat i, per la qual cosa, a la pràctica clínica s'utilitza sovint la teràpia combinada. A més a més, en diversos estudis s'ha reportat un notable efecte sinèrgic entre la colistina i altres antibiòtics [155].

Hi ha informes contradictoris sobre l'eficàcia de la teràpia combinada enfront de la monoteràpia. No obstant això, en termes generals, la taxa de curació clínica i la taxa d'eradicació microbiològica són majors en el grup de la teràpia combinada que en el grup de la monoteràpia amb colistina (48,6% vs. el 42,5% i 66,7% vs.59,4%, respectivament), tot i que les diferències no són estadísticament significatives [148].

En general, l'experiència *in vitro* a l'assajar colistina associat a carbapenems contra diferents BGN ha demostrat resultats favorables disminuint el desenvolupament de resistència [156]. Aquests resultats han motivat la utilització clínica d'aquest tipus de combinacions. No obstant això, els resultats en l'àrea clínica han estat menys motivadors i de vegades contradictoris [157].

Recentment, la combinació de colistina amb una bacteriocina (Nisina) ha mostrat un efecte sinèrgic contra BGN i ofereix la possibilitat d'eliminar la toxicitat d'aquest medicament. No obstant, en un estudi sobre activitats *in vitro* de teràpia combinada de colistina contra *P. aeruginosa*, l'activitat sinèrgica de les combinacions de colistina-azitromicina, colistina-doxiciclina i colistina-rifampicina va ser menor del que s'esperava i es va reportar un elevat percentatge de resultats amb diferències no significatives [148].

En combinació, la sinergia s'ha observat amb rifampicina, imipenem, arbekacina, aztreonam, piperacil·lina, i ciprofloxacina, i d'acord amb les dades d'aquesta combinació, la màxima sinergia esdevé amb colistina més rifampicina (sinergia, 80,0%; additiu, 17,5%). Aquesta combinació pot tenir un paper important en el tractament de *K. pneumoniae* multiresistent i, possiblement, pot retardar la selecció de subpoblacions heteroresistents durant la teràpia amb colistina [148].

La teràpia de combinació amb colistina es pot requerir per a tractar infeccions associades amb biofilm. En un estudi, la combinació colistina-doripenem contra biofilm i cèl·lules planctòniques de soques de *P. aeruginosa* MRD, va donar resultats satisfactoris i van minimitzar l'aparició de resistències [158].

1.4.6. Resistència a la colistina

La resistència a colistina en BGN és fenomen emergent. Això es relaciona, molt probablement, amb el poc ús que se li ha donat durant molts anys com a conseqüència de la seva retirada per motius de toxicitat. No obstant això, la reincorporació d'aquest fàrmac en els darrers anys ha comportat un augment del seu ús, fet que ha causat l'increment considerable de la taxa de resistència i la descripció de diferents mecanismes de resistència.

Alguns bacteris gramnegatius són resistents naturals a la colistina, però el que genera una gran preocupació és l'existència de resistència adquirida a polimixines en diversos gèneres de la família de les *Enterobacteriaceae*, com ara *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, i *Salmonella*; i també en bacils no fermentadors com ara *A. baumannii* i *P. aeruginosa*.

Els mecanismes de resistència a colistina segueixen sent desconeguts per algunes espècies bacterianes, però s'han identificat diferents determinants genètics implicats en algunes espècies de BGN. Aquests mecanismes poden estar relacionats amb la modificació del LPS, la producció de polisacàrids capsulars i el rol de les bombes d'expulsió, tots ells mecanismes cromosòmics. Recentment, l'any 2015, Liu *et al.* [159] van descriure el primer mecanisme plasmídic de resistència en *Enterobacteriaceae*, denominat MCR-1, el qual s'exposarà més endavant. En particular, els mecanismes de resistència a colistina en *S. maltophilia* estan pocs estudiats. És per aquest motiu, doncs, que descriurem alguns mecanismes en altres espècies on si que es coneixen els determinants d'aquesta resistència.

1.4.6.1. Resistència intrínseca o natural

Hi ha una sèrie de bacteris gramnegatius que són resistents naturals a les polimixines, com ara *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Morganella morganii*, *Serratia spp.*, *Edwardsiella tarda* i *B. cepacia*. La majoria d'aquests bacteris tenen el LPS modificat amb 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa (L-Ara₄N), fet que podria explicar la seva resistència intrínseca [160].

En *Proteus mirabilis* i *S. marcescens* l'origen natural de resistència a polimixines està vinculat a l'expressió constitutiva de l'operó *arnBCADTEF* i/o del gen *eptB*, causant de l'addició de grups catiònics al LPS com ara la fosfoetanolamina (pEtN) i/o L-Ara₄N. Aquesta modificació augmenta la càrrega del LPS, que és la diana inicial de les polimixines i, per tant, disminueix la unió, donant lloc a la resistència intrínseca d'aquestes espècies a les polimixines [147].

1.4.6.2. Modificació del LPS

La resistència més comuna és la relacionada amb la modificació del LPS per mitjà de substitució catiònica (addició dels grups catiònics L-Ara₄N i pEtN), similar a l'observada en bacteris amb resistència intrínseca a polimixines. En la majoria dels bacteris gramnegatius, els sistemes de dos components PhoP/Q i PmrA/B són els responsables de la modificació del LPS i, per tant, de la resistència a polimixines. Aquests sistemes regulen la resistència als antimicrobians catiònics en resposta al baix contingut ambiental en Mg²⁺ i Ca²⁺, així com pèptids antimicrobians catiònics (CAMPs) i altres inductors, com ara el baix pH, l'excés de ferro, l'excés d'alumini, macròfags i fagosomes.

Així doncs, el mecanisme global més important de resistència està intervingut per mutacions en els gens del sistema regulador de PhoPQ-PmrAB, tant en MgrB (regulador negatiu de *phoQ*) com en la quinasa PmrB, que finalment produeixen un augment en la transcripció de complexos-*arn*, permetent la biosíntesi de molècules catióniques que canvien la càrrega neta del LPS i, per tant, disminueixen la unió de les polimixines. Així, Adams *et al.* [161] van descriure el sistema PmrAB (*polimyxin resistance*), descrivint que la mutació o l'increment d'expressió dels gens *pmrA* i *pmrB* és seguit d'un augment en la quantitat de pEtN i/o LAra₄N al lípid A. L'addició covalent d'aquestes molècules, que són de càrrega positiva, fan que la càrrega neta del lípid A sigui menys negativa, el que altera el primer mecanisme d'unió de la polimixina amb la seva diana, que és l'atracció electrostàtica. Tots aquests fets es tradueixen en la disminució de l'afinitat de l'antimicrobià pel LPS.

Un altre mecanisme associat a l'augment de resistència a polimixines és l'addició de cadenes addicionals d'àcids grassos a l'estructura del lípid A, el que faria a la membrana externa menys penetrable per a les polimixines [162].

La capacitat adaptativa d'un bacteri per aconseguir avantatges evolutius, li permet deixar d'expressar estructures determinants. És així com s'ha descrit a *A. baumannii* la pèrdua completa de la producció de LPS [163].

Diferents esdeveniments moleculars, com ara delecions, insercions o mutacions puntuals poden inactivar qualsevol dels tres principals gens de la via sintètica del lípid A: *lpxA*, *lpxC*, i *lpxD*. L'absència del lloc diana fa inviable l'acció de les polimixines. El bacteri compensa la pèrdua del LPS augmentant la síntesi d'altres estructures, com ara fosfolípids, lipoproteïnes i poli-β-1,6-N-acetilglucosamina [147], [149], [160], [164].

A continuació, s'exposa una taula adaptada de Trimble *et al.* [149] (Taula 3) on hi ha un resum dels diferents mecanismes relacionats amb la modificació del LPS.

Taula 3. Modificacions del LPS que condueixen a la resistència a polimixines a una alta susceptibilitat.

Modificació	Funció	Gens	Bacteris spp.
Modificació del L-Ara ₄ N o PEtn del lípid A	Sistemes de dos components (Quinasa/Regulador resposta)	<i>phoP/phoQ</i>	<i>E. coli</i>
			<i>Salmonella typhimurium</i>
			<i>P. aeruginosa</i>
		<i>pmrA/pmrB</i>	<i>E. coli</i>
			<i>S. typhimurium</i>
			<i>P. aeruginosa</i>
			<i>A. baumannii</i>
			<i>K. pneumoniae</i>
		<i>parR/parS</i>	<i>P. aeruginosa</i>
		<i>cprR/cprS</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	<i>colR/ColS</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
	Sistema <i>Rcs</i>	<i>S. typhimurium</i>	
<i>cbrAB</i>	<i>P. aeruginosa</i>		
Regulador resposta	<i>rppA</i>	<i>P. mirabilis</i>	
Activador <i>pmrAB</i>	<i>pmrD</i>	<i>S. typhimurium</i>	

Continuació Taula 3.

	Funció	Gens	Bacteris spp.
	UDP-glucosa dehidrogenasa	<i>pmrE</i> (<i>pagA</i> o <i>ugd</i>)	<i>P. mirabilis</i>
			<i>S. typhimurium</i>
		<i>arnBCADTEF</i> (<i>pmrHFIJKLmpgbP</i>)	<i>E. coli</i>
			<i>S. typhimurium</i>
			<i>P. aeruginosa</i>
			<i>P. mirabilis</i>
			<i>K. pneumoniae</i>
		<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	
	<i>ugdBCAL2946</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	
	L-Ara ₄ N transferasa	<i>arnT</i>	<i>E. coli</i>
		(<i>pmrK</i>)	<i>S. typhimurium</i>
(<i>pgaB</i>)		<i>Salmonella typhi</i>	
Manosiltransferasa	<i>pbgE1</i>	<i>Photobacterium luminescens</i>	
Fosforilació Ugd	<i>etk</i>	<i>E. coli</i>	
Oxidoreductasa	<i>DsbA1, DsbA2, DsbA3</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	
Modificació del PEtn del LOS/LPS	Sistemes de dos components (quinasa/ regulador resposta)	<i>misS/misR</i>	<i>N. meningitidis</i>
	Transferasa	<i>eptB</i>	<i>E. coli</i>
			<i>S. typhimurium</i>
		<i>eptC</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
	Transferasa PEtn	<i>pmrC</i> (<i>eptA</i> i <i>lptA</i>)	<i>E. coli</i>
			<i>S. typhimurium</i>
sRNA	<i>mgrR</i>	<i>A. baumannii</i>	
Fosfotransferasa	<i>cptA</i>	<i>E. coli</i>	
Deacilació del lípid A	Deacetilasa	<i>naxD</i>	<i>S. typhimurium</i>
		<i>pagL</i>	<i>Francisella tularensis</i>
		<i>yfbH</i> (<i>pmrJ</i>)	<i>S. enterica</i>
	sRNA	<i>lpxR</i>	<i>E. coli</i>
Expressió del repressor <i>phoPQ</i>	Regulador transmembrana	<i>mgrB</i> (<i>yobG</i>)	<i>S. typhimurium</i>
	Regulador MerR-like	<i>brlR</i>	<i>E. coli</i>
	sRNA	<i>micA</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Modificació del L-Lys de la membrana cel·lular	Transferasa	<i>mprF</i> (<i>lpiA</i>)	<i>S. aureus</i>
			<i>Enterococcus faecalis</i>
	Lisinilació	<i>lysX</i>	<i>Rhizobium tropici</i>
Fosforilació del lípid A	Fosfotransferasa	<i>lpxT</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
			<i>S. typhimurium</i>
		<i>waaP</i> (<i>rfaP</i>)	<i>E. coli</i>
			<i>P. aeruginosa</i>

1. Introducció

Continuació Taula 3.

Modificació	Funció	Gens	Bacteris spp.
Desfosforilació del lípid A	Fosfatasa	<i>lpxE</i> i <i>lpxF</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
			<i>Francisella novicida</i>
			<i>Rhizobium etli</i>
	Activador transcripcional de fosfatasa	<i>PF1587</i> i <i>PG1773</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
			<i>Dickeya dadantii</i>
Glicilació del lípid A	Sistemes de dos components (quinasa/ regulador resposta)	<i>vprA/vprB</i>	<i>V.cholerae</i>
		<i>carR/carS</i>	<i>V.cholerae</i>
		<i>almEFG</i>	<i>V.cholerae</i>
Addició de cadenes acil amides al lípid A	Dehidrogenasa i transaminasa	<i>gnnA</i> i <i>gnnB</i>	<i>C. jejuni</i>
Modificació glucosamina		<i>lgmABC</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
		<i>pgaABCD</i>	<i>E.coli</i>
			<i>A. baumannii</i>

1.4.6.3. RamA

El regulador intrínsec RamA de *K. pneumoniae* se sap que juga un paper significatiu en la resposta general als antimicrobians. RamA regula els gens que estan relacionats amb la permeabilitat de la membrana i, per tant, poden estar implicats en l'increment de la resistència als antibiòtics [147]. Recentment, s'ha demostrat que l'augment dels nivells d'aquest regulador poden causar alteracions en el LPS i, per tant, una disminució en la susceptibilitat a les polimixines [165].

1.4.6.4. Polisacàrids capsulars

Hi ha indicis que la càpsula juga un paper en la resistència a polimixines, ja que ja s'ha descrit aquest mecanisme en alguns bacteris que són resistents intrínsecs a les polimixines, com ara *N. meningitidis* i *C. jejuni*. Per exemple, en *N. meningitidis*, la pèrdua de la càpsula única o de la càpsula i el LPS contribueix a un augment de 10 vegades en la susceptibilitat a la polimixina B [166].

Per altra banda, un estudi va demostrar que el polisacàrid capsular (CPS) actua com una barrera protectora contra polimixines en *K. pneumoniae*. *K. pneumoniae* és capaç d'alliberar polisacàrids capsulars aniònics de la seva superfície. Aquest alliberament condueix a la captura de pèptids antimicrobians catiónics, com ara polimixines, disminuint així la quantitat d'antibiòtic que arriba a la superfície bacteriana. El CPS està connectat a la superfície bacteriana a través d'una interacció iònica amb els LPS, i aquesta interacció s'estabilitza per cations divalents. Així doncs, l'alliberament de CPS en presència de polimixines esdevé com a conseqüència de la pertorbació dels ponts dependents de cations entre les molècules de LPS [147].

Finalment, també s'ha descrit que alguns reguladors que regulen la formació de la càpsula, com ara Cpx (expressió del pilus conjugatiu, *conjugative pilus expression*) i Rcs (regulador de la síntesi de càpsula, *regulator of capsule synthesis*), semblen estar implicats en la resistència a la colistina

mitjançant l'activació de la bomba d'expulsió KpnEF per Cpx o mitjançant la regulació de phoPQ TCS pel reguló Rcs [164], [167].

1.4.6.5. Bombes d'expulsió

El paper de les bombes d'expulsió no s'acaba d'entendre molt bé, però diversos estudis suggereixen la implicació de les bombes d'expulsió en la resistència a colistina. Diverses bombes d'expulsió o reguladors de bombes d'expulsió s'han reportat en moltes espècies, com ara les proteïnes Sap (*sensitive antimicrobial peptides*), BrlR, KpnEF o el complex AcrAB-TolC. Generalment, l'activació d'aquestes bombes condueix a un augment de la resistència a diversos antibiòtics al mateix temps, incloent la colistina [168], [169].

En *P. aeruginosa*, s'ha descrit resistència a colistina per la sobreexpressió del sistema de bombes d'expulsió MexAB-OprM [170]. En *K. pneumoniae*, la bomba d'expulsió KpnEF és un membre del reguló Cpx que regula la síntesi de la càpsula i confereix resistència a diversos antibiòtics com ceftriaxona, eritromicina, rifampicin i colistina [167]. Aquesta bomba pertany a la família SMR, com EbrAB en *Bacillus subtilis* o AbeS en *A. baumannii*. Al mateix temps, en *K. pneumoniae* i *E. coli* s'ha associat la resistència a polimixines a la bomba d'expulsió AcrAB-TolC i en *Burkholderia vietnamiensis* la bomba NorM [164].

1.4.6.6. Gens *mcr* (mobile colistin resistance)

Molt recentment, al novembre de 2015, Liu *et al.* [159] descriuen a Xina el primer mecanisme plasmídic de resistència a colistina, denominat MCR-1, detectat en soques d'*E. coli* aïllades d'animals, aliments i humans. També detecten el gen *mcr-1* en soques clíniques de *K. pneumoniae*.

La THG representa un canvi en el paradigma de la resistència a colistina comportant un augment constant de les descripcions de resistències a aquest fàrmac, ja siguin només per mutacions cromosòmiques com fins a l'any 2015 o per la transferència plasmídica. Així doncs, recentment, l'ús de polimixines està qüestionat, principalment, per l'aparició d'aquest plasmidi mòbil de resistència a colistina anomenat MCR-1.

La proteïna codificada Mcr-1 és un membre de la família de l'enzim fosfoetanolamina transferasa, que addiciona fosfoetanolamina al lípid A, fet que provoca que el LPS esdevingui més catiònic i, com a conseqüència, disminueixi l'afinitat de la colistina pel lípid A (Figura 6) [171].

1.Introducció

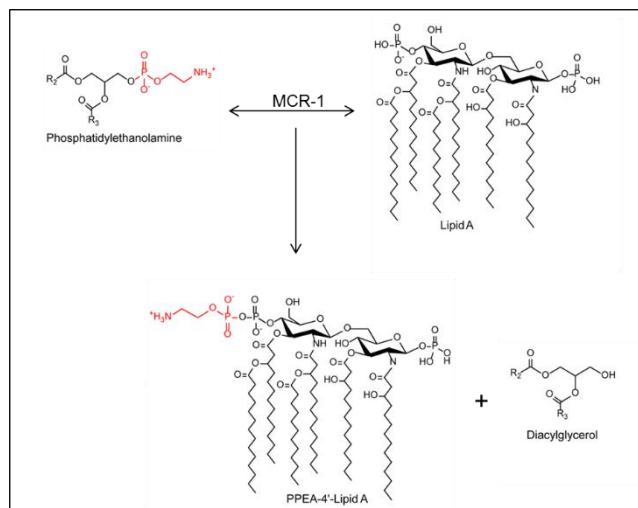


Figura 6. Model proposat per la reacció catalitzada per Mcr-1 en *E. coli*. Figura adaptada de Gao *et al.* [171].

La genètica de l'adquisició del gen *mcr-1* ha estat investigada àmpliament. Aquest gen s'ha trobat en plasmidis que posseeixen diverses cadenes principals (IncI2, IncHI2, IncP, IncX4, IncFI, i IncFIB) i de diverses mides (58 a 251 KB). Aigües amunt del gen *mcr-1*, l'element d'inserció ISAp1 s'ha identificat de manera inconstant [159].

Recentment, el gen *mcr-1* s'ha identificat en el cromosoma d'una soca d'*E. coli* a Alemanya, fet que suggereix que aquest gen de resistència es pot integrar i establir-se en el genoma d'alguns aïllats [172]. Calen més investigacions per entendre millor el procés d'adquisició del gen *mcr-1*; no obstant això, fa poc temps que s'ha demostrat que es troba dins d'una estructura genètica de 2600pb, definit com el "*mcr-1* casset", que podria haver estat mobilitzat per transposició [173]. Aquest casset porta les seves pròpies seqüències promotores que determinen l'expressió de *mcr-1*.

A part del gen *mcr-1* ja s'han reportat diverses variants funcionals. Per una banda, per exemple, s'ha detectat a Itàlia una variant de *mcr-1* (Q3L) que codifica MCR-1.2 en *K. pneumoniae* [174], probablement, compartint la mateixa activitat que Mcr-1. Per altra banda, recentment, Mcr-2, una altra fosfoetanolamina transferasa que comparteix un 76,7% d'identitat amb la seqüència de Mcr-1, s'ha identificat en soques d'*E. coli* aïllades de porcs a Bèlgica [175]. En definitiva, fins a la data, s'han descrit diferents variants dels gens *mcr* en enterobacteries, des de *mcr-1* fins a *mcr-5* [176], [177], però *mcr-1* va ser el primer en descriure's [159]. Tot i així, cal tenir present que les fosfoetanolamina transferases no només són plasmídiques si no que moltes espècies bacterianes contenen còpies cromosòmiques d'aquest enzim com, per exemple, en *E. coli* els gens *eptA*(*pmrC*), *eptB* i *eptC* [178].

Finalment, cal tenir en consideració que s'ha reportat que alguns dels plasmidis que porten el gen *mcr-1* també tenen altres gens de resistència antimicrobiana que codifiquen resistència a antibiòtics clínicament rellevants per a la medicina humana, com ara β -lactams, aminoglicòsids, quinolones, fosfomicina, sulfonamides i tetraciclins. La ubicació del gen *mcr-1* en plasmidis de resistència a múltiples fàrmacs és preocupant perquè l'ús d'antimicrobians diferents de polimixines pot participar en la co-selecció dels aïllats que porten *mcr-1* i en la seva propagació.

1.4.6.7. Heteroresistència a la colistina

La resistència a la colistina en aïllaments clínics pot passar desapercebuda quan s'utilitzen proves de susceptibilitat als antibiòtics *in vitro* tradicionals com a conseqüència de l'heteroresistència [179]. El fenomen de l'heteroresistència per a la colistina ha estat descrit, principalment, en gramnegatius MDR. Essencialment, es tracta de la presència de subpoblacions resistents a un determinat antibiòtic, fins i tot en soques sensibles [180], referint-se com un fenomen de subpoblacions genèticament diferents que coexisteixen en un sol aïllat i que són heretades per diverses generacions [181], [182].

L'heteroresistència pot ser intrínseca o adquirida. L'heteroresistència intrínseca es produeix sense preexposició a l'antibiòtic, però aquest fenomen també pot ser adquirit o induït després de l'exposició inicial als antibiòtics [180]. L'heteroresistència pot tenir un impacte en el resultat de la infecció clínica, sobretot perquè la seva detecció pot ser difícil mitjançant les proves rutinàries de sensibilitat als antibiòtics.

El primer cas d'heteroresistència en colistina reportat va ser l'any 2006 en soques d'*A. baumannii* [183]. Des d'aleshores, hi ha hagut un número creixent de publicacions informant de l'heteroresistència de colistina en aïllaments clínics de diferents gramnegatius [184].

L'heteroresistència de colistina s'ha identificat en *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *S. enterica* i *P. aeruginosa* i es creu que pot contribuir a la ràpida aparició de resistència a la colistina observat en la monoteràpia [179], [184]–[187].

Per a *S. maltophilia*, fins a la data, no hi ha estudis publicats on es mostri l'evidència de l'aparició d'aquest fenomen en la colistina, malgrat que sí que apareixen casos en la medicina clínica on s'exposa que seria adequat tenir present la possibilitat que pugui succeir aquest fenomen [188].

Des del punt de vista de la significança clínica, alguns informes qüestionen la importància de l'heteroresistència, mentre que altres sostenen que té una gran rellevància en infeccions recurrents, infeccions cròniques i en infeccions amb un augment de les taxes de mortalitat [180].

1.4.6.8. Resistència adaptativa a la colistina

La resistència adaptativa es pot definir com un fenomen d'auto-regulació que es caracteritza per la ràpida inducció de resistència amb presència del fàrmac i la posterior inversió en el fenotip sensible en absència d'aquest. Aquest fenomen no és causat per la selecció de soques mutants resistents, però sí, pels canvis fenotípics dels microorganismes per sobreviure a l'efecte letal dels antibiòtics. A diferència de l'heteroresistència (resistència genètica, que és estable per l'aparició de mutació cromosòmica o l'adquisició d'un element genètic), la resistència adaptativa demostra històricament ser inestable i reversible.

Entre els patògens importants de les infeccions nosocomials, està reportat que *P. aeruginosa* és un microorganisme capaç de desenvolupar resistència a diversos antibiòtics, ja sigui permanent o temporal [189]. En estudis *in vitro* amb l'exposició a concentracions creixents de colistina, es va demostrar el desenvolupament de resistència adaptativa en aquest organisme, amb una

reducció gradual en l'efecte del fàrmac i la disminució de la capacitat bactericida dels mateixos. El fenomen reversible demostrat i el grau de susceptibilitat a la colistina van tornar als nivells de línia de base quan es va dur a terme l'eliminació de l'antimicrobià. En *P. aeruginosa* es proposa que el sistema ParRS (*Polymyxin adaptive resistance*) està involucrat en aquest tipus de resistència [190].

El fenomen de resistència reversible induïda per a l'exposició a concentracions creixents de polimixines també s'ha observat en aïllats d'*A. baumannii* [185] i, recentment, s'ha reportat un cas de resistència adaptativa *in vivo* a la colistina en dues soques clíniques no relacionades d'*E. coli* [191].

1.4.7. Mètodes per determinar la susceptibilitat a la colistina

Malgrat l'existència d'un llarg període d'ús clínic, encara no existeix un mètode reproduïble i fiable disponible per a la prova de susceptibilitat a la colistina. Les dificultats per avaluar la susceptibilitat a la colistina són diverses, com ara, l'escassa difusió en agar, les propietats catióniques inherents del fàrmac, la variació en la composició entre marques comercials i lots, la presència d'heteroresistència en moltes espècies i la falta d'un mètode de referència fiable que permeti comparacions amb les proves comercials [147].

- Mètode difusió amb disc

No és un mètode aconsellable ja que com a conseqüència de l'escassa difusió de la colistina en l'agar, s'obtenen zones d'inhibició molt petites i una alta variabilitat entre els assajos. Així doncs, per la qual cosa, recentment les guies CLSI han tret aquest mètode per determinar la susceptibilitat a la colistina i la EUCAST no l'ha recomanat mai [192].

- Mètodes de dilució: en cultiu líquid i en agar

Existeixen dos mètodes de dilució en cultiu líquid: el mètode de macrodilució, realitzat en un volum mínim de 2 mL en tubs d'assaig estàndards, i el mètode de la microdilució (en anglès, Broth microdilution, BMD), realitzat en un volum màxim de 0,2 mL en plaques de microtitulació.

Actualment, tant la CLSI com la EUCAST recomanen el BMD com el mètode més òptim per a determinar la susceptibilitat a la colistina, esdevenint-se, doncs, el mètode de referència [193], [194]. No obstant això, BMD és una tècnica bastant laboriosa i de preparació manual de solucions d'antibiòtic que pot conduir a errors importants i, per tant, no és adaptable a la majoria de laboratoris clínics de microbiologia. A més a més, s'han reportat resultats de CMI no reproduïbles ni interpretables com a conseqüència de salts en els pouets, és a dir, pouets que no mostren creixement i, en canvi, s'observa creixement en pouets amb concentracions més altes d'antibiòtic. Aquest fenomen podria ser causat per poblacions heteroresistents [195].

L'avaluació del mètode de macrodilució en comparació amb el mètode de referència BMD no sembla mostrar falsos-susceptibles i seria el mètode que mostraria més correlació amb el mètode de referència BMD [196].

La dilució en agar pot evitar teòricament l'adsorció de la colistina a les plaques, però cap estudi ha analitzat les concentracions de colistina en les plaques de dilució d'agar per confirmar aquesta hipòtesi. Una avantatge del mètode de dilució en agar és la capacitat d'analitzar múltiples soques en una mateixa placa i la possibilitat de semiautomatitzar el mètode. No obstant, aquest mètode també presenta alguns desavantatges ja que és molt laboriós si no és automatitzat i les plaques (no disponibles comercialment) s'han d'utilitzar una setmana després de la preparació [147].

Nombrosos estudis han demostrat una forta correlació entre la dilució d'agar i la BMD [196]–[198] llevat dels resultats obtinguts d'aïllats de *P. aeruginosa* i *S. maltophilia* de pacients amb fibrosi quística [52], [199]. Així doncs, molts estudis han utilitzat el mètode de dilució en agar com a estàndard, tot i que en un document recent elaborat conjuntament per CLSI i EUCAST s'afirma que aquest mètode no es recomana per a les proves de susceptibilitat [147], fet que provoca que BMD segueixi sent el mètode de referència principal per a les proves de susceptibilitat a polimixines.

- Mètodes disponibles comercialment

Entre tots els mètodes disponibles al mercat, les tires Etest seria el més aconsellable com mètode de rutina als laboratoris d'anàlisi, però la validesa de les CMIs no està ben definida [192]. Malgrat hi hagi estudis que mostri una bona concordança entre Etest i BMD [197], [198], [200], [201], estan reportades altes taxes d'error, fins a un 32%, quan s'utilitza Etest [52], [195], [196], [202]. Cal tenir present que les tires Etest poden subestimar la CMI en una o més dilucions, especialment per a concentracions $\geq 2 \mu\text{g} / \text{mL}$, resultant CMIs susceptibles falses [197] i és possible que mitjançant Etest no es detecti la resistència a la colistina fins i tot quan els aïllats han mostrat altes CMIs mitjançant el mètode de referència [196], [202]. Un estudi va avaluar TREK Sensititre (TREK Diagnostic Systems, Inc., Cleveland, OH) amb BMD i es va reportar una correlació del 96% entre aquests dos mètodes sense reportar falsos susceptibles [196]. Recentment, s'ha avaluat el rendiment del sistema VITEK®2 automatitzat, reportant una correlació de fins al 78,6% amb el mètode de referència [202], fet que indica que no es tracta d'una metodologia fiable. El sistema MicroScan presenta baixa sensibilitat i tampoc es recomana per a la detecció de resistències a polimixines [203].

Així doncs, en forma de resum, en l'actualitat, després d'una reunió conjunta, la CLSI i la EUCAST [194] només recomanen el mètode de BMD com a vàlid per a determinar la susceptibilitat a la colistina i, els mètodes Etest i TREK Sensititre només s'indiquen per a tasques d'investigació però no per al seu ús en diagnòstic de rutina [192].

Tal i com s'acaba d'exposar en la present introducció, *S. maltophilia* és un patogen nosocomial de consideració important intrínsecament resistent a diferents antibiòtics i, recentment, la colistina s'està considerant com una opció terapèutica en el cas de soques MDR. Com a conseqüència de la problemàtica en la determinació a la susceptibilitat a aquest antibiòtic, el desconeixement dels seus determinants genètics de resistència, i a la possible presència de diferents fenotips de resistència associats, en el següent apartat s'exposaran els objectius d'aquesta tesi.



OBJECTIUS

El millor científic està obert a l'experiència i aquesta comença com un enamorament, és a dir, amb la idea que tot és possible.

Ray Bradbury (1920-2012)

2. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest treball és l'estudi dels mecanismes de resistència a antibiòtics a *Stenotrophomonas maltophilia*. Aquest objectiu s'aborda amb un anàlisi tant fenotípic com genotípic de diferents aïllats clínics i s'aprofundeix amb l'estudi de la resistència a colistina i els possibles determinants genètics implicats.

Els objectius específics i tasques experimentals per a complir-los són:

1. Identificació de fenotips de resistència d'aïllats clínics
 - 1.1. Definir un panel de soques clíniques que incloguin dades genotípiques.
 - 1.2. Caracteritzar fenotípicament els diferents aïllats clínics:
 - 1.2.1. Determinar el perfil de resistència a antibiòtics, formació de biofilm i virulència *in vivo* amb *Caenorhabditis elegans* com a model.
 - 1.3. Determinar la correlació entre dades fenotípiques i genotípiques.
 - 1.4. Seleccionar soques representatives amb fenotips de resistència a colistina.
2. Estudis fenotípics associats a la resistència heterogènia a la colistina en soques representatives
 - 2.1. Estudiar la problemàtica en la interpretació de la susceptibilitat a la colistina pels mètodes recomanats.
 - 2.2. Estudiar els fenòmens d'heteroresistència i resistència adaptativa enfront a colistina.
3. Estudi de determinants genètics associats a la resistència a colistina
 - 3.1. Identificar el resistoma predit a colistina basat en mecanismes ja descrits en altres espècies.
 - 3.2. Identificar l'homòleg dels gens *mcr* en *S. maltophilia*. Obtenció i anàlisi fenotípic de mutants per aquest gen.
 - 3.3. Estudiar el sistema de dos components ParR/ParS. Obtenció i anàlisi fenotípic de mutants deficients.
 - 3.4. Estudiar el sistema de la bomba d'expulsió SmeGH (família RND). Obtenció i anàlisi fenotípic de mutants deficients.



MATERIALS I MÈTODES

La ciència es compon d'errors que, a la vegada, són les passes cap a la veritat.

Julio Verne (1828-1905)

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1. Soques bacterianes, condicions de creixement i solucions estoc

3.1.1. Soques bacterianes

3.1.1.1. *Stenotrophomonas maltophilia*

La caracterització fenotípica i genotípica d'aquest treball s'ha basat inicialment en 78 soques clíniques de *S. maltophilia* aïllades de diferents hospitals europeus. Les identitats d'aquestes soques han estat confirmades per MALDI-TOF (desorció/ionització mitjançant làser assistida per matriu- MALDI, acoblada a un analitzador TOF – temps de vol-) i, llevat que s'indiqui el contrari, procedeixen del projecte SATURN (Impact of Specific Antibiotic Therapies on the prevalence of hUman host resistaNt bacteria) i van ser facilitades gentilmente per Jordi Vila i Ignasi Roca de l'Hospital Clínic de Barcelona i IDIBAPS.

Juntament, les soques K279a, D457 i ATCC 13637 s'han inclòs en aquest estudi com a referència. Les soques K279a i D457 han estat cedides pel Dr. J. Maxwell Dow i Dr. José L. Martínez, respectivament, i la soca ATCC 13637 ha estat comprada a la ATCC. Les procedències de totes les soques utilitzades en aquest treball s'exposen a la Taula 4.

Taula 4. Llistat de les soques de *S. maltophilia* utilitzades en aquest treball.

Soca	any aïllament	País	Hospital	Font
ATCC13637	1958	EUA	Col·lecció ATCC	Exsudat faringi
M30	2009	Espanya	Hospital Municipal Badalona	Úlcera de decúbit
K279 a	1998	Regne Unit	Unitat d'Oncologia de Bristol	Infecció a la sang
UV74	2009	Espanya	Hospital Municipal de Badalona	Úlcera vascular
E77	2009	Espanya	Hospital Municipal de Badalona	Esput
E50	2009	Espanya	Hospital Municipal de Badalona	Esput
L9-5R5	1999	Espanya	Hospital Clínic de Barcelona	[204]
B285-CT11	2011	Espanya	Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona	Broncoaspirat
S289-CT11	2011	Espanya	Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona	Esput
P626-CT11	2004	Espanya	Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona	Exsudat faringi
P815-CT11	2005	Espanya	Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona	Exsudat faringi
S3149-CT11	2007	Espanya	Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona	Exsudat ferida operatòria
4834-R	1999	Espanya	Hospital Clínic de Barcelona	[205]
EV5520-CT11	2011	Espanya	Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona	Control ambiental

3. Materials i mètodes

Continuació Taula 4.

Soca	any aïllament	País	Hospital	Font
B5565-CT11	2011	Espanya	Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona	Broncoaspirat
S5720-CT11	2011	Espanya	Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona	Esput
H5726-CT11	2011	Espanya	Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona	Broncoaspirat
B5742-CT11	2011	Espanya	Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona	Broncoaspirat
OL11-SI13	2011	Eslovènia	Centre Mèdic Universitari de Ljubljana	Exsudat faringi
PL12-SI13	2011	Eslovènia	Centre Mèdic Universitari de Ljubljana	Perineu
OL13-SI13	2011	Eslovènia	Centre Mèdic Universitari de Ljubljana	Exsudat faringi
OL16-SI13	2011	Eslovènia	Centre Mèdic Universitari de Ljubljana	Exsudat faringi
PL20-SI13	2011	Eslovènia	Centre Mèdic Universitari de Ljubljana	Perineu
OR41-FR13	2012	França	Hospital Universitari Raymond Poincare, Garches	Exsudat faringi
PR45-FR13	2012	França	Hospital Universitari Raymond Poincare, Garches	Perineu
PR59-FR13	2012	França	Hospital Universitari Raymond Poincare, Garches	Perineu
OR79-FR13	2012	França	Hospital Universitari Raymond Poincare, Garches	Exsudat faringi
OS87FR13	2012	França	Hospital St Joseph, Paris	Exsudat faringi
OS91FR13	2012	França	Hospital St Joseph, Paris	Exsudat faringi
PU100-BE13	2012	Bèlgica	Universitat d'Anvers	Perineu
PU101-BE13	2012	Bèlgica	Universitat d'Anvers	Perineu
PU102-BE13	2012	Bèlgica	Universitat d'Anvers	Exsudat faringi
PU109-BE13	2012	Bèlgica	Universitat d'Anvers	Perineu
OU110-BE13	2012	Bèlgica	Universitat d'Anvers	Exsudat faringi
OU111-BE13	2012	Bèlgica	Universitat d'Anvers	Exsudat faringi
PU126-BE13	2012	Bèlgica	Universitat d'Anvers	Perineu
PU140-BE13	2012	Bèlgica	Universitat d'Anvers	Perineu
OU141-BE13	2012	Bèlgica	Universitat d'Anvers	Exsudat faringi
OU148-BE13	2012	Bèlgica	Universitat d'Anvers	Exsudat faringi
OU152-BE13	2012	Bèlgica	Universitat d'Anvers	Exsudat faringi
PU153-BE13	2012	Bèlgica	Universitat d'Anvers	Perineu
OG156-SI13	2012	Eslovènia	Clínica Universitària de malalties respiratòries i al·lèrgiques, Golnik	Exsudat faringi
PG157-SI13	2012	Eslovènia	Clínica Universitària de malalties respiratòries i al·lèrgiques, Golnik	Perineu
PC184-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC185-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC186-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC187-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
OC194-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Exsudat faringi
OC195-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Exsudat faringi
OC196-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Exsudat faringi
OC197-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Exsudat faringi

Continuació Taula 4.

Soca	any aïllament	País	Hospital	Font
PC226-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC227-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC228-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC229-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC230-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC231-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC232-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC237-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC238-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC239-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC240-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC245-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC246-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC254-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC255-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC256-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC257-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC271-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC272-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC273-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC274-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC312-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC313-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC314-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
PC315-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Perineu
OC322-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Exsudat faringi
OC323-DE13	2012	Alemanya	Charite Clinic, Berlin	Exsudat faringi
OU343-BE13	2012	Bèlgica	Universitat d'Anvers	Exsudat faringi
OU353-BE13	2012	Bèlgica	Universitat d'Anvers	Exsudat faringi
D457	1992	Espanya	Hospital de Mostoles, Madrid	Broncoaspirat

3.1.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Per tal de dur a terme una selecció inicial de les possibles dianes involucrades en la resistència a colistina, es van adquirir mutants de *P. aeruginosa* MPAO1 procedents de la llibreria de mutants de la Universitat de Washington [206]. Els mutants seleccionats per aquest estudi es detallen a la Taula A1 de l'annex.

3.1.1.3. *Escherichia coli*

Les soques d'*E. coli* d'aquest treball han estat, principalment, utilitzades per a la construcció dels mutants en *S. maltophilia* o bé per als assajos de virulència amb *C. elegans*. Aquestes soques i característiques moleculars de les mateixes es detallen a la Taula 5.

Taula 5. Soques d'*E. coli* utilitzades en aquest treball.

Soca	Característiques/Genotip	Ús	Font o referència
DH5 α	<i>fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Clonatge	Col·lecció laboratori
SY327	F ⁻ <i>araD Δ(lac-proAB) argE(Am) rif nalA recA56</i>	Clonatge	[207]
Op50	Ura ^r , per tant, la seva auxotròfia (uracil) limita el creixement de <i>C.elegans</i> en plaques NGM.	Font d'aliment estàndard de <i>C.elegans</i>	CGC ^a

^aCaenorhabditis Genetics Center

3.1.2. Condicions de creixement

Els cultius de les diferents soques de *S. maltophilia*, *P.aeruginosa* i *E. coli* s'han realitzat de manera general en medi LB i han estat incubats a 30°C o 37°C, amb agitació (200 rpm) en el cas dels medis líquids.

Per a determinar la susceptibilitat als antibiòtics, les soques han estat sembrades en medi Mueller-Hinton amb o sense la concentració de cations ajustada (Apartat 3.3.1.1). En general, es parteix d'un cultiu *overnight*, el qual s'ajusta a una D₀₅₅₀ de 0,1 mitjançant un espectròmetre.

3.1.3. Condicions de conservació i manteniment

Les soques de *S. maltophilia*, *P. aeruginosa* i *E. coli*, de manera rutinària, han estat conservades mitjançant la tècnica de la crioconservació.

Per una banda, en el cas de les soques de *S. maltophilia* i *E. coli* s'han realitzat glicerinars barrejant 1125 μ L del cultiu de nit saturat amb 750 μ L de glicerol estèril al 50%, obtenint una concentració final del 20% v/v de glicerol. Seguidament, s'han congelat a -80°C de forma esglaonada (30 min a temperatura ambient, dues hores a 4°C i dues hores a -20°C). En el cas de les *P. aeruginosa*, s'han preparat criovials amb el 5% de dimetil sulfòxid (DMSO) conservant-se a -80°C o bé, aquesta espècie també pot ser conservada en aigua a 4°C.

Per altra banda, una altra metodologia emprada per a la crioconservació de les soques ha estat la utilització de llet descremada. S'aliquoten 1,5 mL de llet descremada al 20% a cada criovial, s'afegeix el raspall del cultiu procedent d'una placa de LB i s'agita vigorosament. Seguidament, es congelen a -80°C de manera esglaonada.

3.1.4. Medis de cultiu

- Medi LB (Luria Bertani) agar

Per a la preparació d'un litre de medi, es pesen 10 g de triptona, 5 g d'extracte de llevat, 10 g de NaCl i 17 g d'agar. Seguidament, s'afegeix 1 L d'aigua destil·lada i s'esterilitza a l'autoclau durant 15 minuts a 121°C. Un cop acabat el cicle d'autoclau, es deixa refredar i si cal, s'afegeix l'antibiòtic corresponent en funció de cada soca i assaig. A continuació, es dispensa el medi en plaques de petri i un cop solidificades s'emmagatzemen a 4°C. En el cas de preparar medi líquid

no s'addiciona agar. Quan era necessari, s'ha suplementat el medi amb els antibiòtics llistats a la Taula 6 o amb 5% de sacarosa.

- Medi MHA (Mueller-Hinton Agar)

Al llarg d'aquest treball s'ha utilitzat el medi Mueller-Hinton agar deshidratat de la casa comercial OXOID® (medi amb referència CM0337).

Segons les instruccions del fabricant, per 1 L d'aigua destil·lada s'han de pesar 38 g del medi deshidratat preparat comercialment i portar-los a ebullició fins a tenir una dissolució completa. A continuació, s'ha de procedir a l'esterilització mitjançant un cicle d'autoclau de 15 minuts a 121°C i, finalment, es plaqueja en condicions estèrils.

- Medi MHB (Mueller-Hinton Broth)

El caldo de cultiu Mueller-Hinton utilitzat en aquest treball és un preparat deshidratat de la casa comercial OXOID® (medi amb referència CM0405). Segons les instruccions del fabricant, s'han de pesar 21g del medi deshidratat i dissoldre'ls completament en 1 L d'aigua destil·lada. Seguidament, el medi s'autoclava durant 15 minuts a 121°C.

- Medi CAMHB (Cation-Adjusted Mueller-Hinton Broth)

Per tal de dur a terme estudis de susceptibilitat d'antibiòtics, determinar la CMI i assegurar la seva reproductibilitat, és necessari ajustar la concentració dels cations divalents Ca^{2+} i Mg^{2+} després de l'esterilització. La CLSI recomana que els nivells de cations siguin entre 20 i 25 mg/L de Ca^{2+} i entre 10 i 12,5 mg/L de Mg^{2+} . El medi MHB OXOID® (referència CM0405) conté 3,402 mg/L de Ca^{2+} i 3,791 mg/L de Mg^{2+} ; per la qual cosa, un cop acabat el cicle d'esterilització s'han d'afegir 2,16 mL de l'estoc de Ca^{2+} i 0,87 mL de l'estoc de Mg^{2+} per cada litre de medi preparat.

La preparació dels estocs de Ca^{2+} i Mg^{2+} es detalla en l'apartat 3.1.6.

- Medi SOB (Super Optimised Broth)

El medi SOB (Super Optimised Broth) és un medi ric que s'utilitza durant les transformacions per ajudar a les cèl·lules competents a recuperar-se i, en conseqüència, afavorir les condicions de creixement per tal de millorar l'eficàcia de la transformació.

Per a la preparació d'un litre de medi, es pesen 20 g de triptona, 5 g d'extracte de llevat, 0,5 g de NaCl i 17 g d'agar i es amb 990 mL d'aigua destil·lada. A continuació, s'addicionen 2,5 mL de KCl 1M i s'ajusta el pH a 7 amb NaOH 10M. Finalment, després de l'esterilització amb l'autoclau (15 min, 121°C), s'addicionen 10 mL de MgCl_2 estèril.

- Medi NGM (Nematode Growth Media)

El medi de creixement i manteniment dels nematodes *Caenorhabditis elegans* utilitzat en aquest treball ha estat el NGM. Per a la preparació d'un litre d'aquest medi, s'autoclaven 3 g de NaCl, 2,5 g de peptona i 17 g d'agar dissolts en 972 mL d'aigua destil·lada. Una vegada la solució s'ha refredat fins a una temperatura de 55°C, mantenint les condicions d'esterilitat, s'afegeixen 25 mL de tampó de fosfat de potassi (1M, pH 6), 1 mL de MgSO_4 (1M), 1 mL de CaCl_2 (1M) i 1 mL de

colesterol (Sigma-Aldrich) (5mg/mL en etanol al 100%). Seguidament, s'agita la solució i es plaqueja en condicions estèrils.

El tampó de fosfat de potassi que s'utilitza en la preparació d'aquest medi, s'obté pesant 108,3 g de KH_2PO_4 i 35,6 g de K_2HPO_4 i es dissolen en 1 litre d'aigua desionitzada. Posteriorment, s'esterilitza mitjançant la filtració.

3.1.5. Antibiòtics

A la Taula 6 s'exposa la concentració dels antibiòtics utilitzats durant la generació de soques mutants o transformades amb plasmidis. És aconsellable preparar solucions estoc 1000X, és a dir, 1000 vegades concentrat, les quals s'esterilitzen mitjançant filtració amb filtres de 0,22µm i es conserven a -20°C fins a la seva utilització. A partir de les solucions estoc, es preparen les solucions de treball a 100X, les quals es conserven a 4°C.

Taula 6. Concentracions dels antibiòtics utilitzats.

Antibiòtic	Dissolvent solució estoc	Concentració final (µg/mL)	
		<i>E. coli</i>	<i>S. maltophilia</i>
Cloramfenicol	Etanol 95%	30	60
Tetraciclina	Etanol 70%	20	60
Kanamicina	Aigua	40	-
Gentamicina	Aigua	50	-
Norfloxacina	Aigua més un mínim volum de NaOH 1M per a dissoldre's	-	5
Rifampicina	Metanol	-	250

3.1.6. Altres solucions

- Solucions estoc de cations

En primer lloc, s'han de preparar les dues solucions:

- Solució estoc de calci: es dissolen 3,68g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL d'aigua desionitzada. Aquesta solució conté 10 mg de Ca^{2+} /mL.
- Solució estoc de magnesi: es dissolen 8,36g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL d'aigua desionitzada. Aquesta solució conté 10 mg de Mg^{2+} /mL.

Seguidament, les dues solucions s'esterilitzen mitjançant la filtració i es guarden a una temperatura entre 2 i 8°C fins a la seva utilització.

- Resazurina

La resazurina és un indicador redox que canvia de color blau (estat oxidat) a color rosa quan està en un ambient reductor. En aquest treball s'ha utilitzat la resazurina en el revelat de les plaques de 96 pouets per a determinar la CMI de les soques analitzades (veure apartat 3.3.1.1).

La solució estoc de resazurina preparada en aquest treball és al 0.1%, la qual s'obté pensant 0,01 g de sal de sodi de resazurina (Sigma-aldrich) i dissolent-los en 10 mL d'aigua desionitzada. Seguidament, s'esterilitza mitjançant la filtració amb filtres de 0,22 µm de diàmetre i s'aliquota en endendorf de 1,5 mL. Aquestes alíquotes es poden conservar a -20°C fins al seu ús. La solució de treball utilitzada és al 0,01%.

3.2. Caracterització genotípica dels aïllats de *S. maltophilia*

La tècnica molecular utilitzada per diferenciar genotípicament entre les 81 soques de *S. maltophilia* analitzades al llarg d'aquest treball ha estat la tècnica de seqüenciació MLST (MultiLocus Sequence Typing) [208]. Els gens housekeeping utilitzats per *S. maltophilia* són *atpD*, *gapA*, *guaA*, *mutA*, *nuoD*, *ppsA* i *recA*. La seqüència de cada al·lel i el "perfil al·lèlic" ("Sequence type" o ST) de cada aïllat s'han obtingut de la base de dades MLST de *S. maltophilia* (<http://pubmlst.org/smaltophilia/>). Les seqüències obtingudes de cada soca han estat dipositades en la base de dades anteriorment esmentada per part del nostre grup de recerca, formant part del treball d'un estudiant de grau.

A més d'obtenir el perfil MLST, la caracterització genotípica en aquest treball també s'ha basat en la seqüència del gen *rpfF* per tal de classificar els nostres aïllats en les dues variants d'aquest gen, la variant *rpfF-1* i la variant *rpfF-2* [101].

3.3. Proves fenotípiques per a *S. maltophilia*

3.3.1. Susceptibilitat a antibiòtics

S'ha avaluat la susceptibilitat dels diferents aïllats clínics contra set antibiòtics amb activitat *in vitro* demostrada per aquesta espècie [21], [56], [209] i/o d'ús clínic terapèutic. Els antibiòtics utilitzats i els seus punts de tall clínics segons EUCAST s'exposen a la Taula 7. Val a dir que per *S. maltophilia* la EUCAST només aporta els valors per TMP/SMX i, és per aquest motiu, que la classificació de susceptibilitat de les soques enfront als altres antibiòtics s'ha dut a terme seguint els criteris proposats per *Pseudomonas* spp., llevat del cas de la minociclina, la qual s'han seguit els criteris descrits per la CLSI [150], [151].

Per determinar la CMI de cada soca enfront als sets antibiòtics, s'ha utilitzat inicialment el mètode de les tires comercials E-test (Biomerieux, Madrid, Espanya).

Etest® és un gradient predefinit i estable de 15 concentracions antimicrobianes sobre una tira de plàstic. Seguint les instruccions del fabricant, la metodologia consisteix en dipositar una tira sobre una placa de Mueller-Hinton (MH) de gomm inoculada amb una suspensió McFarland de 0,5 de la soca a avaluar. Seguidament, s'incuba a 37°C durant 18 hores. Després de la incubació, apareix una el·lipse que tallarà l'escala de lectura CMI (en µg/mL) on la concentració de l'antibiòtic provat inhibeix el creixement del microorganisme. Aquesta lectura de la CMI s'ha de dur a terme amb molta cura tot seguint la guia de lectura facilitada per la casa comercial Biomerieux. Així doncs, per exemple, es recomana que si la interfase cau entre dos punts,

s'esculli la concentració més alta. També és molt important observar si hi ha presència de petites colònies en la zona de baix creixement, fet que pot indicar l'existència de diferents tipus de resistència.

Un cop determinat el valor de la CMI, els resultats de les proves de susceptibilitat s'han interpretat seguint els valors de susceptibilitat i resistència descrits en la Taula 7.

Taula 7. Punts de tall dels antibiòtics avaluats en la susceptibilitat antibiòtica en *S. maltophilia*.

Antibiòtic	Classe	Punts de tall ($\mu\text{g/mL}$)	
		S \leq	R>
Ceftazidima	Cefalosporines de quarta generació	8	8
Minociclina	Derivats de la tetraciclina	4	16
Levofloxacina	Fluoroquinolones	1	1
TMP/SMX	Sulfonamides	4	4
Amikacina	Aminoglicòsids	8	16
Ticarcil·lina-clavulànic	Penicil·lines	16	16
Colistina	Polimixines	2	2

S: Susceptible; R: Resistent.

Els aïllats que presenten un antibiograma amb un fenotip intermedi es consideren resistents (no susceptibles) i aquells aïllats que són resistents en almenys un agent en tres o més categories antimicrobianes es classifiquen com a MDR [210].

3.3.1.1. Estudis de susceptibilitat i fenotips de resistència a la colistina

Al llarg d'aquest treball s'ha aprofundit en l'estudi de la resistència a la colistina. Així doncs, a més a més del mètode Etest, la CMI de la colistina també s'ha determinat mitjançant el mètode de la microdilució. Altrament, també s'han estudiat fenòmens de resistència adaptativa i heteroresistència.

- BMD (Broth microdilution method)

El BMD es basa en la determinació del creixement del microorganisme en presència de concentracions creixents de l'antimicrobià que es troba dissolt en el medi de cultiu. Així doncs, de manera resumida, aquest mètode es basa en la preparació d'una placa amb caldo de cultiu en el qual s'hi afegeix l'antibiòtic a diferents concentracions. En la majoria de casos, es preparen dilucions de l'antimicrobià en progressió geomètrica en base dos. Posteriorment, s'inocula la placa amb una suspensió estandarditzada del microorganisme en estudi i, un cop transcorregut el temps d'incubació pertinent (normalment *overnight* a $35 \pm 2^\circ\text{C}$), es realitza la lectura per determinar la CMI de l'antimicrobià enfront al microorganisme assajat.

El procediment dut a terme al llarg d'aquest treball s'ha basat en les metodologies i les recomanacions conjuntes de CLSI i EUCAST per a la colistina [193], [194].

1. Preparació de l'antimicrobià

És recomanable preparar els antibiòtics a una concentració 10 vegades més concentrada que la concentració més alta que es vulgui avaluar o bé superiors als 1000 µg/mL. En el nostre cas, com que la concentració més alta avaluada és de 256 µg/mL, es pesa la quantitat necessària de l'antibiòtic per fer un estoc de 4X i es dissolt en el dissolvent corresponent segons cada antibiòtic. Seguidament, es guarda a 4°C fins a la seva utilització. No és necessari esterilitzar la solució d'antimicrobià perquè la seva contaminació és molt infreqüent; no obstant, si es desitja, la solució pot ser esterilitzada per filtració a través de membranes. El sulfat de colistina utilitzat en aquest treball és de la casa comercial Apollo Scientific Ltd i el número de lot el AS405305.

2. Muntatge de la placa

El caldo Mueller-Hinton és el medi recomanat per a les proves de sensibilitat de patògens aeròbics o facultatius de creixement ràpid. El medi ha de tenir un pH de 7,2 a 7,4 i ha d'estar ajustat amb Ca²⁺ i Mg²⁺, esdevenint-se el medi CAMHB. En el mètode de microdilució s'utilitzen plaques de microtitulació estèrils, amb tapa i de 96 pouets.

El primer pas per a procedir al muntatge d'una CMI és col·locar 100 µL de medi de cultiu en cada un dels pous de la placa. Seguidament, s'afegeixen 100 µL de la solució mare de l'antibiòtic als pouets de la primera columna i es duen a terme les dilucions dobles seriades mitjançant una pipeta multicanal. La columna 1 serà el control negatiu, la qual contindrà medi de cultiu i antibiòtic i la columna 12 serà el control positiu que contindrà el medi de cultiu més l'inòcul bacterià. A continuació, a partir d'un cultiu *overnight* en CAMHB, es prepara l'inòcul de la soca a avaluar a una concentració DO₅₅₀ de 0,05 en CAMHB i s'addicionen 100 µL d'aquest inòcul a tots els pouets de la placa llevat dels de la columna 1, la qual serà el control negatiu. Finalment, la placa es tapa per evitar l'evaporació del medi de cultiu i s'incuba a 37°C durant 16 a 20 hores.

3. Revelat i lectura dels resultats

La CMI es defineix com la menor concentració d'antimicrobià que a simple vista inhibeix completament el creixement del microorganisme estudiat. La interpretació dels resultats, que a vegades resulta complexa, es facilita agafant com a referència el creixement observat en els pouets utilitzats com a control positiu (columna 12) o bé fent el revelat amb resazurina [211]. La resazurina és un indicador redox que esdevé de color rosa quan hi ha metabolisme cel·lular actiu i, com a conseqüència, viabilitat de la soca.

Així doncs, s'addicionen 30 µL de resazurina al 0,01% a tots els pouets de la placa i s'incuba uns 15 minuts a 37°C fins que el control positiu esdevé de color rosa. Seguidament, es dur a terme la interpretació dels resultats, on la CMI queda determinada per l'últim pouet que no hi ha creixement i per tant, no hi ha hagut canvi de color (es manté de color blau), considerant-se positius aquells pouets que han virat a rosa-morat. La CMI, doncs, serà la concentració de l'últim pouet en el qual no hi ha creixement.

A més a més de la determinació visual de la CMI amb el revelat de resazurina, prèviament al revelat, es mesura la densitat òptica (DO) de cada pouet, considerant-se com a CMI la concentració més baixa capaç d'inhibir el 80% del creixement comparat amb el control [210]. L'aparell utilitzat per la quantificació de l'absorbància ha estat el VictorV31420 multilabel counter Wallac amb programari wallac 1420 workstation.

A més a més de la terminació de la DO, també es dur a terme el recompte de la viabilitat bacteriana de cada pouet mitjançant el recompte de viables per banc de dilució.

- Corbes de creixement

Durant la realització d'aquest treball, s'han realitzat diferents corbes de creixement per tal de determinar el fenomen de la resistència adaptativa, analitzant les corbes de creixement dels aïllats seleccionats després d'una preincubació amb colistina.

El dia 1 de l'experiment, s'inoculen les soques a avaluar en dues ampolles que contenen 10 mL de CAMHB. En una de les ampolles s'afegeix una concentració subinhibitòria de colistina (aquesta concentració dependrà de la CMI de cada soca) i l'altra es manté sense antibiòtic. Aquests cultius s'incuben a 37°C en agitació. El dia següent, a partir dels cultius de nit, s'inicien nous cultius amb una DO_{550} de 0,01 i a cada un d'ells se'ls hi afegeix una concentració inhibitòria de colistina. També hi haurà cultius que seran els controls positius de creixement on no s'hi afegeix l'antibiòtic. Un cop tenim els diferents cultius preparats, s'incuben a 37°C amb agitació i a les 0, 2, 4, 6, 8 i 24 hores s'extreu una alíquota d'1 mL per tal d'avaluar el creixement bacterià mitjançant la determinació de la densitat òptica a una absorptància de 550 nm. Aquest assaig s'ha realitzat en dos experiments independents i amb un mínim de dues rèpliques.

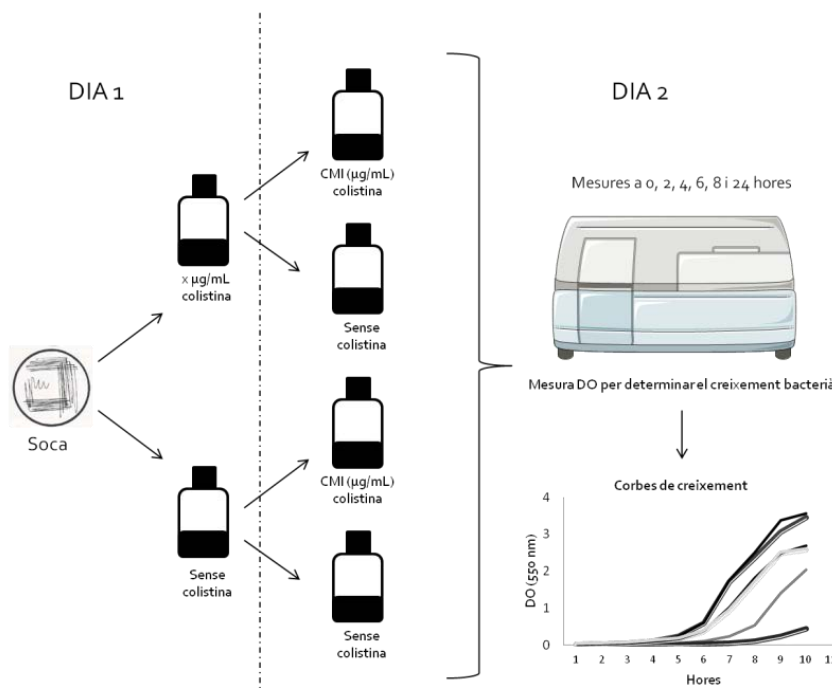


Figura 7. Esquema del disseny experimental per a l'estudi de la resistència adaptativa.

- Heteroresistència

L'estudi de l'heteroresistència s'ha dut a terme mitjançant el perfil d'anàlisi poblacional. L'assaig PAP s'ha realitzat seguint el protocol descrit anteriorment per Li i col·laboradors [212] amb algunes modificacions. Breument, l'assaig consisteix en preparar, en primer lloc, plaques de Mueller-Hinton amb diferents concentracions de colistina (0, 4, 8, 16, 32, 64, 96, 128 i 256 µg/mL). Seguidament, a partir d'un cultiu en CAMHB d'una concentració aproximada de 10^8 UFC/mL de la soca a avaluar, es realitza un banc de dilucions i 10 µL de cada dilució s'inoculen a les plaques amb diferents concentracions d'antibiòtic. Després de 24 hores a 37°C, es dur a terme el recompte de colònies. Per tal de determinar l'heteroresistència es segueix el criteri suggerit per El-Halfawy i Valvano [180], els quals consideren que una soca és heteroresistent si la concentració de l'antibiòtic en l'assaig PAP on no creix cap colònia és almenys vuit vegades superior a la concentració més alta d'antibiòtic que no inhibeix el creixement.

Finalment, les colònies que han crescut a les plaques amb la màxima concentració d'antibiòtic, es piquen i es cultiven en un LB sense antibiòtic fent passos successius durant tres dies i, un cop transcorreguts aquests subcultius, es realitza una CMI per microdilució en CAMHB tal i com s'ha descrit anteriorment per determinar si la resistència s'ha mantingut o es tracta d'una resistència transitòria.

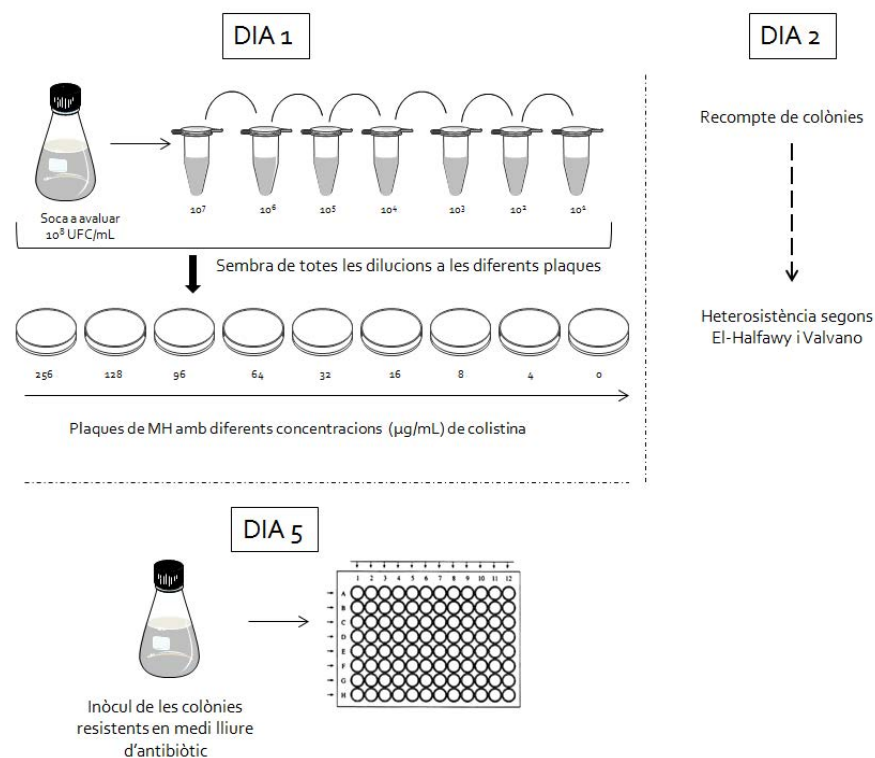


Figura 8. Esquema del disseny experimental per a l'estudi de l'heteroresistència.

3.3.2. Formació de biofilms

S'han realitzat els assajos de formació de biofilms utilitzant plaques comercials de microtitulació de poliestirè de 96 pouets de fons pla i no tractades (BrandTech 781662) fent el revelat amb cristall violeta (CV), seguint el mètode descrit prèviament per Huedo *et al.* [101]. L'aparell utilitzat per a la quantificació de l'absorbància de la placa de 96 pouets ha estat el VictorV31420 multilabel counter Wallac amb programari wallac 1420 workstation.

Per tal d'iniciar l'assaig, es fan créixer les soques a avaluar en medi LB a 30°C en cultius de nit i en agitació. El dia següent, 200 µL de l'inòcul ajustat a una OD₅₅₀ de 0,1 de la soca a testar es dipositen en cadascun dels pouets i s'incuba durant 24 hores a 30°C. Transcorregut el període d'incubació, en primer lloc, és necessari mesurar a 620 nm la densitat òptica de cadascun dels pouets per tal de quantificar la biomassa cel·lular i, d'aquesta manera, normalitzar el creixement de cada soca respecte l'absorbància obtinguda de la tinció amb CV. Un cop dut a terme aquesta mesura, es retira el medi i s'eliminen les cèl·lules no adherides amb una sèrie de tres rentats amb aigua destil·lada. Posteriorment, mitjançant una incubació aproximada d'una hora a 60°C es fixa i s'asseca el biofilm i, a continuació, es tenyeix cada pou durant 15 min amb 200 µL CV 0,1 % [wt/vol] (Sigma-Aldrich) a temperatura ambient. Seguidament, per tal de quantificar el biofilm format, en primer lloc s'ha d'eliminar l'excés de CV rentant la placa amb aigua destil·lada i es deixa assecar la placa durant 30 minuts a 37°C. Finalment, per a dissoldre el CV unit al biofilm format s'afegeixen a cada pou 200 µL d'etanol al 95% i es quantifica l'absorbància a 550 nm. Tal i com s'ha comentat anteriorment, els nivells de tinció de CV s'expressen en relació amb la densitat cel·lular (ràtio de creixement OD₅₅₀ CV / OD₆₂₀), expressant-se, doncs, el biofilm relatiu. S'han realitzat vuit rèpliques per a cada soca en tres experiments independents per a cada condició de cultiu estudiada.

Els aïllats clínics seran classificats en tres categories segons la seva capacitat de formar biofilm basat en la ràtio (OD₅₅₀ del CV)/(OD₆₂₀ del creixement cel·lular): dèbil (0 a 0,85), moderat (0,85 a 1,5) o fort (>1,5).

3.3.3. Determinació de la virulència en el model de *Caenorhabditis elegans*

Els protocols de creixement estàndard de *C. elegans* utilitzats en aquest treball, així com els protocols de congelació i neteja, estan descrits al capítol "Manteniment de *C. elegans*" en el WormBook (<http://www.wormbook.org/>).

3.3.3.1. Soques de *C. elegans* utilitzades

En funció de la naturalesa de l'assaig, al llarg d'aquest treball s'han utilitzat dues soques de *C. elegans* detallades a la Taula 8.

Taula 8. Soques de *C. elegans* utilitzades.

Soca	Característiques/Genotip	Comentaris
N2	Soca salvatge	Soca salvatge de Bristol
CF512	rff-3(b26) II; fem-1(hc17) IV	Creix a 16°C i és estèril a 25°C.

No obstant això, de manera rutinària, s'ha utilitzat la soca CF512 ja que és incapaç de produir descendència a 25°C, és a dir, a la temperatura utilitzada durant els experiments d'infecció.

Aquestes dues soques han estat cedides pel CGC. Aquest centre manté i distribueix la col·lecció de soques de *C. elegans* en la qual estan representats, almenys, un al·lel mutant de cada gen publicat i tots els reordenaments cromosòmics (deficiències, duplicacions, translocacions i inversions). També estan disponibles diferents aïllats de la soca salvatge i espècies properes a *C. elegans*.

3.3.3.2. Preparació de plaques amb *C. elegans* i el seu manteniment

En aquest treball, per al creixement i manteniment de *C. elegans* s'ha utilitzat el protocol en cultiu sòlid, el qual consisteix en sembrar els nematodes en plaques NGM tenint a la soca *E. coli* Op50 com a font d'aliment.

En primer lloc, s'han de preparar les plaques de manteniment inoculant uns 100µL de Op50 en plaques de petri amb medi NGM, un medi per al creixement de nematodes. Aquestes plaques inoculades amb Op50, s'incuben durant la nit a 37°C. A continuació, aquestes plaques ja poden ser utilitzades per a la sembra dels nematodes o bé, es poden emmagatzemar a 4°C durant un màxim de tres setmanes.

A partir d'una placa vella amb cucs o bé a partir d'un estoc glicerinat, es transfereixen els cucs a una placa nova de NGM amb Op50. Els estocs de *C. elegans* es poden mantenir entre 16°C i 25°C, tot i que en funció de la temperatura, el temps del cicle de vida del nematode és diferent.

3.3.3.3. Conservació i recuperació de *C. elegans*

Els nematodes *C. elegans* es poden conservar indefinidament en nitrogen líquid o bé emmagatzemar-se a -80°C en criovials. Per tal de dur a terme la conservació a -80°C, es necessiten plaques de NGM lliures de contaminació amb molts cucs de diferents estadis. Una placa òptima per la conservació s'aconsegueix després d'una setmana que s'hagi fet la transferència d'uns 20 nematodes adults joves en una placa nova de NGM i Op50 mantinguda a 16°C. Aquesta placa tindrà pocs cucs morts, gran quantitat de cucs en fase L1 i L2 (etapes larvàries inicials), cucs en fase adulta i ous.

Al moment de procedir amb la conservació, en primer lloc, s'han de rentar les plaques plenes de nematodes amb tampó S estèril (129 mL 0,05 M K_2HPO_4 , 871 mL 0,05 M KH_2PO_4 , 5,85 g NaCl) i es recullen dins de tubs d'assaig estèrils. Seguidament, s'afegeix un volum igual de tampó S estèril + 30% de glicerol i s'homogeneïtza. Finalment, s'aliquota 1 mL de la barreja a cada criovial etiquetat correctament i s'emmagatzemen a un congelador de -80°C.

Per tal de recuperar els nematodes, es retira el criovial del congelador de -80°C i es deixa descongelar progressivament a temperatura ambient. Un cop el contingut està en estat líquid, es pipeteja sobre una placa fresca de NGM amb Op50 i s'incuba a 16°C. Després d'uns 4 o 5 dies, els nematodes ja estaran a punt per a reproduir noves generacions.

3.3.3.4. Sincronització de *C. elegans*

El cicle de vida de *C. elegans* està format per l'etapa embrionària, quatre etapes larvàries (L1-L4) i l'edat adulta, que succeeix durant els primers 3 dies del cicle. En funció de la temperatura de creixement, en l'estat adult, el nematode és capaç de sobreviure uns 10-15 dies un cop finalitzada la seva etapa reproductiva que dura, aproximadament, 65 hores.

És possible sincronitzar els nematodes de *C. elegans* per tal que iniciïn el seu desenvolupament en un mateix estadi al mateix moment, de manera que es puguin obtenir poblacions uniformement desenvolupades en els seus estadis larvaris.

Per tal de dur a terme la sincronització, s'utilitza una solució hipoclorita alcalina que conté lleixiu i hidròxid de sodi (1 mL lleixiu i 0,5 mL NaOH 4N) per tal de matar els hermafrodites adults amb ous i dissoldre la seva cutícula. D'aquesta manera, els ous, que són resistents a la solució hipoclorita alcalina durant un temps determinat queden dispersos dins la solució. Seguidament, i no superant els dos minuts de contacte amb la solució hipoclorita alcalina, es procedeix al rentat dels ous amb aigua, medi M9 o medi NGM líquid. Un cop s'ha eliminat la solució hipoclorita alcalina, els ous es dipositen a una placa de NGM que conté Op50, s'incuba durant 3 dies a 16°C i, un cop transcorreguts aquests dies, els nematodes ja estan a punt per fer l'assaig corresponent.

3.3.3.5. Infecció de *C. elegans*

C. elegans s'utilitza com a model d'infecció en estudis de patogènesis en bacteris gram negatius.

Existeixen diferents assajos per a determinar la virulència, basats en la mort lenta, la mort ràpida o la paràlisi del nematode, però al llarg d'aquest treball el protocol utilitzat consisteix, principalment, en un assaig de mort lenta, descrit per Tan *et al.* [213]. La via de mort lenta requereix la ingestió dels bacteris vius i la presència d'un conjunt de diferents gens de virulència. Així doncs, les condicions de creixement del microorganisme a avaluar influenciaran en la producció de factors de virulència bacteriana i, per la qual cosa, el mecanisme de mort en *C. elegans*.

A continuació, es detallarà el protocol d'infecció de mort lenta emprat. El dia abans de la infecció, s'inoculen 10-50 µL de cultiu *overnight* de les soques a avaluar al centre de les plaques d'infecció, unes plaques de 55 mm de diàmetre i amb medi NGM. Es formarà un cercle d'uns 10 mm de diàmetre i s'incuben les plaques a 37°C durant 24h.

El dia següent, dia 0 de la infecció, aquestes plaques es deixen refredar a temperatura ambient fins al moment de la infecció. Per tal de dur a terme la infecció, es transfereixen, manualment, nematodes sincronitzats (en fase L4) a les plaques d'infecció. Per fer aquesta transferència és recomanable inocular una petita gota d'aigua amb gentamicina (50 mg/mL) fora del cercle bacterià, de manera que, amb un punxó es piquen els cucs de la placa de sincronització i es deixen caure dins la gota d'aigua amb antibiòtic. El líquid de la gota permetrà que el cuc surti fàcilment del punxó i la gentamicina mati les restes d'Op50 que el cuc porta de la placa de sincronització. Es dipositen uns 15-20 cucs per placa, realitzant tres plaques (tres rèpliques) per

a cada soca a avaluar. Aquestes plaques s'incuben a 25°C (temperatura en la qual la soca CF512 és estèril) durant tot l'assaig de virulència.

A partir d'aquest punt, cada dia s'observa el nombre de cucs que moren mitjançant un microscopi de dissecció, reportant el número de nematodes vius i morts cada dia. Es considera que el nematode està mort quan no es mou si el toques. Cal tenir en compte que l'esperança de vida dels nematodes N2 i CF512 tenint a la soca Op50 com a font d'aliment és entre 10 i 17 dies.

Un cop finalitzat l'assaig, mitjançant el software GraphPad Prism es determina la LT50 per a cada soca, és a dir, el temps necessari per matar el 50% de la població inicial de nematodes.

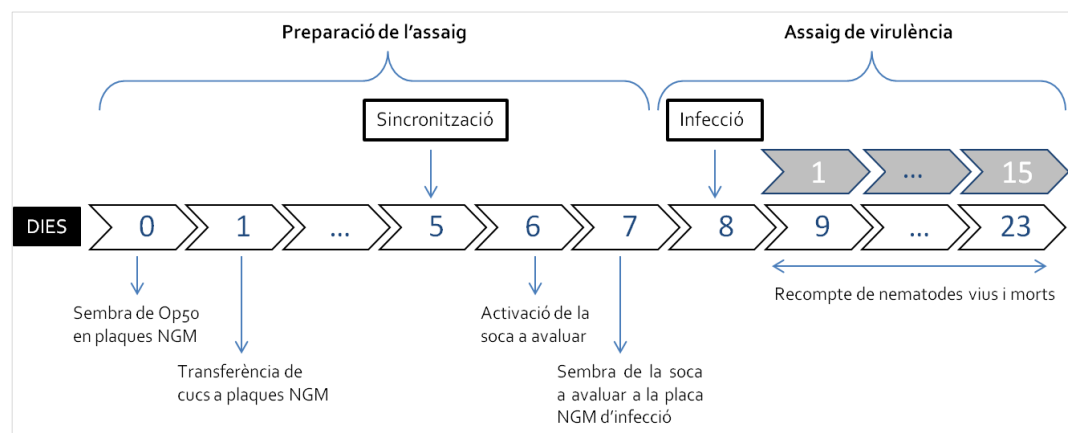


Figura 9. Diagrama de flux del protocol d'infecció en *C. elegans*.

3.4. Generació de mutants en *S. maltophilia*

El mètode per a la generació de mutants en *S. maltophilia* s'ha basat en el protocol publicat per Aubert *et al.* [207] per espècies gramnegatives multi-resistents. Es tracta d'una mutagènesi per delecció amb el sistema pGPI-Sce/pDAI-Scel-SacB basat en la endonucleasa I-SceI que genera soques mutants sense incorporar un gen de resistència ni cap altre tipus de marcador.

A continuació, s'exposa un esquema general (Figura 10) dels canvis genètics produïts durant el procés de conjugació del plasmidi suïcida de delecció pGPI-Scel-XcmBEBDSmltxxxx (xxxx fa referència al gen a mutar) i de la resolució dels cointegrats mitjançant el plasmidi pDAI-Scel-SacB. En l'esquema es representa la situació de voler mutar un gen de *S. maltophilia* denominat Smltxxxx mitjançant recombinació homòloga entre fragments de DNA idèntics a regions dels dos costats del gen, denominats braç esquerre (BE') i braç dret (BD'). En primer lloc, el plasmidi suïcida pGPI-Scel-XcmBEBDSmltxxxx s'introdueix a la soca de *S. maltophilia* salvatge per mitjà d'una conjugació triparental i es dur a terme una recombinació homòloga (primer encreuament) mitjançant els fragments BE' o BD' (en l'esquema de la Figura 10 només es mostra el resultat de la integració utilitzant el fragment BE'). Seguidament, s'introdueix el plasmidi pDAI-Scel-SacB, que expressa l'endonucleasa I-SceI. I-SceI produeix un tall en la doble cadena del DNA cromosòmic en el lloc únic I-SceI aportat pel plasmidi suïcida, fet que afavoreix una segona recombinació homòloga a l'estimular la maquinària de reparació del DNA de l'hoste. Un segon encreuament BD i BD' eliminarà la seqüència intermèdia entre aquests dos fragments, incloent el gen d'interès a mutar i la cadena principal del plasmidi pGPI-Scel-XcmBEBDSmltxxxx amb el

casset de resistència a cloramfenicol. Per al contrari, si té lloc un segon encreuament entre els fragments BE i BE', és a dir, entre els fragments involucrats en el primer encreuament, tindrà lloc la resolució del plasmidi de delecció i la reversió a la seqüència salvatge inicial. Finalment, un cop provat mitjançant PCR que els clons són mutants correctes, té lloc l'eliminació del segon plasmidi replicatiu (pDAI-Scel-SacB) mitjançant pressió selectiva amb sacarosa.

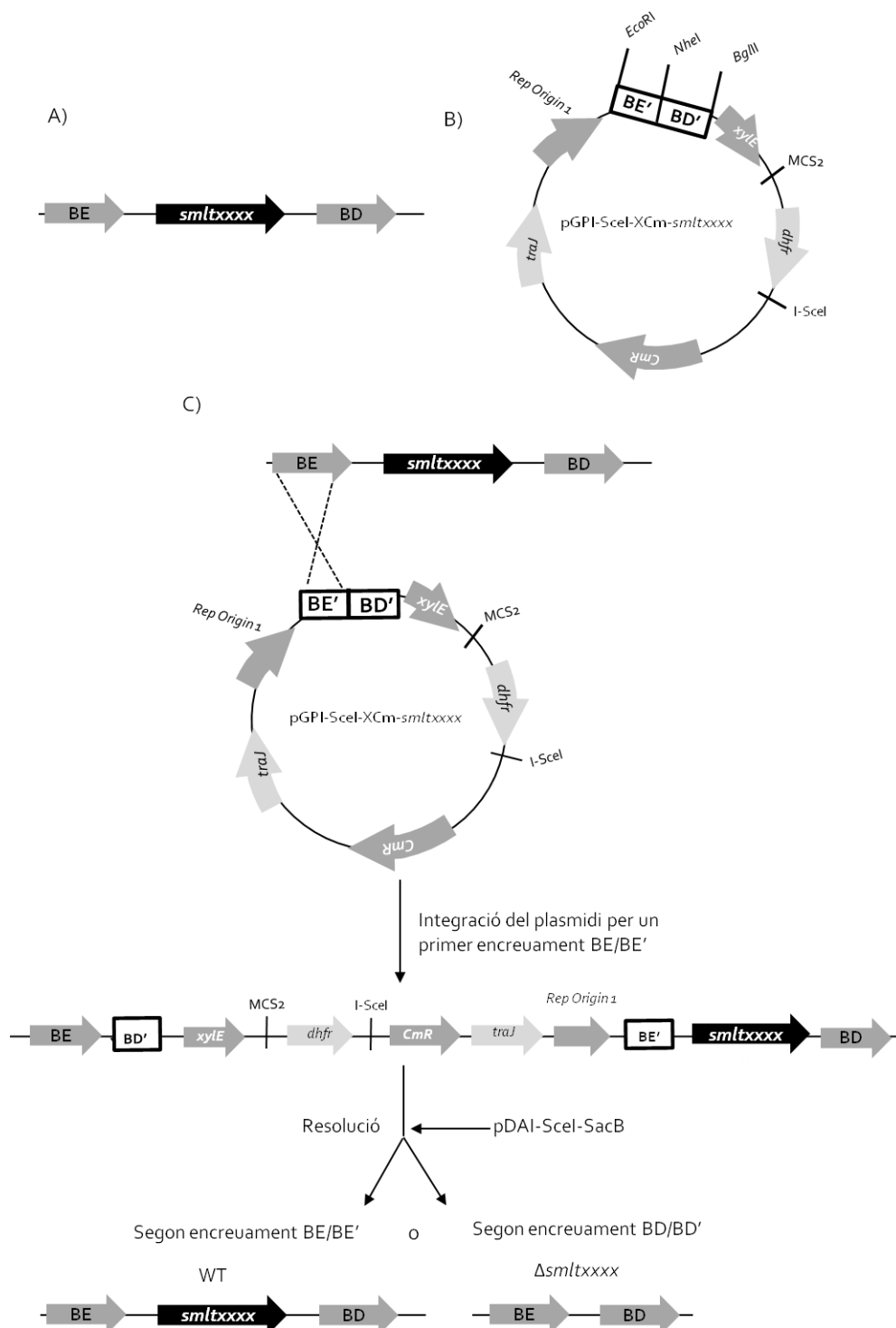


Figura 10 Esquema de l'estratègia d'obtenció de mutants per delecció utilitzant el sistema pGPI-Scel-Xcm/pDAI-Scel. **A)** Esquematització general de l'entorn genètic del gen d'interès en la soca salvatge de K279a. En la Figura 12 es detalla l'entorn genètic de cada un dels gens mutats en aquest treball. **B)** Plasmidi de delecció construït per a l'obtenció del mutant d'interès. **C)** Esquematització dels canvis genètics durant el procés de conjugació del plasmidi de delecció pGPI-Scel-XcmBEBDsmltxxxx i de la resolució dels cointegrats mitjançant el plasmidi pDAI-Scel-SacB.

3.4.1. Disseny de l'estratègia

En primer lloc, per cada una de les dianes a mutar, s'ha de dissenyar una sèrie d'oligonucleòtids que permetin la construcció de les eines de clonatge, la verificació dels clons obtinguts i la complementació posterior. Aquests oligonucleòtids, per als gens específics a mutar en aquest treball, es detallen a la posterior Taula 10 exposada, però a continuació, es mostra el disseny general de l'estratègia emprada (Figura 11).

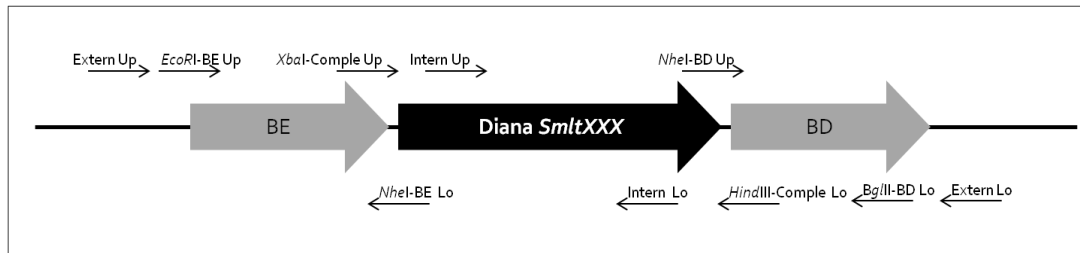


Figura 11. Esquematització del gen diana i els seus corresponents braços esquerre (BE) i dret (BD) especificant els oligonucleòtids (marcats amb una fletxa) utilitzats durant la mutagènesi i la comprovació dels mutants. En el cas dels oligonucleòtids utilitzats per a la construcció dels braços, en la figura surten representats els dissenys per *smlt3730*, *smlt2804* i *smlt3571* amb les seves corresponents dianes.

A continuació (Figura 12), per als gens específics a mutar en aquest treball, es presenta el disseny específic de cada una de les dianes a clonar, en les quals es dissenyen dos pac d'oligonucleòtids compatibles (Taula 10) que amplifiquin dos amplicons d'unes 300-700 pb flanquejants al gen d'interès que volem deletar, anomenats braç esquerre (BE) i braç dret (BD).

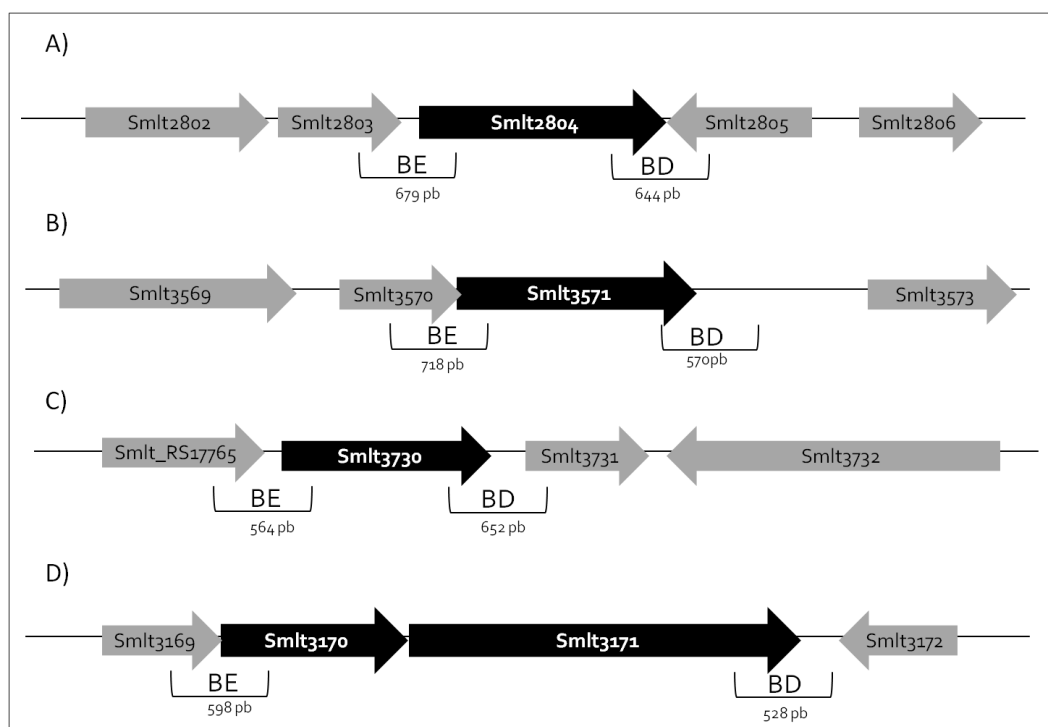


Figura 12. Esquematització de l'entorn genètic de la regió a deletar a la soca *S. maltophilia* K279a per generar mutants pel gen *smlt2804* (A), *smlt3571* (B), *smlt3730* (*parS*) (C) o *smlt3170-3171* (bomba SmeGH) (D), on s'observen les regions corresponents als braços esquerre (BE) i dret (BD) que serveixen per a la doble recombinació homòloga.

3.4.2. Plasmidis, oligonucleòtids i soques

Els plasmidis utilitzats en aquest treball es mostren a la Taula 9, on pGPI-Scel-Xcm s'ha utilitzat per a la generació de mutants mitjançant la tècnica de la conjugació i pBBR1-BAD per a la complementació dels mutants generats.

Taula 9. Plasmidis utilitzats en aquest treball.

Plasmidis	Característiques rellevants	Font
pGPI-Scel-Xcm	Plasmidi suïcida estable en <i>E. coli</i> SY327, que expressa la proteïna λ pir requerida per a la clonació i propagació de plasmidis amb l'origen de replicació R6K. Es cultiva en LB suplementat amb cloramfenicol (30 μ g/mL).	[214]*
pDAI-Scel-SacB	Plasmidi replicatiu d'ampli espectre que expressa l'endonucleasa I-Scel i amb el marcador SacB. Es manté en <i>E. coli</i> DH5 α en LB suplementat amb tetraciclina (20 μ g/mL)	[207]*
pRK2013	Plasmidi helper que proporciona els gens <i>tra</i> i <i>mob</i> requerits per a la mobilització dels plasmidis que contenen un oriT, com els plasmidis pGPI-Scel-Xcm i pDAI-Scel-SacB. Es manté en <i>E. coli</i> DH5 α en LB suplementat amb kanamicina (40 μ g/mL).	[207]*
pBBR1-MCS5	Plasmidi replicatiu d'ampli espectre amb resistència a gentamicina.	Laboratori GMB, IBB
pBBR1-MCS1-BAD	Plasmidi replicatiu d'ampli espectre, amb el promotor de l'operó arabinosa (pBAD) i amb resistència a cloramfenicol.	Laboratori GMB, IBB
pBBR1-MCS5-BAD	Plasmidi replicatiu d'ampli espectre, amb el promotor de l'operó arabinosa (pBAD) i amb resistència a gentamicina.	Laboratori GMB, IBB
pGPI-Scel-XcmBEBD-smlt2804	Plasmidi suïcida per a l'obtenció del mutant K279a Δ smlt2804.	En aquest treball
pGPI-Scel-XcmBEBD-smlt3571	Plasmidi suïcida per a l'obtenció del mutant K279a Δ smlt3571.	En aquest treball
pGPI-Scel-XcmBEBD-smlt3730	Plasmidi suïcida per a l'obtenció del mutant K279a Δ smlt3730.	En aquest treball
pGPI-Scel-XcmBEBD-smlt3170-3171	Plasmidi suïcida per a l'obtenció del mutant K279a Δ smlt3170-3171.	En aquest treball
pBBR1-MCS5-BAD-smlt2804	Plasmidi replicatiu amb promotor de l'operó arabinosa (pBAD) per a la complementació del mutant K279a Δ smlt2804.	En aquest treball
pBBR1-MCS5-smlt2804	Plasmidi replicatiu per a la complementació del mutant K279a Δ smlt2804	En aquest treball
pBBR1-MCS5-BAD-smlt3571	Plasmidi replicatiu amb promotor de l'operó arabinosa (pBAD) per a la complementació del mutant K279a Δ smlt3571.	En aquest treball
pBBR1-MCS5-BAD-smlt3571-smlt2804	Plasmidi replicatiu amb el pBAD per a la complementació del doble mutant K279a Δ smlt3571 Δ smlt2804.	En aquest treball
pBBR1-MCS1-BAD-smlt3730	Plasmidi replicatiu amb promotor de l'operó arabinosa (pBAD) per a la complementació del mutant K279a Δ smlt3730.	En aquest treball

*Aquests plasmidis han estat gentilment cedits per Uwe Mamat (Research Center Borstel, Alemanya) amb permís dels autors.

Per altra banda, els oligonucleòtids s'han dissenyat seguint unes pautes estàndards de disseny mitjançant el programa Oligo 6 (<http://www.oligo.net>). Tots els oligonucleòtids utilitzats al llarg d'aquest treball han estat sintetitzats i comprats a Sigma-Aldrich i es detallen a la Taula 10.

Taula 10. Oligonucleòtids utilitzats en aquest treball.

Nom	Seqüència 5'-3'*	Diana	Aplicació	
Gen homòleg a gens <i>mcr</i> (<i>smlt2804</i>)				
EcoRI-BE-Smlt2804-Up	GATgaattcAGCGTTCGTA CTGGACATCAG	<i>EcoRI</i>	Amplificar Braç Esquerre del gen <i>Smlt2804</i>	Construcció del plasmidi suïcida pGPI-Scel-XCm per mutar <i>smlt2804</i>
NheI-BE-Smlt2804-Lo	AGTgctagcGACAGATAGGCGTTCAGTTC	<i>NheI</i>	Amplificar Braç Esquerre del gen <i>Smlt2804</i>	
NheI-BD-Smlt2804-Up	GGTgctagcGCCCCGATCTGGATGTCTTC	<i>NheI</i>	Amplificar Braç Dret del gen <i>Smlt2804</i>	
BglII-BD-Smlt2804-Lo	CGTagatctTCGACCCCAACCGCAGCTTC	<i>BglII</i>	Amplificar Braç Dret del gen <i>Smlt2804</i>	
Intern-Smlt2804-Up	CGCGTCCGAAGCTGGTGGTC	-----	Comprovació del mutant	
Intern-Smlt2804-Lo	GGACTGAATGCCCGGACTG	-----		
Extern-Smlt2804-Up	GCCGCATCTCCACACCCTC	-----		
Extern-Smlt2804-Lo	GGCTGAACCTGATCGTGCA	-----		
XbaI-Comple-Smlt2804-Up	ACCTtctagaTGTTGATGGTGGGTGCTGTG	<i>XbaI</i>	Construcció del plasmidi replicatiu pBBR1-BAD per complementar $\Delta Smlt2804$	
HindIII-Comple-Smlt2804-Lo	TCTaagcttTCGCGCCAGTCACCCATATC	<i>HindIII</i>		
Gen homòleg a gens <i>mcr</i> (<i>smlt3571</i>)				
EcoRI-BE-Smlt3571-Up	CTGgaattcGGCGTGATCTCCCTGCTGAAG	<i>EcoRI</i>	Amplificar Braç Esquerre del gen <i>Smlt3571</i>	Construcció del plasmidi suïcida pGPI-Scel-XCm per mutar <i>smlt3571</i>
NheI-BE-Smlt3571-Lo	TGGgctagcCTCATGTAGTGCGCAGCGAAC	<i>NheI</i>	Amplificar Braç Esquerre del gen <i>Smlt3571</i>	
NheI-BD-Smlt3571-Up	GCAgctagcACCGACCAGACAACCTGTTC	<i>NheI</i>	Amplificar Braç Dret del gen <i>Smlt3571</i>	
BglII-BD-Smlt3571-Lo	CCCagatctGCTCTCGACACCTACGCTGAC	<i>BglII</i>	Amplificar Braç Dret del gen <i>Smlt3571</i>	
Intern-Smlt3571-Up	CGTCATGGGCGAGACCGTGC	-----	Comprovació del mutant	
Intern-Smlt3571-Lo	CCTGCAGGGTGCCGATGGTC	-----		
Extern-Smlt3571-Up	CGCTGGTCGTGATCCTGCTG	-----		
Extern-Smlt3571-Lo	CCCGCTTGCCAGTCTTATCG	-----		
XbaI-Comple-Smlt3571-Up	CCAtctagaAGGAGGCAAACGCATGAGTG	<i>XbaI</i>	Construcció del plasmidi replicatiu pBBR1-BAD per complementar $\Delta Smlt3571$	
HindIII-Comple-Smlt3571-Lo	CATTaagcttTGCTGTTACTGTGCGAGGCTG	<i>HindIII</i>		
Gen ortòleg a <i>ParS</i> (<i>smlt3730</i>)				
EcoRI-BE-Smlt3730-Up	ACTgaattcGAGATCCTGTGGCTGCTG	<i>EcoRI</i>	Amplificar Braç Esquerre del gen <i>Smlt3730</i>	Construcció del plasmidi suïcida pGPI-Scel-XCm per mutar <i>smlt2804</i>
NheI-BE-Smlt3730-Lo	CGAgctagcGCAGGACCTGTTGGTATTG	<i>NheI</i>	Amplificar Braç Esquerre del gen <i>Smlt3730</i>	
NheI-BD-Smlt3730-Up	CACgctagcGACCCTGCAGGACTC	<i>NheI</i>	Amplificar Braç Dret del gen <i>Smlt3730</i>	
BglII-BD-Smlt3730-Lo	CGAGagatctCCGTACCAGGTCTGCATGTA	<i>BglII</i>	Amplificar Braç Dret del gen <i>Smlt3730</i>	

3. Materials i mètodes

Continuació Taula 10.

Nom	Seqüència 5'- 3'*	Diana	Aplicació	
Intern-Smlt3730-Up	CAGATGACGACGTACATGACC	-----	Comprovació del mutant	
Intern-Smlt3730-Lo	GTCATCGCTGCCTGCATCAG	-----		
Extern-Smlt3730-Up	CCGATGACTATGTGCACAAAC	-----		
Extern-Smlt3730-Lo	ACTCAGAAGCGGTGCGTATAG	-----		
XbaI-Comple-Smlt3730-Up	TGTGtctagaTGGCTACCAGT TCAATCCGTC	XbaI	Construcció del plasmidi replicatiu pBBR1-BAD per complementar Δ Smlt3730	
HindIII-Comple-Smlt3730-Lo	GAAaagcttAGCTGGGACATGGAAACTCTC	HindIII		
Gens bomba SmeGH (<i>smlt3170-3171</i>)				
NotI-BE-Smlt3170-Up	CTGgcgccgcAATAAGTAGATTC	NotI	Amplificar Braç Esquerre del gen <i>Smlt3170</i>	Construcció del plasmidi suïcida pGPI-Scel-XCm per mutar <i>smlt3170-3171</i>
KpnI-BE-Smlt3170-Lo	CCAgttaccAAGATGAAGCGTCAGTG	KpnI	Amplificar Braç Esquerre del gen <i>Smlt3170</i>	
KpnI-BD-Smlt3171-Up	TCCggtaccTTTGTTGTTGACGCT T	KpnI	Amplificar Braç Dret del gen <i>Smlt3171</i>	
XbaI-BD-Smlt3171-Lo	TGGtctagaCTTTTCAGTACAGGCCGTATG	XbaI	Amplificar Braç Dret del gen <i>Smlt3171</i>	
Intern-Smlt3170-71-Up	GTCTACCAGGAAGGCTCGCAG	-----	Comprovació del mutant	
Intern-Smlt3170-71-Lo	CTTCCTTGACCTTCTGCACGC	-----		
Extern-Smlt3170-71-Up	TCACTGCGACCTCCGACTCTG	-----		
Extern-Smlt3170-71-Lo	GCCTTATGCGAAACCGGTAGA	-----		
Oligonucleòtids generals utilitzats per a la construcció dels quatre mutants				
MCS1-Up	CACAGGAACACTTAACG	-----	Comprovació de la construcció del plasmidi de delecció suïcida pGPI-Scel-XCm	
MCS1-Lo	GAGCCGATGATTAATTG	-----		

* En minúscula estan les seqüències dels enzims de restricció.

Finalment, les soques utilitzades per als estudis fenotípics de diferents possibles determinants de resistència a antibiòtics s'exposen a la Taula 11.

Taula 11. Soques mutants creades en *S. maltophilia* k279a i els seus complementats.

Soca	Característiques rellevants	Referències
K279a Δ smlt2804	K279a mutant pel gen <i>smlt2804</i> (<i>eptA</i>), implicat en la modificació del lípid A.	En aquest treball
K279a Δ smlt3571	K279a mutant pel gen <i>smlt3571</i> (<i>eptA</i>), implicat en la modificació del lípid A.	En aquest treball
K279a Δ smlt2804 Δ smlt3571	K279a mutant pels gens <i>smlt2804</i> (<i>eptA</i>) i <i>smlt3571</i> (<i>eptA</i>), implicats en la modificació del lípid A.	En aquest treball
K279a Δ smlt3730	K279a mutant pel gen <i>smlt3730</i> (<i>rstB</i>), un regulador general.	En aquest treball
K279a Δ smlt3170-3171	K279a mutant pel gen <i>smlt3170-3171</i> de la bomba SmeGH.	En aquest treball
K279a/pBBR5	K279a amb el plasmidi replicatiu pBBR1-MCS5 utilitzada com a control en el procés de complementació del fenotip mutat.	En aquest treball

Continuació Taula 11.

Soca	Característiques rellevants	Referències
K279a/pBBR5-BAD	K279a amb el plasmidi replicatiu pBBR1-MCS5-BAD utilitzada com a control en el procés de complementació del fenotip mutat.	En aquest treball
K279aΔsmlt2804/pBBR5	K279aΔsmlt2804 amb el plasmidi replicatiu pBBR1-MCS5 utilitzada com a control en el procés de complementació del fenotip mutat.	En aquest treball
K279aΔSmlt3571/pBBR5-BAD	K279aΔsmlt3571 amb el plasmidi replicatiu pBBR1-MCS5-BAD utilitzada com a control en el procés de complementació del fenotip mutat.	En aquest treball
K279aΔSmlt2804-ΔSmlt3571/pBBR5-BAD	K279aΔsmlt2804-Δsmlt3571 amb el plasmidi replicatiu pBBR1-MCS5-BAD utilitzada com a control en el procés de complementació del fenotip mutat	En aquest treball
K279aΔSmlt3730/pBBR1-BAD	K279aΔsmlt3730 amb el plasmidi replicatiu pBBR1-MCS1-BAD utilitzada com a control en el procés de complementació del fenotip mutat.	En aquest treball
K279aΔSmlt2804/pBBR5-smlt2804	Complementació de la soca K279aΔsmlt2804	En aquest treball
K279aΔSmlt3571/pBBR5-BAD-smlt3571	Complementació de la soca K279aΔsmlt3571	En aquest treball
K279aΔSmlt2804-ΔSmlt3571/pBBR5-BAD-smlt3571-smlt2804	Complementació de la soca K279aΔsmlt2804-Δsmlt3571.	En aquest treball
K279aΔSmlt2804-ΔSmlt3571/pBBR1-BAD-smlt3730	Complementació de la soca K279aΔsmlt3530	En aquest treball

3.4.3. Tècniques generals de biologia molecular per obtenir els plasmidis per mutar i complementar

A continuació, s'exposen els principals mètodes desenvolupats per a l'obtenció de mutants, els quals estan basats, principalment, en el manual *Molecular Cloning: a laboratory manual* [215] i en les indicacions dels kits utilitzats.

1. Purificació plasmídica

El kit utilitzat per a l'extracció del plasmidi és el GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma), el qual es recomana utilitzar en soques que contenen el gen *endA* (Endonucleases), com el cas de la soca SY327. Se segueixen les instruccions del fabricant i un cop purificat el plasmidi, la mida i la qualitat del DNA s'avaluen amb un gel d'electroforesi (gel d'agarosa al 0,8%) i la seva concentració es determina amb l'espectròmetre NanoDrop, la qual ha d'estar entre 30-50 ng/μL (A260/280~1,7-1,8).

2. Amplificació de DNA mitjançant PCR

Un cop dissenyats els oligonucleòtids que continguin les dianes de restricció pertinents, a partir del DNA genòmic de la soca *S. maltophilia* K279a s'amplifiquen els fragments desitjats mitjançant una reacció de PCR. Les extraccions de DNA genòmic es duen a terme mitjançant el Kit GenElute *Bacterial Genomic DNA* (Sigma) i l'amplificació de fragments de DNA mitjançant PCR es realitza amb el Kit de la polimerasa FastStart™ Taq DNA polimerasa (Roche) que conté

el tampó adient per a l'amplificació de fragments de DNA amb alta concentració de GC com és el cas de *S. maltophilia*.

Un cop finalitzat el programa de PCR, mitjançant un gel d'agarosa al 0,8%, es comprova que la qualitat i la mida de banda és l'adequada, utilitzant el marcador de pes molecular GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (ThermoScientific) amb fragments entre 0,075 i 20 kb. Finalment, un cop comprovat que la mida de banda obtinguda és l'adequada, els productes de PCR (BE i BD) es purifiquen mitjançant el kit de purificació de DNA GeneJET PCR Purification Kit (ThermoFischer).

3. Clonació

El procés de clonació realitzat en aquest treball consta de les següents etapes bàsiques: digestió, lligació, transferència de material genètic i selecció dels clons correctes.

- **Digestió**

En primer lloc, s'ha de dur a terme, per una banda, la digestió del producte de PCR i, per altra banda, la digestió del plasmidi pGPI-SceI-Xcm o algun plasmidi de la sèrie pBBR1-MCS. Aquestes digestions s'han de realitzar amb els enzims de restricció adequats (veure la Taula 10) utilitzant els tampons específics per a cada enzim, tot seguint les especificacions del fabricant. En alguns casos serà requerit l'ús de BSA (Albúmina de sèrum boví) per tal d'evitar l'adhesió de l'enzim als tubs de reacció i a les superfícies de la pipeta i també per estabilitzar la reacció de digestió durant la incubació. Tant els enzims de restricció com els tampons utilitzats són de la casa comercial Roche.

Transcorregut el temps d'incubació de les diferents digestions, amb un gel d'agarosa al 1% se separen les bandes i, un cop comprovada la qualitat de les mateixes, s'extreuen i es purifiquen mitjançant el kit GeneJet Gel Extraction Kit (ThermoScientific). Finalment, el producte de PCR i el plasmidi digerits es quantifica mitjançant l'espectròmetre Nanodrop o bé, mitjançant una inspecció visual en un gel d'electroforesi.

- **Lligació**

Després de la digestió, té lloc la lligació entre el plasmidi doblement digerit amb el fragment de PCR digerit amb els mateixos enzims de restricció.

Per dur a terme la lligació, s'utilitza la T4 DNA lligasa (ThermoScientific), seguint les instruccions del fabricant. Cal tenir present que la ràtio plasmidi:insert ha de ser entre 1:1 i 1:10. Un cop finalitzada la lligació, per tal d'optimitzar el següent pas de transformació i evitar possibles recirculacions és aconsellable inactivar la T4 DNA lligasa per mitjà d'un xoc tèrmic (65°C durant 15 minuts o bé 70°C durant 5 minuts).

- **Transferència de material genètic a *E. coli***

Al llarg d'aquest treball s'han utilitzat diferents tècniques de transferència de material genètic: la transformació per xoc tèrmic, l'electroporació i la conjugació.

El mètode de transformació induïda utilitzat en aquest treball es basa en la preparació de cèl·lules d' *E. coli* químicament competents tractades amb CaCl_2 100mM seguit d'un xoc tèrmic. Un cop dut a terme la transformació química, les cèl·lules se sembren en plaques amb medi LB agar selectiu segons convingui i de les colònies que s'obtinguin, es realitza una PCR de comprovació amb els oligonucleòtids adequats. Els plasmidis finals han estat comprovats per seqüenciació.

L'electroporació i la conjugació en *S. maltophilia* s'explicaran a continuació.

3.4.4. Obtenció de mutants en *S. maltophilia* K279a

Per a l'obtenció de mutants sense marcador en *S. maltophilia* mitjançant el sistema pGPI-Sce/pDAI-SceI-SacB s'utilitza una conjugació triparental on, a part de la soca donadora (que conté el plasmidi mobilitzable) i la soca receptora, també intervé una soca *helper* que conté un plasmidi conjugatiu suïcida que subministra els gens *tra* i *mob* requerits per a la mobilització dels plasmidis d'interès.

El protocol de conjugació dut a terme en aquest treball consta de tres passos: conjugació del plasmidi de delecció pGPI-SceI-XcmBEBDSmltxxxx, resolució dels cointegrats mitjançant el plasmidi pDAI-SceI-SacB i eliminació del plasmidi replicatiu. Aquestes tres passos es detallen a continuació.

1. Conjugació del plasmidi de delecció pGPI-SceI-XcmBEBDSmltxxxx

Les soques utilitzades en aquesta conjugació són:

- Soca receptora : *S. maltophilia* k279a
- Soca donadora: *E. coli* SY327/pGPI-SceI-XcmBEBDSmltxxxx
- Soca helper: *E. coli* DH5 α /pRK2013

En primer lloc, es posen a créixer les tres soques en cultiu líquid amb els antibiòtics corresponents i s'incuben a 37°C durant la nit. El dia següent, després dels rentats amb PBS, es diposita una gota confluent de les tres soques en una placa de medi SOB i s'incuba a 37°C durant 24 hores. També és important realitzar controls, de tal manera, que a part de la gota confluent amb les tres soques és necessari sembrar-ne d'altres amb totes les combinacions de barreja de dues soques. El dia següent, es rasca la gota, es resuspèn en PBS, es plaqueja en plaques de LB que continguin 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cloramfenicol (per tal de seleccionar els *S. maltophilia* k279a cointegrats) i 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de norfloxacina (per tal d'eliminar les *E. coli* helper i donadora) i s'incuben a 37°C durant 24-48 hores fins que apareixin colònies. Aquestes colònies, que seran cloramfenicol resistents, es ruixen amb pirocatecol 0.45M per tal de comprovar que s'ha integrat el plasmidi de delecció en el genoma de la soca de *S. maltophilia*. Com a conseqüència de l'activitat pirocatecol 2,3-dioxigenasa codificada pel gen *XylE* del plasmidi integrat, el color groc brillant que apareix en la biomassa de la colònia indica la presència del plasmidi pGPI-SceI-Xcm-Smltxxxx dins del genoma de la soca receptora.

2. Resolució dels cointegrats mitjançant el plasmidi replicatiu pDAI-Scel-SacB.

Un cop seleccionades les colònies cloramfenicol resistents i pirocatecol positives, es dur a terme una segona conjugació amb el plasmidi replicatiu pDAI-Scel-SacB.

En aquesta segona conjugació hi intervenen les següents soques:

- Soca receptora : *S. maltophilia* k279a cointegrats
- Soca donadora: *E. coli* DH5 α /pDAI-Scel-SacB
- Soca helper: *E. coli* DH5 α /pRK2013

El procediment que se segueix és el mateix que s'ha explicat en la primera conjugació, però amb una combinació d'antibiòtics i amb un criteri de selecció per pirocatecol diferents. Així doncs, en primer lloc, cada una de les tres soques es cultiven amb els seus antibiòtics corresponents, es procedeix a la conjugació i després dels rentats amb PBS, es plaqueja en plaques de LB que continguin 60 μ g/mL de tetraciclina (per tal de seleccionar *S. maltophilia* que continguin el plasmidi pDAI-Scel-SacB) i 5 μ g/mL de norfloxacin (per tal d'eliminar les *E. coli* helper i donadora) incubant-se a 37°C durant 24-48 hores fins que apareixin colònies. Aquestes colònies, que seran tetraciclina resistents, es piquen i es plaquegen en tres plaques fresques de LB, dues que continguin 60 μ g/mL de tetraciclina i una amb 30 μ g/mL de cloramfenicol, i s'incuben a 37°C durant 24h. Aquest pas es dur a terme per tal d'assegurar-nos l'excisió del plasmidi pGPI-Scel-XCm-Smltxxx.

Després de la incubació, en una de les plaques que conté tetraciclina, es ruixa amb pirocatecol 0,45M. En aquest cas, però, se seleccionen les colònies que siguin pirocatecol negatives i, a la vegada, siguin cloramfenicol sensibles i tetraciclina resistents, fet que ens indicarà que la soca receptora ha perdut el plasmidi pGPI-Scel-XCm-Smltxxx i que ha tingut lloc la delecció.

Un cop seleccionades les colònies pirocatecol negatives, cloramfenicol sensibles i tetraciclina resistents és aconsellable realitzar PCRs per tal de comprovar que aquestes colònies són mutants correctes.

3. Eliminació del plasmidi replicatiu pDAI-Scel-SacB

Després de comprovar que els clons són mutants correctes, es pot eliminar el plasmidi replicatiu mitjançant un tractament amb sacarosa, ja que aquest plasmidi pDAI-Scel-SacB conté el gen *SacB*, el qual confereix sensibilitat a la sacarosa. Així doncs, els clons seleccionats es posen a créixer en LB sense antibiòtics. Un cop el cultiu està crescut, es plaqueja en plaques de LB amb un 5% de sacarosa. Aquestes plaques s'incuben a 37°C durant 24 hores i les colònies obtingudes se sembren en dues plaques, una lliure d'antibiòtics i l'altra amb tetraciclina 60 μ g/mL. Els clons seleccionats seran aquells que siguin sensibles a la tetraciclina, fet que ens indicarà que han perdut el plasmidi pDAI-Scel-SacB. Arribats en aquest punt, ja tenim els mutants construïts i ja es poden conservar per a futurs estudis.

- Cal destacar que en aquest treball s'ha procedit a l'obtenció d'un mutant doble (K279a Δ smlt2804 Δ smlt3571), el qual, en primer lloc, s'han obtingut els dos mutants simples (K279a Δ smlt2804 i K279a Δ smlt3571) per la metodologia anteriorment

explicada. Posteriorment, s'ha iniciat altrament el procés de conjugació triparental partint com a soca receptora inicial la K279a Δ *smlt3571* i com a soca donadora l' *E. coli* SY327/pGPI-Scel-XcmBEBDSmlt2804

3.4.5. Complementació de mutants

Sempre que s'obtenen mutants és imprescindible crear els seus complementats, és a dir, corregir el defecte fenotípic causat per la generació del mutant. Així doncs, a continuació, s'exposa la metodologia emprada per a la generació dels complementats dels mutants obtinguts en aquest treball.

La complementació de les mutacions dels gens obtinguts anteriorment es dur a terme mitjançant la clonació de cada un dels gens en els plasmidis de la sèrie pBBR1-MCS, els quals són replicatius en *S. maltophilia*. En aquest cas també hem emprat una modificació d'aquests vectors que compta amb el promotor BAD. Així doncs, per exemple, en el plasmidi pBBR1-MCS5-BAD-smlt3571-smlt2804, el gen *smlt3571* està sota el promotor BAD, però *smlt2804* està sota el seu propi promotor. De la mateixa manera, pels complementats simples s'han utilitzant tant el plasmidi pBBR1-MCS1 com el plasmidi pBBR1-MCS5 segons l'estratègia emprada en cada cas.

Un cop obtinguts els plasmidis de complementació, aquests es transfereixen a la soca K279a mutada mitjançant electroporació. Per a l'electroporació en *S. maltophilia*, el tractament utilitzat en aquest treball han estat els rentats successius amb sucrosa 300mM [216] per tal d'obtenir cèl·lules electrocompetents. Seguidament, té lloc l'electroporació. L'impuls elèctric el genera un electroporador i, en aquest treball, s'ha utilitzat el GenePulser XCell™ de BioRad amb les següent condicions: 2,5kV de potencial elèctric, 200 Ω de resistència i 25 μ F de capacítància. Seguidament, es resuspenen les cèl·lules electroporades amb 1 mL de LB i s'incuben durant dues hores a 37°C. Passat el temps d'incubació, se sembren en plaques de medi sòlid selectiu i, després de 24 hores d'incubació, se seleccionen aquelles colònies que siguin resistents, fet que indicarà que han introduït el plasmidi replicatiu.

3.5. Anàlisi de seqüències

L'eina bioinformàtica més emprada en aquest treball ha estat el programa BLAST que ofereix el NCBI, a través de la pàgina web d'Internet (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). De les bases de dades del mateix NCBI s'han extret les seqüències, els genomes (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) i la informació dels gens d'interès i, paral·lelament, també s'ha usat la web de Microbesonline (<http://www.microbesonline.org>) per a la mateixa cerca i caracterització dels gens i predicció d' operons. Per aquest treball s'ha utilitzat també el genoma de la soca PG157-SI13 (GenBank NZ_LNIW0000000.1). La seqüenciació de la soca esmentada, el seu ensamblatge i la comparativa entre els genomes s'ha dut a terme a través d'un servei extern de genòmica (UAB) i el grup de biologia computacional de l'IBB, respectivament.

Per fer la predicció dels determinants a la resistència a la colistina, en primer lloc, s'ha elaborat un llistat de mecanismes de resistència descrits en altres bacteris per mitjà de la recerca bibliogràfica. Posteriorment, s'han obtingut les seqüències ortòlegs de les soques de *S. maltophilia* K279a, M30, D457, PG157-S113 i R551-3 mitjançant una estratègia de RBH (*Reciprocal Best Hits*) emprant BLAST o UCSC blat [217].

Les seqüències concatenades dels set gens del perfil MLST de cada soca s'han alineat i s'ha construït un arbre filogenètic basat en l'algorisme d'unió de veïns. Per fer alineaments múltiples de seqüències i per a la creació dels arbres filogenètics s'ha utilitzat el programa MEGA V7.0.21 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, versió 7.0.21) [218]. Finalment, el programa Oligo 6 (www.oligo.net) s'ha utilitzat pel disseny dels oligonucleòtids i el programa Vector NT1® (Thermo Fisher Scientific Inc.) per al disseny de les estratègies de clonació i per a la representació esquemàtica dels plasmidis.

3.6. Anàlisi estadístic

Els programes utilitzats per fer l'anàlisi estadístic han estat el SPSS (versió 15.0, SPAA Inc., Chicago, Illinois, USA) i el GraphPad Prism versió 5 (Software GraphPad, San Diego, CA). S'ha realitzat una estadística descriptiva (mitjana, variància i desviació estàndard) amb freqüències i percentatges dels valors obtinguts en les diferents dades fenotípiques. L'associació entre variables s'ha comparat mitjançant l'ús de la Prova Z (Test d'Hipòtesis: diferències entre mitjanes de poblacions amb distribució arbitrària i variança desconeguda) o la Prova Exacte de Fischer segons correspongui. S'ha calculat l'Oportunitat Relativa (OR) amb un interval de confiança (IC) del 95% per cada variable. El nivell de significança estadística s'ha fixat en $P < 0,05$, en una freqüència mínima de 14 per realitzar el test d'hipòtesis i totes les proves són de dues cues. L'estadística descriptiva utilitzada per estudiar la virulència s'ha dut a terme mitjançant el programa GraphPad Prism, utilitzant el test estadístic *log(agonist) vs. Response Variable slope* per determinar la LT50 per a cada soca, és a dir, el temps necessari per matar el 50% de la població inicial de nematodes.



RESULTATS I DISCUSSIÓ

Les ciències tenen arrels amargues, però fruits molt dolços.

Aristòtil (384Ac-322aC)

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1. Caracterització fenotípica i genotípica de les 81 soques clíniques

La col·lecció de soques utilitzada en aquest treball consisteix en un total de 78 aïllats clínics de *S. maltophilia* recol·lectats entre els anys 1998 i 2012 a partir d'estudis de prevalença en les unitats de cures intensives de diferents hospitals europeus. Els aïllats clínics provenen de l'Hospital Municipal de Badalona (Espanya), de l'Hospital Clínic de Barcelona (Espanya), de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Espanya), del Centre Mèdic Universitari de Ljubljana (Eslovènia), de la Clínica Universitària de malalties respiratòries i al·lèrgiques (Eslovènia), de l'Hospital Universitari Raymond Poincare (França), de l'Hospital St. Joseph (França), de la Universitat d'Anvers (Bèlgica) i del Charite Clínic de Berlín (Alemanya); i es tracta d'aïllats d'esput, d'infeccions de sang, de ferides quirúrgiques, d'exsudats d'orofaringe, del perineu, d'úlcer vascular, d'úlcer de decúbit o de broncorespiració (Figura 13 i Taula 4).

A més a més d'aquests 78 aïllats clínics, la col·lecció d'aquest treball també inclou tres soques com a referència, les quals també són aïllats clínics: K279a, D457 i ATCC13637.

4.1.1. Caracterització molecular i classificació de les soques de *S. maltophilia* en grups genòmics

Per tal d'avaluar la diversitat genètica i la possible relació entre els aïllats de *S. maltophilia* implicats en aquest estudi, s'han analitzat els perfils MLST que s'havien obtingut prèviament en el nostre grup.

S'han identificat 37 ST entre les 78 soques aïllades de pacients de diferents països europeus (Figura 13), de les quals, 30 no han estat prèviament descrites. Aquestes noves STs identificades se'ls ha designat el codi de ST-76 a ST-81 i de ST-120 a ST-143 i han estat dipositades a la base MLST de *S. maltophilia*. 15 dels 78 aïllats (19,2%) pertanyen a 7 STs descrites anteriorment, mentre que els 63 aïllats restants (80,8%) pertanyen a les 30 STs noves identificades en aquest treball, fet que confirma l'existència d'una gran heterogeneïtat genotípica en *S. maltophilia*.

Aquesta alta diversitat també s'ha reportat en altres estudis. Per exemple, estudis a Espanya, Corea i Turquia mostren una gran diversitat genètica dels aïllats de *S. maltophilia* malgrat que l'origen sigui d'un sol hospital, fet que suggereix l'existència d'una àmplia distribució ambiental d'aquest bacteri [219]–[221]. De la mateixa manera, un estudi de les soques clíniques obtingudes en diferents hospitals de Brasil també presenta aquesta diversitat genètica esmentada [222]. No obstant això, altrament s'han descrit casos de brots dins d'entorns hospitalaris, on s'han identificat clons amb genotip idèntic entre pacients [223]–[225].

Dins de la nostra col·lecció de soques, els tres genotips MLST més freqüents són ST-77 (8 aïllats), ST-132 (8 aïllats) i ST-133 (7 aïllats). Les STs restants apareixen amb una freqüència inferior al 5,0%. Cal destacar que la nostra ST-77 es compon de soques procedents de diversos països europeus.

Entre les 78 soques, hi ha cinc parelles epidemiològicament vinculades ja que es tracta de soques aïllades d'un mateix pacient. En quatre d'elles (OL11-S113 i PL12-S113; PU101-BE13 i PU102-BE13; PU109-BE13 i OU110-BE13; PU140-BE13 i OU141-BE13) es tracta d'aïllats obtinguts de dues fonts diferents del mateix pacient el mateix dia i, en el cas de la parella OS87-FR13 i OS91-FR13, són mostres consecutives preses del mateix pacient en dates diferents, tractant-se, doncs, de possibles soques recurrents. En tots els casos, les dues soques aïllades d'un sol pacient comparteixen la mateixa ST, excepte en la parella PU101-BE13 i PU102-BE13, que són genèticament diferents amb tan sols tres al·lels en comú.

Per altra banda, a partir dels resultats de la tipificació MLST i les dades d'aïllament, entre les 35 soques recollides de l'hospital Charite Clínic de Berlin (Alemanya) (Taula A2-Annex) sembla que hi hagi grups relacionats epidemiològicament. Així doncs, per tal d'evitar soques duplicades que puguin interferir en les proves de correlació, s'han eliminat aquells aïllats que presenten el mateix perfil MLST i les mateixes dades d'aïllament (mateixa font, mateix pacient, mateixes dates), conservant-ne un com a representatiu per a les futures investigacions. No obstant això, aquelles soques que malgrat tenir el mateix perfil MLST i les mateixes dades d'aïllament presenten diferents perfils de susceptibilitat a antibiòtics s'han mantingut en l'anàlisi.

Finalment, doncs, s'ha utilitzat un total de 58 aïllaments per establir estudis de correlacions entre els paràmetres genotípics i fenotípics estudiats al llarg d'aquest treball. Al mateix temps, s'han inclòs també les soques de referència K279a, D457 i ATCC13637, fent un total de 61 soques "úniques" per als estudis superiors de correlació amb els fenotips (Figura 13).

Per tal de classificar els 61 aïllats de *S. maltophilia* en grups genòmics, s'ha dut a terme un anàlisi filogenètic a partir de la concatenació dels gens MLST (Figura 13). A partir de la creació d'aquest arbre filogenètic s'han establert un total de 10 grups genòmics d'acord amb els genogrups establerts anteriorment per Kaiser *et al.* [208] i Hauben *et al.* [226]. 19 (31%) dels 61 aïllats provinents de pacients de sis països diferents s'agrupen en el grup genòmic #6, grup en el qual també pertany la soca de referència K279a i el complex clonal ST-8. Els altres genogrups amb un nombre significant d'aïllats són #2 (23%), #3 (13%) i C (15%).

A part de la tipificació MLST, la caracterització genotípica també s'ha basat en l'anàlisi del gen *rpff* [101]. 38 soques (62,3%) presenten la variant *rpff-1* mentre que les 23 restants (37,7%) la variant *rpff-2* (Figura 13).

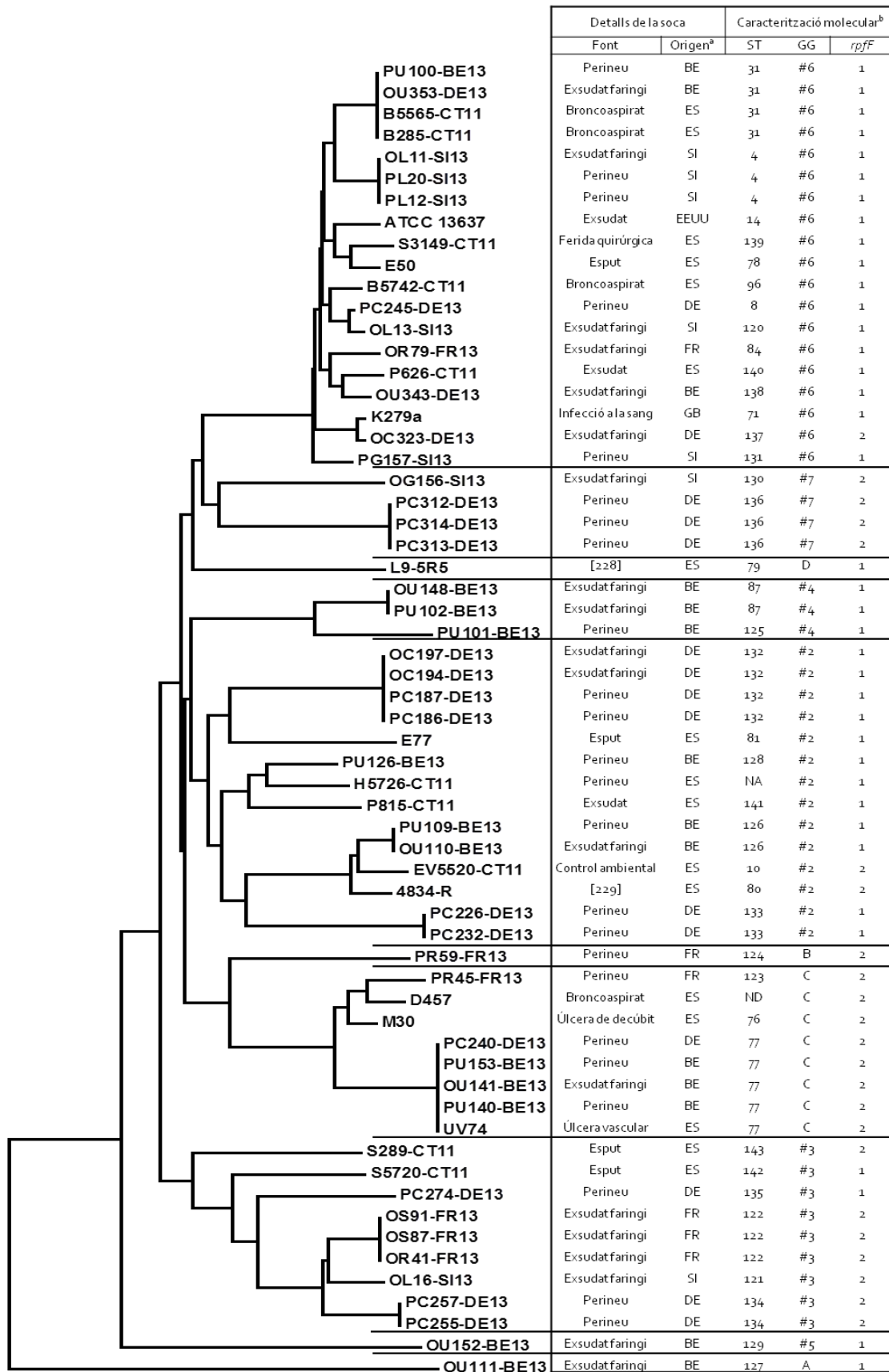


Figura 13. Arbre filogenètic dels 61 aïllats de *S. maltophilia* "únics" juntament amb les característiques d'aïllament de la soca i la caracterització genotípica. Les soques que pertanyen a un mateix grup genòmic (GG) estan separades per línies horitzontals. ^aOrigen: BE (Bèlgica), ES (Espanya), SI (Eslovènia), FR (França), EEUU (Estats Units), DE (Alemanya), (GB) Regne Unit. ^bCaracterització genotípica determinada mitjançant l'amplificació i seqüenciació dels set gens del perfil MLST per *S. maltophilia* amb els quals es defineix la seqüència tipus (ST) i el gen *rpjF*. NA (No assignat).

4.1.2. Susceptibilitat antimicrobiana

S'ha avaluat la susceptibilitat de les diferents soques de *S. maltophilia* enfront a antibiòtics β -lactàmics (ceftazidima i ticarcil·lina-clavulànic) i a antibiòtics no β -lactàmics (amikacina, trimetroprim-sulfametoxazol, levofloxacina, minociclina i colistina). Els valors de la CMI de les 61 soques "úniques" de *S. maltophilia* en estudi es mostren a la Taula 12, tenint en compte, que per classificar les soques en categories antimicrobianes, les soques intermèdies i resistents s'han agrupat en la categoria de no susceptible. Totes les soques, llevat d'una amb un valor de CMI intermedi, són susceptibles a minociclina i un 93,5% i 70,5% ho són a trimetroprim-sulfametoxazol i levofloxacina, respectivament. Per al contrari, s'han detectat taxes altes de resistència contra els antibiòtics amikacina (67,2%), ticarcil·lina-clavulànic (62,2%), ceftazidima (62,2%) i colistina (68,9%), tots amb rangs de CMI fins a >256 $\mu\text{g/mL}$ (Taula 12, Taula 13).

Taula 12. Perfil de resistència antimicrobiana de les 61 soques de *S. maltophilia*.

Soca	CAZ	MN	LEV	TMP/SXT	AK	TTC	CS ^a	CS ^b	Patró de resistència
PU100-BE13	64	0,06	0,38	0,25	6	24	2	16	MDR
OU353-BE13	>256	0,06	0,38	0,19	48	64	8	1	MDR
B5565-CT11	1	0,25	0,13	0,13	48	8	1,5	32	no MDR
B285-CT11	12	0,09	0,75	0,38	>256	6	0,38	8	MDR
OL11-Sl13	>256	0,38	>32	>32	192	>256	1,5	16	MDR
PL20-Sl13	48	0,19	0,5	0,38	192	64	4	32	MDR
PL12-Sl13	>256	0,38	16	>32	128	>256	1,5	0,5	MDR
ATCC13637	0,75	0,13	0,38	0,19	2	0,5	0,5	4	no MDR
S3149-CT11	4	0,25	12	0,25	96	6	8	64	MDR
E50	128	0,13	0,5	0,19	256	64	0,75	16	MDR
B5742-CT11	12	0,06	0,38	0,5	4	8	0,125	4	no MDR
PC245-DE13	128	0,13	0,5	0,25	16	256	2	2	MDR
OL13-Sl13	>256	0,75	0,75	>32	8	16	3	8	MDR
OR79-FR13	8	0,09	0,5	0,25	256	12	4	32	no MDR
P626-CT11	12	0,09	0,5	0,19	32	12	2	32	MDR
OU343-BE13	3	0,09	0,5	0,19	16	3	6	0,5	no MDR
K279 a	3	0,75	1,5	0,38	16	4	0,38	16	MDR
OC323-DE13	2	0,25	3	0,25	3	4	8	0,5	no MDR
PG157-Sl13	>256	0,09	0,38	0,75	8	256	6	16	MDR
OG156-Sl13	>256	0,13	0,38	0,25	>256	>256	2	2	MDR
PC312-DE13	12	0,50	>32	0,25	16	64	2	8	MDR
PC314-DE13	16	1,50	>32	0,38	8	256	3	16	MDR
PC313-DE13	12	0,75	>32	0,38	8	64	4	8	MDR
L9-5R5	256	0,13	0,19	0,5	256	256	0,5	0,25	MDR
OU148-BE13	>256	0,50	4	0,19	24	>256	4	8	MDR
PU102-BE13	>256	0,19	32	0,5	24	>256	0,5	4	MDR
PU101-BE13	>256	0,25	16	0,38	16	>256	2	8	MDR
OC197-DE13	32	0,09	0,38	0,13	4	32	24	1	no MDR
OC194-DE13	256	0,19	0,38	0,19	4	256	1,5	8	MDR
PC187-DE13	256	0,19	0,38	0,19	4	256	1,5	256	MDR
PC186-DE13	256	0,19	0,25	0,19	6	256	1,5	8	MDR
E77	>256	0,09	0,19	0,19	>256	>256	0,125	0,25	MDR

Continuació Taula 12.

Soca	CAZ	MN	LEV	TMP/SXT	AK	TTC	CS ^a	CS ^b	Patró de resistència
PU126-BE13	256	0,19	0,38	0,19	3	48	0,5	2	no MDR
H5726-CT11	1,5	0,13	0,25	0,13	256	3	0,125	0,25	no MDR
P815-CT11	12	0,19	0,25	0,19	12	48	0,38	4	MDR
PU109-BE13	24	0,75	8	0,25	4	32	1,5	1	MDR
OU110-BE13	96	1,00	6	0,19	4	24	1	0,5	MDR
EV5520-CT11	256	0,19	0,25	0,13	64	96	1	64	MDR
4834-R	12	0,13	0,38	0,19	32	48	0,5	1	MDR
PC226-DE13	24	0,19	0,75	0,19	8	8	4	1	no MDR
PC232-DE13	256	0,13	1	0,13	48	48	0,75	32	MDR
PR59-FR13	256	0,09	0,19	>32	48	96	8	32	MDR
PR45-FR13	2	0,09	0,5	0,19	256	6	2	128	no MDR
D457	1,5	0,19	0,75	0,13	128	4	0,094	32	no MDR
M30	1,5	0,03	0,19	0,13	256	12	1,5	32	no MDR
PC240-DE13	1	0,25	2	0,25	8	2	0,125	4	no MDR
PU153-BE13	3	0,13	1,5	0,38	24	64	1,5	0,5	MDR
OU141-BE13	0,75	0,19	0,75	0,25	16	24	1,5	>256	MDR
PU140-BE13	0,75	0,13	1	0,25	48	2	0,5	>256	no MDR
UV74	1,5	0,38	1,5	0,13	32	3	0,094	8	MDR
S289-CT11	1,5	0,50	12	0,38	48	8	0,047	8	MDR
S5720-CT11	16	0,09	0,38	0,25	256	24	0,125	8	MDR
PC274-DE13	32	0,05	0,5	0,19	6	32	0,5	8	MDR
OS91FR13	3	0,09	0,5	0,13	256	128	1,5	4	MDR
OS87FR13	3	0,09	0,38	0,19	128	>256	2	8	MDR
OR41-FR13	2	0,09	0,5	0,19	16	>256	2	2	no MDR
OL16-SI13	4	0,25	2	0,38	8	16	1,5	1	no MDR
PC257-DE13	48	0,19	0,75	0,19	>256	256	16	64	MDR
PC255-DE13	96	0,19	1	0,19	>256	256	1,5	64	MDR
OU152-BE13	0,75	0,06	0,13	0,19	2	8	1,5	0,25	no MDR
OU111-BE13	6	0,06	0,25	0,38	24	16	1	0,25	no MDR

La CMI ($\mu\text{g/mL}$) ha estat determinada mitjançant el mètode Etest, excepte en el cas de la colistina, que els resultats exposat són les CMI's determinades mitjançant el mètode ^aEtest i el mètode recomanat de BMD^b. Antibiótics: CAZ (Ceftazidima), MN (Minociclina), LEV (Levofloxacina), TMP/SXT (Trimetoprim-sulfametoxazol), AK (Amikacina), TTC (Ticarcil·lina-clavulànic), CS (Colistina). Els valors de CMI que determinen la no susceptibilitat estan marcats en gris. Patró de resistència: MDR (multidrug-resistance) i no-MDR (non multidrug-resistance).

Per tal de determinar els patrons de resistència, s'han seguit els criteris suggerits per Magiorakos *et al* [210]. Així doncs, entre els 61 aïllats, 42 (68,8%) són soques multiresistents (MDR), mentre que les 19 restants (31,2%) són considerades no MDR (Taula 12). Per altra banda, s'han observat 24 perfils de resistència diferents entre les 61 soques analitzades. El perfil de resistència més freqüent, amb resistència combinada a ceftazidima, amikacina, ticarcil·lina-clavulànic i colistina, s'ha detectat en set soques de tres grups genòmics diferents. En general, com es presenta més endavant, no s'ha observat correlació entre els genotips de les soques i els seus patrons de resistència als antibiòtics avaluats.

Cal destacar, també, que en la nostra col·lecció de soques, la CMI₅₀ correspon a un valor susceptible si es determina mitjançant Etest i a un valor de resistent si s'utilitza el mètode de BMD (Taula 13). Per altra banda, el valor de CMI₉₀ determinat pels dos mètodes consisteix en un fenotip resistent, sent 8 vegades menor en Etest que en BMD. En efecte, en termes generals, el número de soques susceptibles a la colistina és gairebé dues vegades superior si es determina per Etest enlloc que per BMD (Taula 13).

Taula 13. Activitat *in vitro* (µg/mL) de sets antimicrobians contra les soques de *S. maltophilia*^a.

Mètode	Agent	Classe o subclasse	CMI ₅₀	CMI ₉₀	Rang	% d'aïllats susceptibles ^b
Etest	Ceftazidima	Cefalosporines	16	>256	1->256	37,7
	Minociclina	Tetraciclines	0,25	0,5	0,032-2	98,3
	Levofloxacina	Fluoroquinolones	0,5	16	0,125->32	70,5
	TMP/SMX	Sulfonamides	0,25	0,5	0,125->32	93,5
	Amikacina	Aminoglicòsids	32	256	2->256	32,8
	Ticarcil·lina-clavulànic	Penicil·lines	64	>256	0,5->256	37,7
	Colistina	Polimixines	2	8	0,064-32	75,4
BMD	Colistina	Polimixines	8	64	<0,25->256	32,7

^aDades extretes dels valors exposats en la Taula 12.

^bEls punts de susceptibilitat han seguit els criteris marcats per EUCAST [151]. En el cas de *S. maltophilia*, només estan disponibles els valors per Trimetoprim-sulfamethoxazol i, és per aquest motiu, que la classificació de susceptibilitat de les soques enfront als altres antibiòtics s'ha dut a terme seguint els criteris proposats per *P. aeruginosa* i, en el cas de la minociclina, s'han utilitzat els valors marcats pels membres bacils gramnegatiu que no pertanyen a la família *Enterobacteriaceae* (≤ 1 µg/mL susceptibilitat i >2 µg/mL per resistència).

El tractament de *S. maltophilia* pot ser problemàtic com a conseqüència dels alts nivells de resistència intrínseca que aquest bacteri pot presentar enfront a diversos agents antimicrobians. Aquesta alta resistència pot ser deguda a diversos factors com ara la baixa permeabilitat de la membrana externa, la producció de β -lactamases, la presència de bombes d'expulsió, enzims modificadors d'aminoglicòsids i el gen de la resistència a la quinolona *Smqnr* [21].

D'acord amb les dades internacionals, els nostres resultats han indicat que el TMP/SMX és un agent antimicrobià eficaç, de manera que sovint és la primera opció per a la teràpia [7], [11], [21]. Encara que les taxes de resistència augmenten, només quatre aïllats del nostre estudi no són susceptibles a TMP/SMX (6,52%), uns resultats que són comparables a altres estudis europeus, on la resistència a TMP/SMX generalment és inferior al 10% [11], [44]. No obstant això, també està reportat que aïllats de pacients de càncer o fibrosi quística de diversos països del món han mostrat taxes de resistència alta a aquest antibiòtic (16-78,8%) [21].

Davant la creixent resistència a TMP/SMX, cal tenir en compte que hi ha altres opcions terapèutiques per a *S. maltophilia* disponibles. Per exemple, cap aïllat del nostre estudi ha estat resistent a la minociclina. Aquesta informació és similar a estudis reportats a Corea [117], [227], Brasil [228], Espanya [50], Taiwan [229], Xina [230], Itàlia [231] i Escòcia [66], fet que suggereix

que la minociclina pot considerar-se una teràpia de primera línia especialment en regions d'alta resistència a TMP/SMX.

Per altra banda, els nostres aïllats han presentat una taxa de susceptibilitat baixa (37,7%) a ceftazidima i ticarcil·lina-clavulànic. Aquest resultat és coherent amb diversos estudis anteriors [44], [227], [229], [232] i demostra que, malgrat la ceftazidima i la ticarcil·lina-clavulànic solien ser els antibiòtics més efectius entre els fàrmacs β -lactàmics contra *S. maltophilia*, hi ha una tendència clara en la disminució de la susceptibilitat.

Les fluoroquinolones són uns altres fàrmacs que s'utilitzen habitualment per tractar infeccions per *S. maltophilia*. La taxa de resistència a levofloxacina presentada en aquest estudi ha estat del 29,5%, similar al reportat per estudis recents [232], [233] i superior a altres estudis més antics [44], [50]. Així doncs, aquests resultats suggereixen que l'augment en l'ús de fluoroquinolones ha estat associat a una disminució de la susceptibilitat d'aquest fàrmac.

En aquest estudi, la major taxa de resistència s'ha observat en l'amikacina (67,2%). Aquest resultat no és sorprenent ja que els aminoglicòsids mostren una activitat deficient contra *S. maltophilia* a causa de l'elevada resistència intrínseca, com ara enzims modificadors d'aminoglicòsids específics i bombes d'expulsió [21].

Finalment, la colistina presenta una bona activitat contra *S. maltophilia* [144], [234], però en aquest estudi, aquest antibiòtic ha mostrat una baixa activitat (32,7%). No obstant això, a la literatura estan reportats diferents resultats en quant a la susceptibilitat *in vitro* a la colistina com a conseqüència de la discordança entre diferents mètodes emprats [21], [235]. Per exemple, en aquest estudi com es veurà més endavant, per una banda, s'obté una susceptibilitat del 75,4% quan s'utilitza el mètode Etest i, per altra banda, una susceptibilitat del 32,7% quan s'utilitza el mètode de la microdilució BMD seguint les recomanacions de la CLSI. A més a més, seguint el mètode recomanat per determinar la susceptibilitat a colistina ha estat difícil definir amb exactitud un valor de CMI per a moltes soques de *S. maltophilia*, uns resultats que estan exposats més detalladament en l'apartat 4.2.

4.1.3. Formació de biofilm

A totes les soques seleccionades com a "úniques" s'ha determinat la seva capacitat de formar biofilm *in vitro* mesurant la quantitat relativa de CV unida al biofilm.

Malgrat que totes les soques han produït biofilm *in vitro*, la quantitat de biofilm ha variat molt entre els diferents aïllats de la col·lecció d'aquest treball. Així doncs, la soca S289-CT11 és la que ha presentat menor capacitat de produir biofilm, mentre que la soca OU110-BE13 és la que n'ha produït més (Figura 14).

La majoria dels aïllats (44,3%, 27/61) han format biofilm considerat moderat, amb un valor relatiu de l'absorbància del CV de $1,14 \pm 0,17$. S'ha observat una formació abundant de biofilm ($1,95 \pm 0,43$) en un 24,6% (15/61) dels aïllats i el 31,1% restant (19/61) han mostrat una formació dèbil ($0,38 \pm 0,24$).

Un cop obtingut els valors anteriorment esmentats, s'han realitzat estudis de correlació entre la capacitat de formar biofilm i les diferents variables relacionades amb les soques "úniques", on s'ha observat que la capacitat de formació de biofilm per part de les soques del tipus *rpfF*-2 (mitjana: 1,30) és significativament superior que la capacitat de les soques del tipus *rpfF*-1 (mitjana 0,09; $p < 0,05$, prova Z) (Figura 14, Taula 14).

La formació de biofilm també s'ha comparat amb el patró de susceptibilitat antimicrobiana i s'ha descobert que les soques susceptibles a ceftazidima són més productores de biofilm que les soques no susceptibles ($p < 0,05$, Prova Z); en canvi, no s'han trobat diferències significatives en els nivells de biofilm per als altres antibiòtics (Taula 14). Pel que fa a les associacions entre diferents grups de països, s'ha observat que les soques aïllades a Bèlgica són més formadores de biofilm que les aïllades a Espanya o Alemanya i, si ens fixem en la font d'aïllament, no s'observen diferències significatives entre els diferents grups (Taula 14).

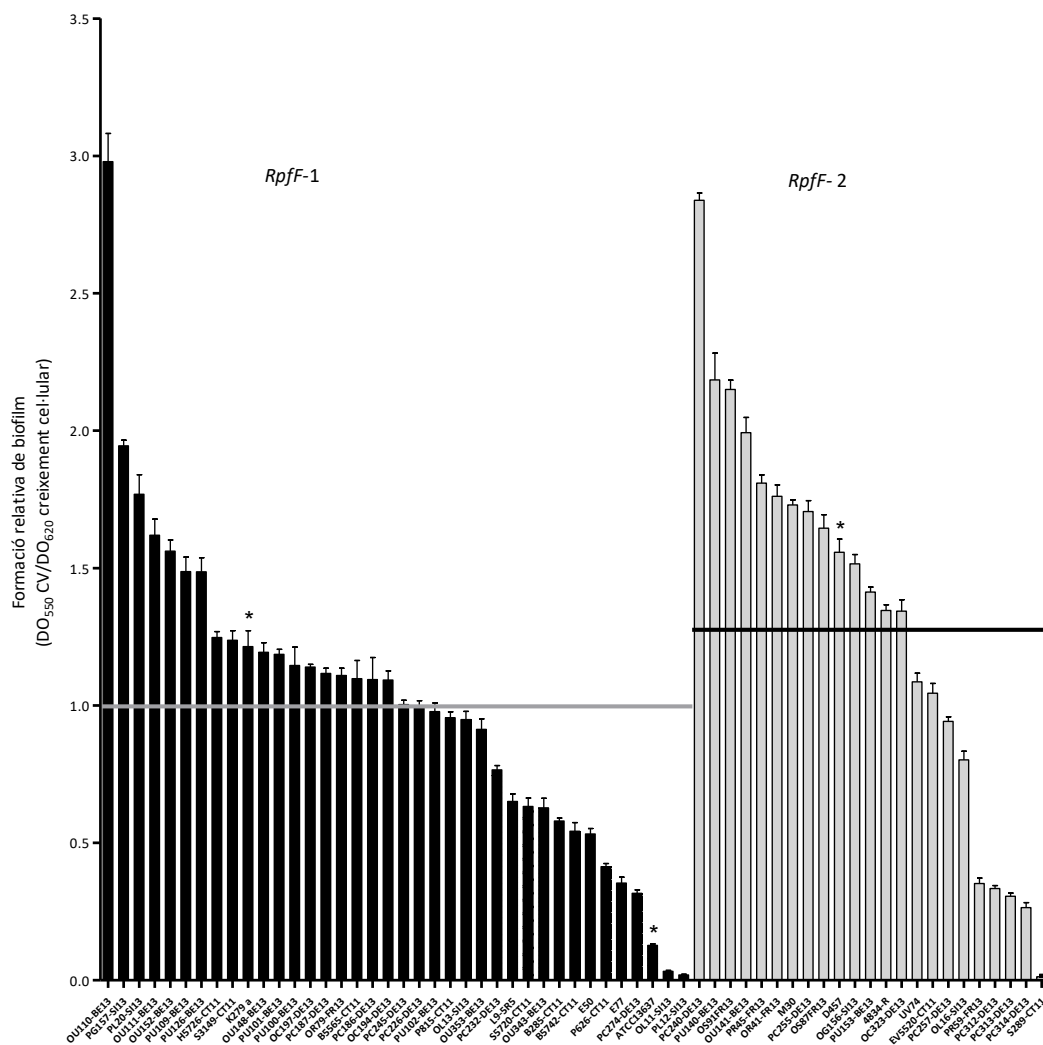


Figura 14. Capacitat de formació relativa de biofilm de les 61 soques de *S. maltophilia* agrupades segons el tipus *rpfF*. Les línies horitzontals representen la mitjana de la formació de biofilm de cada subgrup. Per cada soca, es representa la mitjana de la formació de biofilm amb la seva desviació estàndard. En asterisc (*) estan marcades les tres soques de referència utilitzades en aquest treball.

Taula 14. Anàlisi d'associacions (Prova Z) entre la formació de biofilm i altres paràmetres.

Test d'Hipòtesis (Prova Z)	Z _{calc}	
Rpff ₁₍₁₎ -Rpff ₍₂₎	-1,82	H ₁ : $\mu_1 < \mu_2$
Espanya ₍₁₎ -Alemanya ₍₂₎	-0,63	H ₀ : $\mu_1 = \mu_2$
Bèlgica ₍₁₎ -Alemanya ₍₂₎	1,99	H ₁ : $\mu_1 > \mu_2$
Espanya ₍₁₎ -Bèlgica ₍₂₎	-2,98	H ₁ : $\mu_1 < \mu_2$
Exsudat faringi ₍₁₎ -Perineu ₍₂₎	0,33	H ₀ : $\mu_1 = \mu_2$
MDR ₍₁₎ -Non-MDR ₍₂₎	-1,63	H ₀ : $\mu_1 = \mu_2$
Susceptible CAZ ₍₁₎ -No susceptible CAZ ₍₂₎	2,80	H ₁ : $\mu_1 > \mu_2$
Susceptible LEV ₍₁₎ - No susceptible LEV ₍₂₎	0,52	H ₀ : $\mu_1 = \mu_2$
Susceptible AK ₍₁₎ - No susceptible AK ₍₂₎	0,41	H ₀ : $\mu_1 = \mu_2$
Susceptible TTC ₍₁₎ - No susceptible TTC ₍₂₎	0,34	H ₀ : $\mu_1 = \mu_2$
Susceptible CS ₍₁₎ -No susceptible CS ₍₂₎	0,66	H ₀ : $\mu_1 = \mu_2$

La capacitat de formació de biofilm és considerada un dels factors de virulència bacteriana i diferents estudis han demostrat la participació de molècules de tipus DSF en la regulació del biofilm [236]. Com ja és conegut, la producció i detecció de DSF es regeix pel clúster *rpf*. En estudis previs, s'ha reportat que hi ha dues variants de *rpfF* [101] i, en aquest estudi, s'ha demostrat que el tipus *rpfF-2* té una capacitat de formació de biofilm superior que la del tipus *rpfF-1*. Aquest resultat suggereix que el component genètic dels nostres aïllats també pot influir en la capacitat de formació de biofilm, malgrat que aquesta capacitat és molt variable entre les 61 soques de *S. maltophilia* analitzades (rang OD₅₅₀/OD₆₂₀ entre 0,007 i 3,0). Aquesta variabilitat en la formació de biofilm també ha estat reportada per altres autors [237], [238].

Per altra banda, no s'han trobat correlacions estadísticament significatives entre la formació de biofilm i la resistència a antibiòtics, llevat del cas de la ceftazidima, en el qual, les soques resistents són més formadores de biofilm que les sensibles. D'aquesta manera, els resultats exposats en aquest treball són similars als reportats per Pompilio *et al.* [231] i difereixen dels reportats en un altre estudi [237] en el qual conclouen que els aïllats MDR són més formadors de biofilm que les soques que no són MDR.

4.1.4. Determinació de la virulència en *C. elegans*

C. elegans és un nematode que ofereix grans avantatges: mida petita, temps de generació ràpid, alta fecunditat, manteniment econòmic i capacitat de realitzar proves de detecció i susceptibilitat a patògens humans. A més a més, *C. elegans* comparteix vies immunològiques innates amb humans [239]. Així doncs, per aquestes raons exposades, en el present estudi, la virulència s'ha avaluat mitjançant el model d'infecció en *C. elegans* en condicions de mort lenta, calculant per cada soca bacteriana el temps (en dies) necessari per matar el 50% (LT₅₀) dels nematodes.

Els valors de LT₅₀ del grup de nematodes alimentats amb *E.coli* Op₅₀ utilitzat com a control negatiu ha estat de 14±2 dies i per a les soques de *S. maltophilia* d'aquest estudi aquest valor ha estat molt variable (rang: 3,78-10,51 dies) (Figura 15). Hem considerat que una soca té menor capacitat per matar nematodes quan la seva LT₅₀ és superior o igual a set dies (mitjana de tots

4. Resultats i discussió

els valors de LT₅₀) i que una soca més virulenta és aquella capaç de matar la meitat de la població de cucs en menys de 7 dies. Amb aquest valor de tall, el 50,8% de les soques en estudi són considerades virulentes en aquest model. Cal destacar que l'única soca provinent d'un control ambiental, la soca EV520, és la que ha reportat els valors de virulència més elevats (LT₅₀: 3,78 dies).

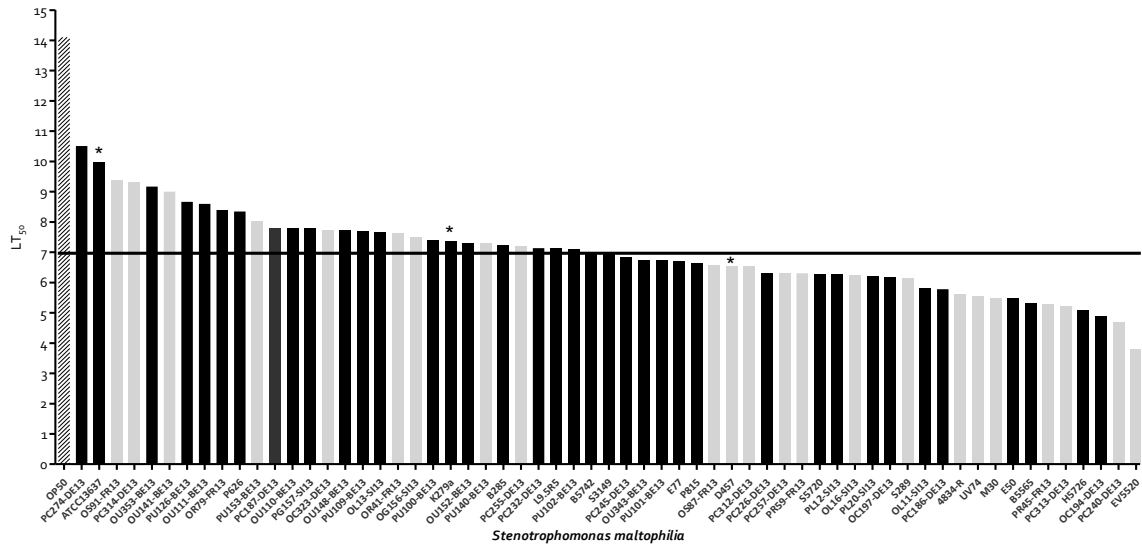


Figura 15. Virulència en el model *C. elegans* de les 61 soques de *S. maltophilia* en estudi basat en el valor de LT₅₀. Es representa la LT₅₀ de cada soca i la línia horitzontal que separa les soques considerades virulentes (LT₅₀ <7dies) de les soques atenuades (LT₅₀ >7dies). En barres negres estan representades els aïllats que posseeixen la variant *rpfF-1* i en gris, la variant *rpfF-2*. En asterisc (*) estan marcades les tres soques de referència utilitzades en aquest treball.

S'ha estudiat si la virulència de les soques en el model de *C. elegans* es correlaciona amb algunes variables ja vistes i, una vegades més, no s'han observat, de manera general, diferències significatives (Taula 15). Si ens fixem en la font d'aïllament, no s'observen diferències significatives entre els diferents grups ni tampoc quan es compara la virulència entre grups amb diferents patrons de susceptibilitat antimicrobiana ni segons la variant RpfF. No obstant això, un cop realitzat el Test Z per estudiar les associacions entre diferents grups de països, s'ha observat que la mitjana poblacional del valor de LT₅₀ de les soques de Bèlgica és inferior a les d'Espanya i Alemanya, fet que podria indicar que les soques aïllades en hospitals belgues són més virulentes que les d'altres països (Taula 15), tot i que aquest resultat s'ha de validar amb un panell més gran de soques clíniques.

Taula 15. Estadística descriptiva i Test Z de la virulència presentada per les 61 soques de *S. maltophilia* en el model de *C. elegans*.

	Freqüència	%	Mitjana (LT ₅₀)
Virulència forta	30	49,2	5,94
Virulència feble	31	50,8	8,02
Total	61	100	
Test d'Hipòtesis (Prova Z)		Zcalc	
Rpff ₁₍₁₎ -Rpff ₍₂₎	1,35	H ₀ : $\mu_1 = \mu_2$	
Espanya ₍₁₎ -Alemanya ₍₂₎	-1,31	H ₀ : $\mu_1 = \mu_2$	
Bèlgica ₍₁₎ -Alemanya ₍₂₎	2,11	H ₁ : $\mu_1 > \mu_2$	
Espanya ₍₁₎ -Bèlgica ₍₂₎	-11,30	H ₁ : $\mu_1 < \mu_2$	
Exsudat faringi ₍₁₎ -Perineu ₍₂₎	1,42	H ₀ : $\mu_1 = \mu_2$	
MDR ₍₁₎ -No-MDR ₍₂₎	0,39	H ₀ : $\mu_1 = \mu_2$	
Susceptible CAZ ₍₁₎ - No-susceptible CAZ ₍₂₎	0,16	H ₀ : $\mu_1 = \mu_2$	
Susceptible LEV ₍₁₎ - No-susceptible LEV ₍₂₎	0,63	H ₀ : $\mu_1 = \mu_2$	
Susceptible AK ₍₁₎ - No-susceptible AK ₍₂₎	1,06	H ₀ : $\mu_1 = \mu_2$	
Susceptible TTC ₍₁₎ - No-susceptible TCC ₍₂₎	-0,62	H ₀ : $\mu_1 = \mu_2$	
Susceptible CS ₍₁₎ - No-susceptible CS ₍₂₎	0,87	H ₀ : $\mu_1 = \mu_2$	

Cal destacar que s'ha trobat una lleugera correlació entre la formació de biofilm *in vitro* i la virulència (Person $r = -0,18$, $p < 0,01$) (Figura 16), fet que indica que com més virulenta és una soca, més biofilm produeix.

Aquests resultats obtinguts són similars als exposats per Mittal et al. [240], els quals conclouen que existeix una forta correlació entre la formació de biofilm i els factors de virulència presentats per soques de *P. aeruginosa* aïllades d'infeccions de tractes urinaris. Així mateix, en bacteris grampositius, un estudi amb *Streptococcus suis* exposa que les soques virulentes desenvolupen major capacitat de formar biofilm que les soques avirulentes [241]. No obstant això, malgrat que la gran majoria d'estudis mostren una correlació positiva entre la capacitat de formar biofilm i la virulència, també hi ha estudis que mostren el contrari, com el cas de Siénko et al. [242], on demostren que soques no formadores de biofilm d'*Enterococcus faecium* posseeixen capacitats de virulència superiors a les soques formadores de biofilm. Finalment cal destacar que en un estudi recent demostren la cooperació entre soques patògenes durant la infecció d'un pacient de quinze anys amb fibrosi quística, on el desenvolupament conjunt de biofilms entre *S. maltophilia* i *P. aeruginosa* incrementa la virulència en l'infecció pulmonar [243].

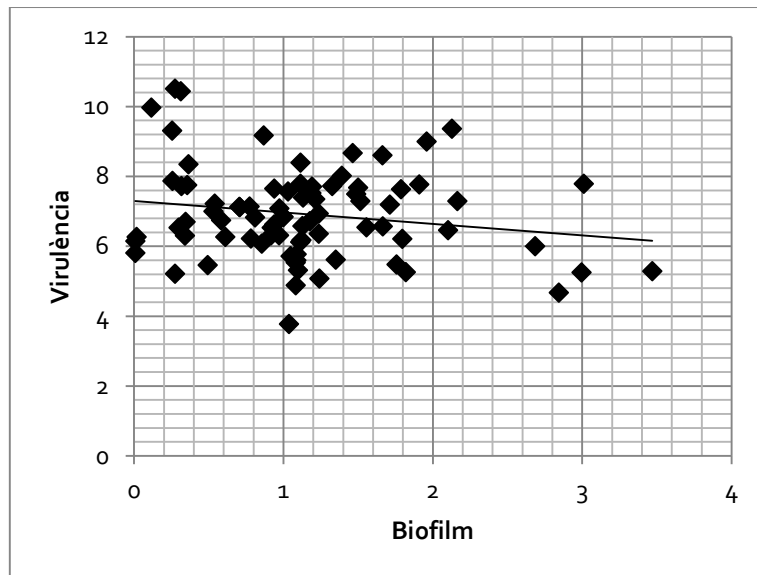


Figura 16. Gràfic de dispersió virulència vs. Biofilm per a les 61 soques estudiades.

L'ús d'invertebrats com a models d'infecció bacteriana està en plena expansió com a conseqüència dels seus avantatges a nivell ètic, logístic i financer [244] i, és per aquest motiu, que en aquesta tesi s'ha avaluat la virulència mitjançant el nematode *C. elegans*. Tot i així existeixen diferents sistemes models en invertebrats per avaluar la virulència de *S. maltophilia* i els resultats obtinguts en aquest treball no es poden comparar amb altres estudis publicats perquè han utilitzat altres invertebrats: *Galleria mellonella* (model nematodes) [231], *Dictyostelium discoideum* i *Acanthamoeba castellanii* (model amoebea) [245] i model de ratolí [91], [238].

No obstant això, en termes generals, la majoria dels nostres aïllats testats no han estat particularment virulents i aquesta conclusió és similar a la reportada per altres autors [91], [245]. A més a més, si ens centrem en la soca K279a, per una banda, els nostres resultats difereixen dels publicats per Fouhy *et al.* [99], que mostren que aquesta soca mata a *C. elegans* en 24 hores; i, per altra banda, White *et al.* [246] informen que K279a no és tan virulenta com s'havia reportat anteriorment i aquests resultats són similars als reportats en aquest treball. A més a més, els nostres resultats han mostrat una dèbil correlació entre la formació de biofilm *in vitro* i la virulència, una correlació també detectada per Pompilio *et al.* [231] tot i que utilitzen el model d'infecció en *G. mellonella*.

4.1.5. Associació dels grups genòmics amb totes les variables fenotípiques estudiades

Per tal de tancar l'apartat de resultats referents a la caracterització fenotípica i genotípica dels 61 aïllats clínics, s'han realitzat estudis d'associació entre les variables fenotípiques analitzades i la component genètica dels aïllats. Així doncs, a partir dels grups genòmics definits en l'arbre filogenètic basat en el MLST (Figura 13), s'ha estudiat l'associació entre pertànyer o no en aquests grups amb altres variables mitjançant un anàlisi univariant utilitzant la Prova Exacte de Fisher (Taula 16). Els grups genòmics #2 i #4 s'han agrupat junts com a conseqüència de les seves similituds genotípiques i fenotípiques. El grup #7, malgrat tenir un grup reduït de soques i

algunes d'elles estar relacionades epidemiològicament, s'ha tractat a part per tenir un patró fenotípic molt particular.

Primerament, s'ha pogut observar que existeix una associació significativa entre els principals grups genòmics basats en les dades MLST i les variants *rpff* (Taula 16), de tal manera que en els grups genòmics #2, #4 i #6, la majoria de soques presenten la variant *rpff-1*, mentre que la variant *rpff-2* és predominant dins dels genogrups #3, #7 i C.

Taula 16. Associació dels grups genòmics amb el tipus de *rpff* i altres fenotips estudiats.

Grups genòmics ^a (nombre de soques)	Nombre de soques							
	Tipus de <i>rpff</i>		Patró de resistència		Biofilm		Virulència	
	1	2	MDR	No MDR	Fort	Moderat o Feble	Forta	Dèbil
#6 (19)	18	1	12	7	2	17	8	11
OR (IC) valor <i>P</i>	19,8 (2,4-162,2) <i>P</i> =0,0004		ns		ns		ns	
#2 i #4 (17)	15	2	14	3	1	16	10	7
OR (IC) valor <i>P</i>	6,8 (1,4-33,6) <i>P</i> =0,017		ns		0,13 (0,017-1,11) <i>P</i> =0,047		ns	
#7 (4)	0	4	4	0	0	4	2	2
OR (IC) valor <i>P</i>	0,056 (0,003-1,1) <i>P</i> =0,017		ns		ns		ns	
C (8)	0	8	3	5	6	2	5	3
OR (IC) valor <i>P</i>	0,023 (0,001-0,43) <i>P</i> =0,0002		0,04 (0,04-0,93) <i>P</i> =0,04		12,0 (2,12-67,8) <i>P</i> =0,0035		ns	
#3 (9)	2	7	8	1	4	5	5	4
OR (IC) valor <i>P</i>	0,13 (0,02-0,68) <i>P</i> =0,02		ns		ns		ns	
Altres (4)	3	1	2	2	2	2	1	3
Total (61)	38	23	43	18	15	46	31	30

^aGrups genòmics agrupats segons la seva posició en l'arbre filogenètic basat en el perfil MLST. L'oportunitat relativa (OR) s'ha calculat mitjançant un anàlisi univariant utilitzant la Prova Exacte de Fisher amb un interval de confiança (IC) del 95%. Es considera estadísticament significatiu amb un valor *P* < 0,05. Per valors 0, la OR s'ha calculat sumant 0,5 a cada valor. Ns: associació no significativament.

En general, no s'han trobat associacions significatives entre els patrons de resistència (MDR o no MDR) i els genogrups basats en MLST, excepte les soques del grup genòmic C que són majoritàriament no-MDR. Per altra banda, tot i que el test estadístic no és capaç de detectar diferències pel nombre reduït d'aïllats, totes les soques del grup #7 són MDR. Tampoc s'ha trobat associació entre la capacitat d'infectar *C.elegans* i els grups genòmics als quals pertanyen les soques.

Si ens fixem en la relació entre la formació de biofilm i els genotips, s'han trobat associacions estadísticament significatives entre pertànyer al grup genòmic C i una alta capacitat de formar biofilm (Taula 16). Per al contrari, la majoria de les soques dels grups genòmics #2, #4, #6 i #7 són formadores moderades o baixes de biofilm, tot i que l'única associació significativa ha estat pels grups #2 i #4. Aquests resultats són d'esperar perquè està relacionat directament amb el tipus de *rpff* que tenen les soques d'aquests grups genòmics com s'ha discutit anteriorment.

Referent a les associacions entre els principals grups genòmics i la susceptibilitat a diferents antibiòtics, s'ha pogut observar que només existeixen associacions significatives amb els antibiòtics ceftazidima i ticarcil·lina-clavulànic (Taula 17). Més concretament, en els grups genòmics #2 i #4 la majoria de les soques són resistents a ceftazidima i ticarcil·lina-clavulànic i, per al contrari, en el genogrup C, les soques són majoritàriament sensibles a aquests dos antibiòtics. A més a més, també és estadísticament significatiu que la majoria de les soques del grup genòmic #6 són susceptibles a ticarcil·lina-clavulànic. Per altra banda, cal destacar que malgrat no s'hagi trobat una associació significativa, tres de les quatre soques resistents a TMP/SMX es troben al genogrup C.

Taula 17. Associació dels grups genòmics amb la susceptibilitat a antibiòtics.

Grups genòmics ^a (nombre de soques)	Nombre de soques											
	CAZ		LEV		TMP/SXT		AK		TTC		CS	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
#6 (19)	7	12	14	5	16	3	6	13	11	8	5	14
OR (IC) valor <i>P</i>	ns		ns		ns		ns		3,438 ⁸ (1,1-10,65) <i>P</i> =0,0452		ns	
#2 i #4 (17)	1	16	12	5	17	0	8	9	2	15	8	9
OR (IC) valor <i>P</i>	0,062 (0,007-0,51) <i>P</i> =0,0012		ns		ns		ns		0,146 (0,029-0,72) <i>P</i> =0,0167		ns	
#7 (4)	0	4	1	3	4	0	2	2	0	4	1	3
OR (IC) valor <i>P</i>	ns		ns		ns		ns		ns		ns	
C (8)	8	0	5	3	8	0	1	7	6	2	1	7
OR (IC) valor <i>P</i>	42,23 (0,007-0,51) <i>P</i> =0,0012		ns		ns		ns		6,353 (1,16-34,83) <i>P</i> =0,044		ns	
#3 (9)	5	4	7	2	9	0	2	7	2	7	2	7
OR (IC) valor <i>P</i>	ns		ns		ns		ns		ns		ns	
Altres (4)	2	2	4	0	3	1	1	3	2	2	3	1
Total (61)	23	38	43	18	57	4	20	41	23	38	20	41

^aGrups genòmics agrupats segons la seva posició en l'arbre filogenètic basat en el perfil MLST. L'oportunitat relativa (OR) s'ha calculat mitjançant un anàlisi univariant utilitzant la Prova Exacte de Fisher amb un interval de confiança (IC) del 95%. Es considera estadísticament significatiu amb un valor *P* < 0,05. Per valors 0, la OR s'ha calculat sumant 0,5 a cada valor. Ns: associació no significativ.

Finalment, els diferents paràmetres analitzats s'han indicat en l'arbre basat en el MLST amb la finalitat de representar com alguns fenotips s'associen als grups genòmics i de detectar visualment altres tipus d'associacions entre els perfils fenotípics i els genotípics (Figura 17). Així doncs, per una banda, apareix reflectida tota la caracterització genotípica mitjançant la denominació dels grups genòmics i especificant si cada soca és del tipus *rpfF* 1 o 2. Per altra banda, pel que fa a la caracterització fenotípica, les variables referents a la formació de biofilm i virulència s'ha transformat en variables categòriques i la susceptibilitat antimicrobiana s'ha exposat segons si són MDR o no MDR (Figura 17).

Algunes dades rellevants que se'n poden extreure de la Figura 17, podrien ser, per una banda, que el grup genòmic C, totes les soques del qual posseeixen la variant *rpfF-2*, està format majoritàriament per soques molt formadores de biofilm i virulentes segons el model de *C. elegans*, però, a la vegada, són soques no-MDR. Per altra banda, podem destacar que el grup genòmic #7, tot i que sigui poc representatiu, està format per soques MDR, *rpfF-2* i poc formadores de biofilm. Una dada rellevant és que els genogrups #2,#4 i #3 contenen una quantitat considerable de soques MDR. Finalment, el grup genòmic amb més aïllats, el #6, al qual pertany la soca de referència K279a, mostra una gran diversitat fenotípica referent als elements de resistència i virulència.

A manera de conclusió, tal i com s'ha pogut observar al llarg de tot aquest apartat, *S. maltophilia* presenta una gran heterogeneïtat genotípica i una gran diversitat fenotípica entre les soques clíniques analitzades. A més a més, de manera general, no existeix associació entre les variables genotípiques i els fenotips de resistència i virulència avaluats, llevat del cas de les soques que presenten la variant *rpfF-2* les quals són més formadores de biofilm. Tanmateix, només existeixen associacions significatives entre alguns genogrups i els antibiòtics ceftazidima i ticarcil·lina-clavulànic. Paral·lelament, s'ha confirmat que els antibiòtics més eficaços contra *S. maltophilia* són, amb ordre descendent, minociclina, trimetoprim-sulfamethoxazol i levofloxacina, malgrat hi hagi un 68,8% de soques MDR, detectant-se altes taxes de resistència a amikacina, ticarcil·lina-clavulànic, ceftazidima i colistina. Cal destacar que un 67,21% dels aïllats són resistents a la colistina, un antibiòtic considerat recentment com a última opció terapèutica i que focalitza l'interès d'aquesta tesi.

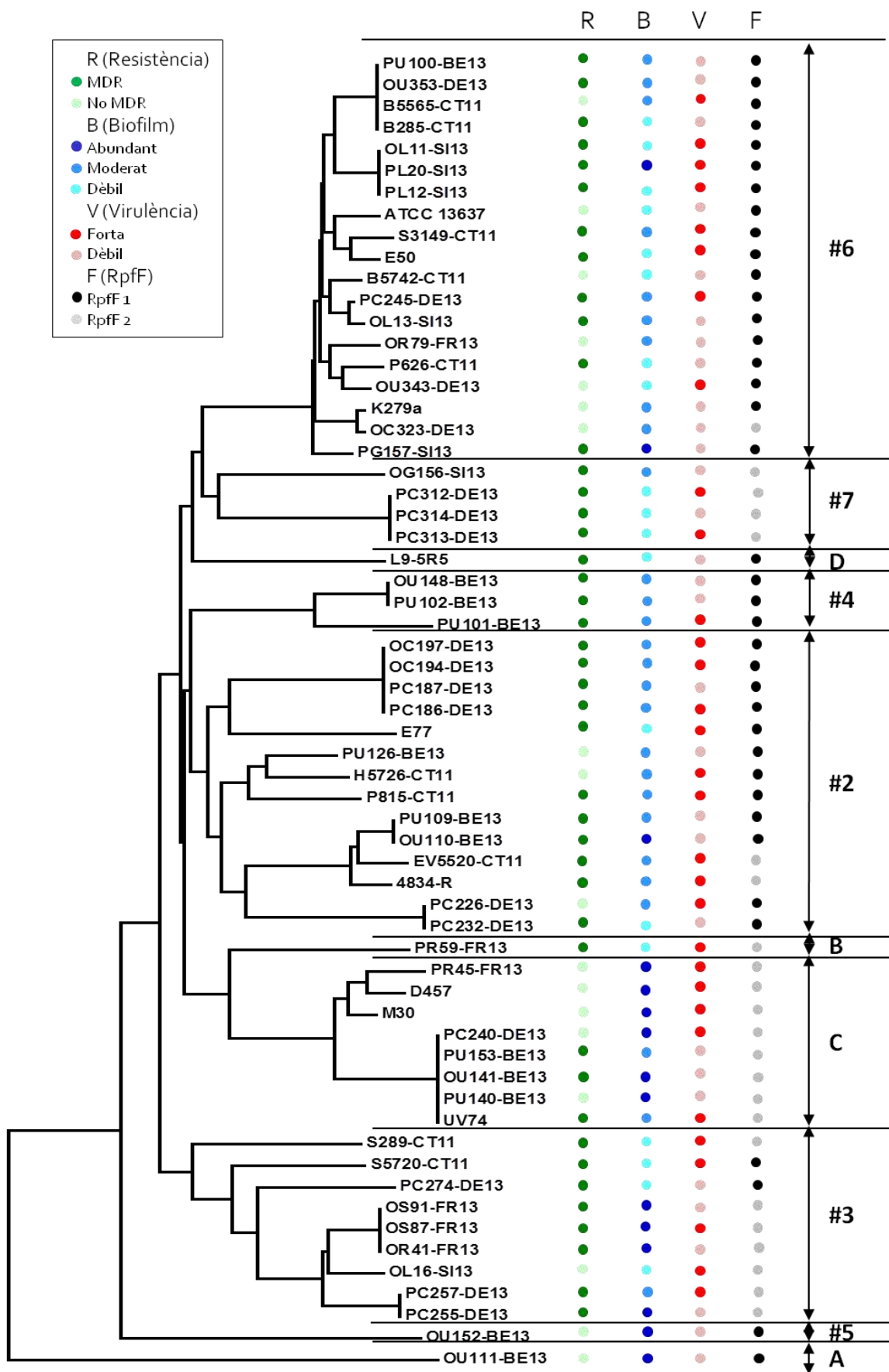


Figura 17. Arbre filogenètic de les 61 soques de *S. maltophilia* amb informació referent a la caracterització genotípica i fenotípica realitzada.

4.2. Estudis fenotípics associats a la resistència heterogènia a la colistina

La CMI dels diferents antibiòtics analitzats al llarg d'aquest treball s'ha determinat mitjançant el mètode Etest, llevat del cas de la colistina, la susceptibilitat de la qual també s'ha avaluat amb el mètode de BMD seguint les recomanacions del CLSI i EUCAST. Com ja s'ha mencionat en l'apartat 4.1.2, la interpretació de la susceptibilitat a la colistina mitjançant el mètode de la microdilució ha estat complicada com a conseqüència la manca de precisió i reproductibilitat en el mètode per a aquesta espècie. A més a més, i com era d'esperar, no hi ha hagut correlació entre els mètodes Etest i BMD. Així doncs, l'objectiu d'aquest apartat consisteix en estudiar quins són els fenòmens que poden estar involucrats en aquesta problemàtica quan es determina la susceptibilitat d'aquest antibiòtic.

4.2.1. Problemàtica en la interpretació de la susceptibilitat a la colistina mitjançant el mètode de referència BMD

La susceptibilitat a la colistina es va avaluar, primerament, utilitzant el mètode BMD seguint les recomanacions CLSI. Malgrat que la microdilució BMD sigui considerat el mètode de referència per a les proves de susceptibilitat a la colistina, la interpretació precisa dels valors de CMI per aquest antibiòtic en *S. maltophilia* resulta complicat com a conseqüència de l'aparició d'una "zona de transició" púrpura/rosada quan es tenyeix amb resazurina. Així doncs, amb l'objectiu d'establir un valor de CMI per a cada soca, seguint les directrius proposades per CLSI, s'han mesurat les densitats òptiques a 550nm de cada pouet, determinant com a CMI de la colistina la primera concentració que presenta una inhibició del creixement \geq al 80% en comparació amb l'absorbància del pouet control sense antibiòtic. Conseqüentment, aquest ha estat el criteri definitiu utilitzat per determinar els valors de CMI de la colistina per tots els aïllats clínics analitzats (Taula 12 i Figures 18 i 19).

Amb l'objectiu d'investigar més a fons la resistència heterogènia a la colistina, s'han seleccionat quatre soques (K279a, M30, D457 i PG57-S113) resistents a colistina que mostren diferents patrons de lectura per Etest, la zona de transició púrpura/rosa en el mètode de BMD i/o diferències significatives entre els valors de CMI per als dos mètodes.

Si ens centrem amb la soca clínica de referència K279a, la càrrega bacteriana present en els pouets de la placa de microdilució confirma l'existència d'una inhibició incompleta del creixement bacterià en la zona de transició púrpura/rosa entre les concentracions de colistina de 32 i 8 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 18). A més a més, s'ha observat que es poden obtenir bacteris viables a concentracions d'antibiòtic fins i tot superiors a les corresponents a la zona de transició anteriorment esmentada, suggerint la presència de mecanismes involucrats en la resistència a colistina a nivell de població.

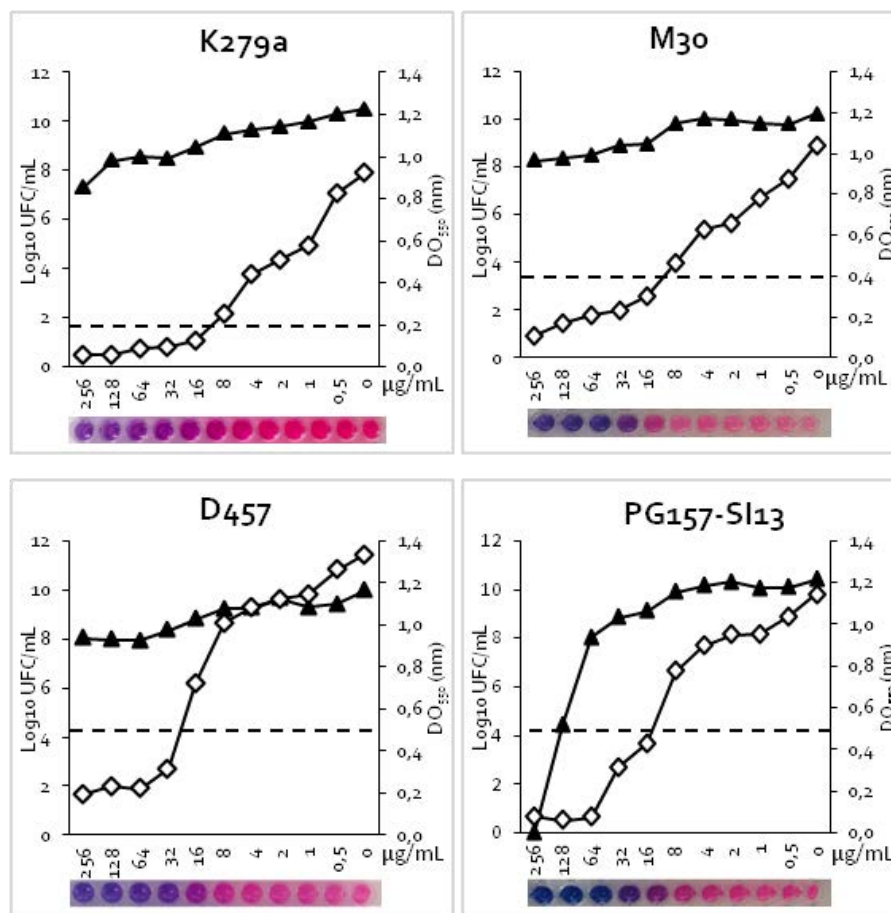


Figura 18. Determinació de la CMI mitjançant el mètode de BMD en medi CAMHB en les soques clíniques colistina resistents: K279a, M30, D457 i PG157-Sl13. S'ha mesurat la densitat òptica a 550 nm (rombe blanc) i les UFC/mL (triangle negre) de cada pouet de la placa de microtitulació després de 24 hores d'incubació a 37°C. Sota de cada gràfic, hi ha una fotografia d'una placa de microdilució amb la determinació de la CMI pel mètode BMD i revelat utilitzant l'indicador colorimètric resazurina. La CMI correspon a la concentració més baixa capaç d'inhibir el 80% del creixement comparat amb el control sense antibiòtic (línia puntejada en el gràfic).

Aquest mateix comportament també s'observa en les altres 3 soques seleccionades M30, D457 i PG157-Sl13 (Figura 18) i, de forma generalitzada es detecta en el 78,7% dels aïllats considerats com soques "úniques" en aquest treball, independentment dels seus genotips, tal i com es mostra en la Figura 19. Cal destacar que la majoria de les poques soques (8 de 11) amb resultats clarament interpretables amb l'assaig de BMD pertanyen als grups genòmics relacionats filogenèticament #6, #7 i D.

Soques	Colistina (µg/mL)												
	>256	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	<0,25
PU140-BE13	CMI												
OU141-BE13	CMI												
PC187-DE13		CMI											
PR45-FR13			CMI										
EV5520-CT11				CMI									
S3149-CT11				CMI									
PC257-DE13				CMI									
PC255-DE13				CMI									
P626-CT11					CMI								
M30					CMI								
OR79-FR13					CMI								
PL20-SI13					CMI								
D457					CMI								
PG157-SI13					CMI								
B5565-CT11					CMI								
PR59-FR13					CMI								
PC232-DE13					CMI								
K279α						CMI							
E50						CMI							
OL11-SI13						CMI							
PU100-BE13						CMI							
PC314-DE13						CMI							
B285-CT11							CMI						
UV74							CMI						
PC312-DE13							CMI						
OL13-SI13							CMI						
PC274-DE13							CMI						
S289-CT11							CMI						
S5720-CT11							CMI						
OS87-FR13							CMI						
PU101-BE13							CMI						
OU148-BE13							CMI						
PC186-DE13							CMI						
OC194-DE13							CMI						
PC313-DE13							CMI						
PC240-DE13								CMI					
OS91FR13								CMI					
P815-CT11								CMI					
B5742-CT11								CMI					
PU102-BE13								CMI					
ATCC13637								CMI					
PC245-DE13									CMI				
OG156-SI13									CMI				
OR41-FR13									CMI				
PU126-BE13									CMI				
4834-R										CMI			
OC197-DE13										CMI			
OL16-SI13										CMI			
PU109-BE13										CMI			
OU353-BE13										CMI			
PC226-DE13										CMI			
OU110-BE13											CMI		
PL12-SI13											CMI		
PU153-BE13											CMI		
OC323-DE13											CMI		
OU343-BE13											CMI		
OU111-BE13												CMI	
OU152-BE13												CMI	
H5726-CT11													CMI
E77													CMI
L9-5R5													CMI

Figura 19. Representació gràfica del resultat de la determinació de la CMI de la colistina de les 61 soques "úniques" de *S. maltophilia* mitjançant el mètode de BMD en placa de 96 pouets amb revelat de resazurina. Els canvis de colors s'observen 30 minuts després de l'addició de resazurina i es representa la zona de transició amb coloració púrpura. En blau es representen els pouets on no hi ha hagut creixement i, en rosa, on sí que hi ha hagut creixement bacterià. La CMI s'interpreta com el primer pou de la placa de microdilució que presenta una inhibició del 80% de creixement en comparació amb l'absorbància (OD₅₅₀) del pou sense antibiòtic.

Davant la problemàtica en la determinació de la CMI de la colistina en bacteris gramnegatius [52], [196], des del març de 2016, en una reunió conjunta CLSI-EUCAST es va acordar que el mètode per determinar la susceptibilitat a la colistina havia de ser la microdilució utilitzant medi CAMHB [194]. No obstant això, aquest mètode segueix portant discordances en la interpretació dels resultats [247] i, fins i tot, molt recentment hi ha autors que suggereixen altres medis per substituir el CAMHB. D'aquesta manera, Gwozdziński *et al.* [248], sostenen que el medi CE-MH és més fàcil de preparar i implementar en laboratoris de diagnòstic de rutina i supera els problemes actuals associats a la BMD. Paral·lelament, com a conseqüència de la variabilitat entre els valors 2–4 µg/mL, hi ha articles recents que recomanen a la EUCAST que incorpori una categoria de susceptibilitat intermèdia [247]. Cal tenir present que la EUCAST proposa com a punt de tall per a la colistina en susceptible ≤ 2 µg/mL i resistent, >2 µg/mL. Tot i així, cada vegada hi ha més estudis que utilitzen i validen mètodes comercials basats en la microdilució per tal d'avaluar la susceptibilitat a la colistina [249]–[251].

4.2.2. Resistència heterogènia observada amb el mètode Etest

La susceptibilitat a la colistina dels aïllats clínics d'aquest treball també s'ha avaluat mitjançant les tires Etest, malgrat que només el mètode de BMD sigui el recomanat per la CLSI i EUCAST. Com era d'esperar, s'han obtingut grans diferències en la interpretació dels resultats (Taules 13 i 18), tal i com ja s'ha reportat anteriorment [52]. Per exemple, per la soca PG157-SI13, el mètode Etest determina que es tracta d'una soca susceptible (CMI de 0,5 µg/mL) i, en canvi, per BMD, la PG157-SI13 seria considerada resistent (CMI de 16 µg/mL) (Taula 18). Recordem aquí que el valor de tall per a determinar si una soca és resistent a colistina s'ha agafat com a CMI >2µg/mL.

Taula 18. Susceptibilitat a la colistina de les quatre soques seleccionades de *S. maltophilia* determinada pel mètode BMD i Etest.

Soca	BMD			Etest		
	CMI (µg/mL) ^a	Zona de transició en BMD ^b (Rang de concentració, µg/mL)	Fenotip	CMI (µg/mL) ^c	Colònies aïllades dins la zona d'inhibició (Rang de concentració, µg/mL)	Fenotip
K279a	16	Sí (8 - 32)	Resistent	4	Sí (0,125 - 4)	Resistent
M30	32	Sí (16 - 256)	Resistent	48	Sí (0,125 - 48)	Resistent
D457	32	Sí (16 - >256)	Resistent	128	Sí (1,5 - 128)	Resistent
PG157-SI13	16	Sí (8 - 32)	Resistent	0,5	Sí (0,125 - 0,5)	Susceptible

^a La CMI s'ha definit com la concentració més baixa d'antibiòtic capaç d'inhibir un 80% el creixement bacterià respecte el control (basat en les mesures de la DO).

^b Coloració púrpura/rosada dels pouets que presenten una inhibició incompleta del creixement.

^c Quan hi ha creixement de petites colònies dins la zona d'inhibició, com a CMI es reporta la concentració més alta.

Per tal de complicar encara més la determinació de la CMI de colistina en *S. maltophilia*, quan s'utilitza el mètode Etest, el patró de lectura de diverses soques resistents a aquest antibiòtic resulta diferent, indicant l'existència d'un comportament bacterià heterogeni enfront a la colistina. El creixement de colònies aïllades resistents dins de la zona d'inhibició dels assajos Etest, vist per exemple en les soques k279a i M30 (Figura 20), és el fenomen més vist entre els aïllats i podria ser un indicador d'heteroresistència [180]. Com un exemple excepcional en la

nostra col·lecció d'aïllats, la soca D457 mostra un doble halus de creixement dins l'el·lipse d'inhibició (Figures 20 i 21). Aquest fenomen també suggereix l'existència d'una resistència heterogènia a nivell de població en aquesta soca. Finalment, com es mostra en la Figura 20, la soca resistent a colistina PG157-S113 no produeix colònies resistents amb CMI $>2\mu\text{g/mL}$ dins la zona d'inhibició malgrat les diferències significatives entre els mètodes Etest i BMD. No obstant això, per a la soca PG157-S113 sí que existeix un fenomen d'heterogeneïtat en resposta a la colistina.

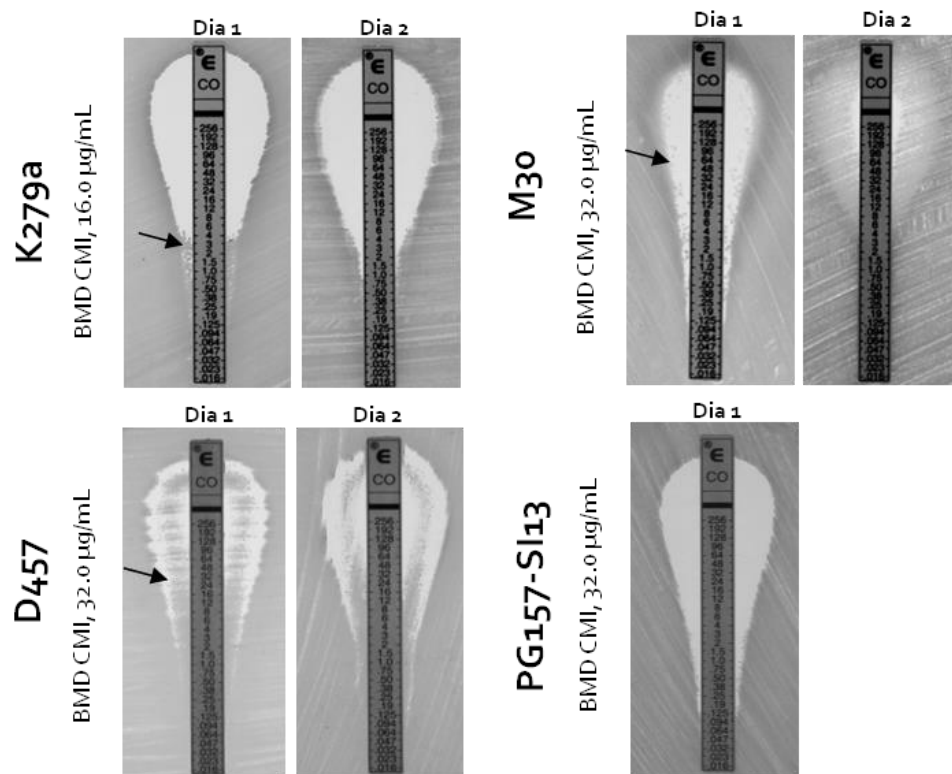


Figura 20. Patró de resistència a colistina amb les tires Etest de quatre soques clíniques de *S. maltophilia* resistents pel mètode BMD (BMD CMI $>2\mu\text{g/mL}$). En el dia 1, una colònia aïllada dins de la zona d'inhibició (indicat amb una fletxa) ha estat seleccionada per fer un Etest successiu, mostrat en el dia 2. En la primera tira de Etest, la soca PG157-S113 no presenta colònies visibles heteroresistents.

Per tal de demostrar si aquestes colònies aïllades representen una població heteroresistent es va realitzar un segon Etest directament a algunes d'aquestes colònies amb l'objectiu d'observar si aquest fenotip es mantenia. Així doncs, primerament, per tal d'analitzar què succeeix quan es realitzen determinacions successives de Etest, s'han tornat a cultivar les colònies que apareixen en la zona d'inhibició de les plaques de Etest de les soques K279a, M30 i D457 en noves plaques fresques de MHA, realitzant novament un anàlisi Etest d'aquestes colònies (Figura 20). Aquest anàlisi s'ha dut a terme sembrant la colònia directament sobre la segona placa de Etest sense un creixement previ en medi líquid.

En el primer Etest de la soca K279a, les colònies aïllades resistents han crescut dins la zona d'inhibició a concentracions inferiors o igual a $4\mu\text{g/mL}$ i només algunes colònies addicionals han aparegut a concentracions superiors després de més de 24 hores d'incubació. No obstant això, quan una d'aquestes colònies a la zona de concentració de $4\mu\text{g/mL}$ és la seleccionada per tornar-se a realitzar l'assaig Etest, no apareixen colònies heteroresistents, almenys fins a 24

hores d'incubació (Figura 20). Aquest comportament bacterià, doncs, podria ser indicatiu d'un mecanisme de resistència adaptativa i no a canvis estables en el genoma del bacteri.

Per altra banda, la soca M30 ha desenvolupat colònies resistents en la zona d'inhibició d'alta concentració d'antibiòtic en el primer anàlisi Etest. Per tal d'avaluar la heteroresistència d'aquesta soca, s'ha picat una colònia resistent propera a la concentració de 48 µg/mL per fer un segon anàlisi Etest. En aquest segon anàlisi, la capacitat de resistència a la colistina s'ha mantingut amb un valor de CMI per tota la població similar a la colònia resistent original, uns resultats esperats d'una soca heteroresistent (Figura 20).

Finalment, la soca D457 ha mostrat un halus d'inhibició doble en el primer assaig Etest. Per tal d'explorar aquest fenomen inusual, s'ha picat una colònia de la zona de creixement interior del doble halus i també una colònia fora d'aquest halus i s'han realitzat Etest (Figures 20 i 21). Curiosament, en els dos casos, el doble halus s'ha mantingut, fet que suggereix que la subpoblació resistent a la colistina no és un fenotip permanent.

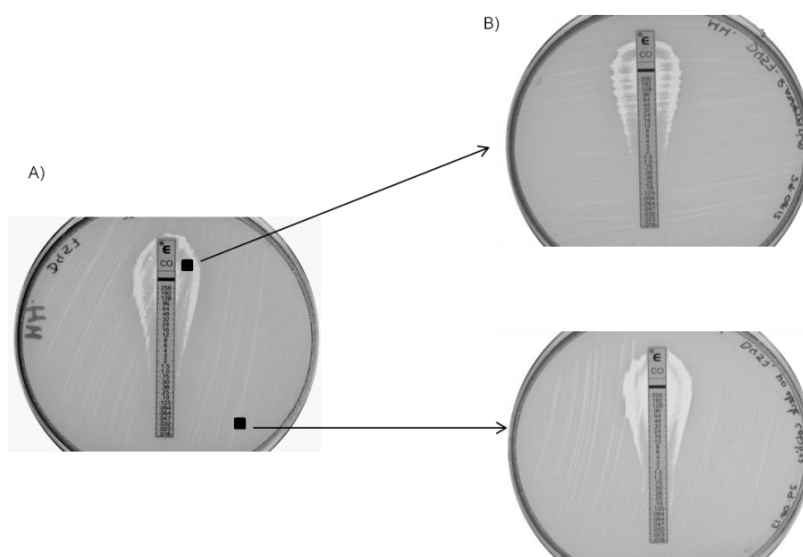


Figura 21. Etest de colistina de la soca D457. **A)** Primer assaig Etest on s'observa l'aparició d'un doble halus d'inhibició. A partir d'aquest assaig se selecciona una colònia de dins de la zona d'inhibició i una colònia de la perifèria i es realitza un segon Etest (**B**), on s'aprecia que el doble halus es manté.

Malgrat que les tires Etest, al ser un mètode de difusió, no estiguin recomanades per a la determinació de la susceptibilitat a la colistina com a conseqüència de les seves taxes d'error inacceptables [252]–[254], en aquest treball han permès observar la presència d'una resistència heterogènia. Aquesta resistència heterogènia a les polimixines observada a partir del mètode Etest també s'han reportat en altres bacteris gramnegatius, com ara, en *B. cenocepacia* [255], *K. pneumoniae* [256] o *E. cloacae* [186]. En *E. cloacae*, curiosament, també s'ha evidenciat l'aparició d'una subpoblació resistent a la colistina en forma de doble halus similar a l'observat en la nostra soca D457 [181].

Així doncs, gràcies a l'estudi de les determinacions successives d'Etest exposades en aquest apartat, s'han pogut proposar diferents mecanismes de resistència a la colistina per als aïllats de *S. maltophilia*, posant de manifest que les soques K279a i D457 presenten una resistència

adaptativa, que la soca M30 és heteroresistent i que la soca PG157-SI13, que no ha mostrat colònies resistents dins la zona d'inhibició de la tira Etest, podria considerar-se una soca resistent a la colistina sense fenòmens clars de resistència adaptativa ni heteroresistència associats. Per aquests motius, s'ha decidit estudiar amb més profunditat els fenòmens que podrien estar relacionats amb la resistència a colistina que apareixen durant les proves de susceptibilitat.

4.2.3. Fenòmens implicats en la resistència a colistina en *S. maltophilia*

Les quatre soques K279a, M30, D457 i PG157-SI13 han estat sotmeses a noves investigacions amb l'objectiu d'avaluar la possible heteroresistència o mecanismes de resistència adaptativa a la colistina en *S. maltophilia*, duent a terme anàlisis de taxes de creixement i assajos PAP (Perfil d'anàlisi poblacional) (Figures 22 i 23) i, d'aquesta manera, confirmar els resultats obtinguts en la determinació d'Etest successius.

En primer lloc, per estudiar el creixement i la resistència adaptativa, després d'una preincubació amb concentracions subinhibitòries de colistina ($1\mu\text{g/mL}$ per les soques M30, D457 i PG157-SI13 i $4\mu\text{g/mL}$ per la K279a), les quatre soques han estat exposades a una concentració d'antibiòtic equivalent a la seva CMI segons el mètode BMD, llevat de la soca D457 que ha estat exposada a una concentració superior (Figura 22). Per una banda, referent a la soca PG157-SI13 no s'observa cap evidència de resistència adaptativa però, per altra banda, les corbes de creixement obtingudes suggereixen el desenvolupament d'una resistència adaptativa en les soques K279a, M30 i D457, malgrat que en els casos de les soques K279a i M30 hi ha hagut una reducció del creixement dels cultius preinduits sotmesos a concentracions inhibítories. Curiosament, la soca D457, un cop en contacte amb qualsevol concentració de colistina, ha estat capaç de créixer; fins i tot, tal i com s'observa en la Figura 22, una subpoblació d'aquesta soca ha començat a resistir l'efecte de la colistina a $256\mu\text{g/mL}$ després de 6 hores d'incubació sense condicions inductores.

Així doncs, aquests resultats indiquen que la preincubació amb concentracions de colistina subinhibitòries adapta una subpoblació a ser resistent a concentracions d'antibiòtic superiors, una conclusió observada en tres de les quatre soques seleccionades.

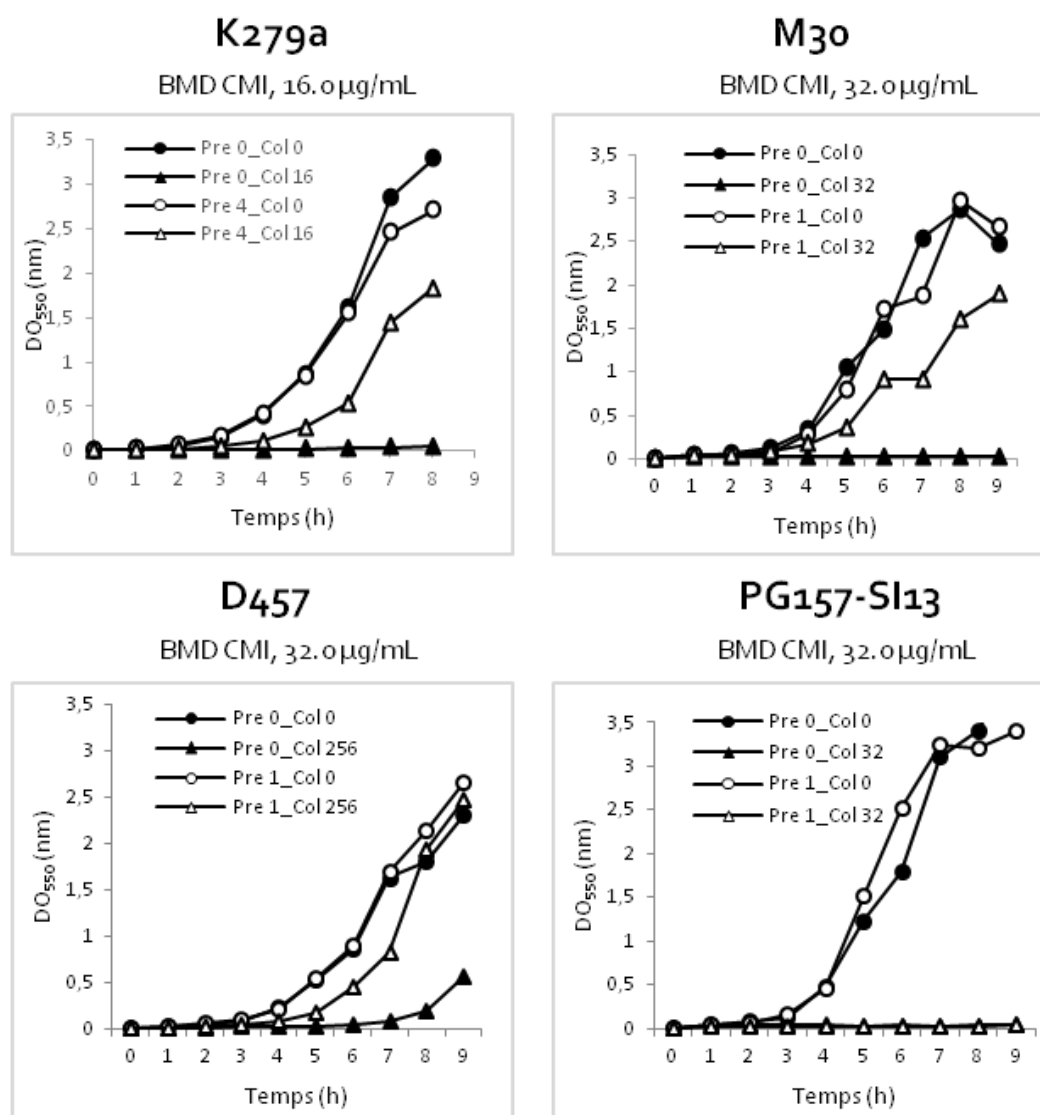


Figura 22. Efecte de la preincubació amb una concentració subinhibitòria de colistina (Pre amb µg/mL) en les corbes de creixement de les soques clíniques seleccionades en medi CAMHB suplementat amb una concentració inhibidòria de colistina (Col amb µg/mL).

Paral·lelament, mitjançant el perfil d'anàlisi poblacional (PAP) s'ha estudiat l'heteroresistència de les soques seleccionades, confirmant-se que les soques K279a, M30 i D457 podrien presentar aquest fenomen (Figura 23). Aquestes soques tenen valors de CMI de 16-32 µg/mL i tenen subpoblacions resistents que han crescut fins a concentracions de 8 vegades superiors a la seva MIC. No obstant això, si les subpoblacions capaces de créixer en plaques de PAP amb les concentracions més altes, són cultivades en un medi lliure d'antibiòtic, la resistència a colistina es restaura als seus nivells originals (Figura 24). És important destacar que aquest fet indica que el suposat fenotip d'heteroresistència observat és reversible en aquestes soques de *S. maltophilia* i no és resultat de mutacions hereditàries estables. Per tant, el fenomen que estem observant en aquestes soques no es correspon amb el concepte descrit d'heteroresistència. Això ja s'ha observat en *E. cloacae*, on els seus autors descriuen aquest fenomen de resistència com a heteroresistència clonal [181].

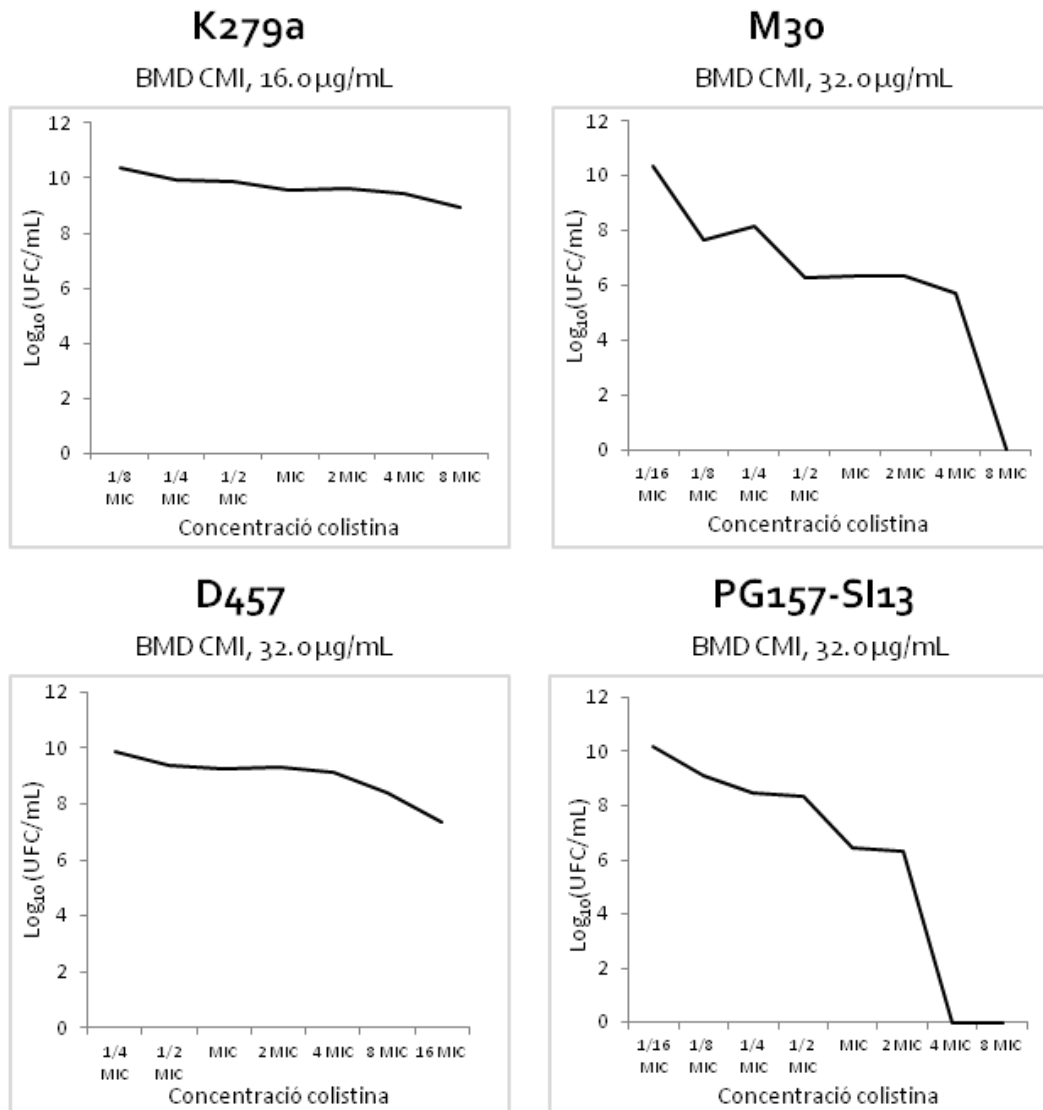


Figura 23. Perfil d'anàlisi poblacional (PAP) de colistina de les quatre soques resistents seleccionades.

La soca PG157-SI13 no conté subpoblacions capaces de créixer en presència de colistina a concentracions superiors a vuit vegades la seva CMI. Aquesta soca no ha presentat cap colònia dins la zona d'inhibició de l'assaig Etest, fet que es corrobora amb els assajos PAP i de corbes de creixement, indicant que alguns aïllats de *S. maltophilia* poden no presentar mecanismes de resistència a la colistina com heteroresistència i resistència adaptativa. Malgrat això, per aquesta soca existeixen diferències entre el mètode BMD i el Etest i presenta una "zona de transició" en la placa de microdilució, un fet que s'ha de continuar estudiant en futurs treballs.

4. Resultats i discussió

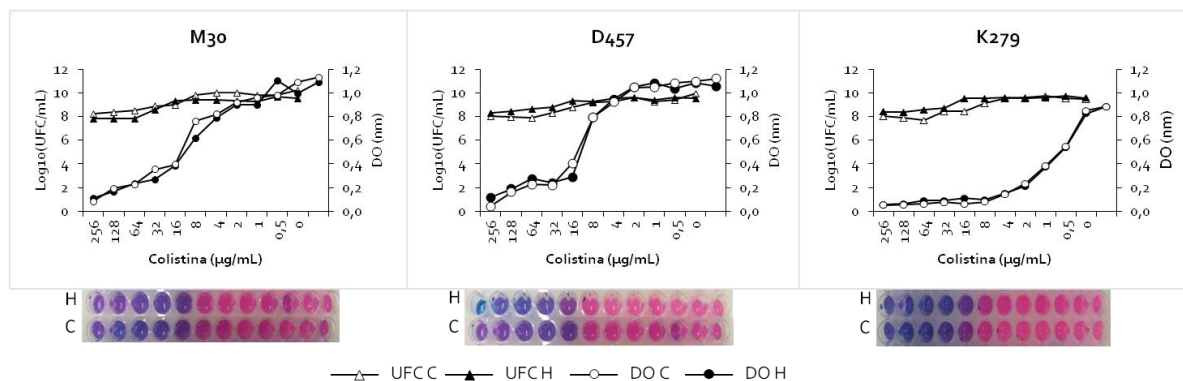


Figura 24. Determinació de la CMI d'una colònia heteroresistent provinent de l'anàlisi PAP (placa amb colistina 256 µg/mL) després de ser cultivada amb medi lliure d'antibiòtic (H) i d'una colònia provinent de la placa PAP sense antibiòtic (C) per a les soques M30, D457 i K279a mitjançant el mètode de microdilució (BMD) amb el medi CAMHB. S'han mesurat la densitat òptica (DO) a 550nm (rodones blanques i negres) i les UFC/mL (triangles blancs i negres). Sota de cada gràfic hi ha representada una fotografia de la determinació de la CMI utilitzant l'indicador colorimètric resazurina

Resumint els resultats obtinguts en aquest apartat, les dades demostren que els aïllats de *S. maltophilia* presenten una varietat de mecanismes de resistència poblacional a la colistina, uns mecanismes combinats que no tots els aïllats presenten, comportant, doncs, l'existència d'una heterogeneïtat fenotípica a la colistina en *S. maltophilia*.

La colistina és un antibiòtic actiu contra bacteris gramnegatius multiresistents, però la resistència adaptativa i la heteroresistència són uns fenòmens de gran importància clínica que ja s'han observat en diferents bacteris com ara *K. pneumoniae*, *A. Baumannii*, *E. Cloacae*, *S. enterica* i *P. aeruginosa* [184]. La importància clínica de l'heteroresistència encara no està clara, però la preocupació continua sent que les subpoblacions més resistents poden ser seleccionades durant la teràpia [180]. L'heteroresistència, altrament anomenada, resistència heterogènia, heterogeneïtat en la resposta a antibiòtics o variació de la resistència en tota la població (population-wide variation of resistance) [257], com s'ha comentat anteriorment, s'ha descrit en diferents bacteris gramnegatius, tot i que la majoria de la literatura està limitada pel fet d'analitzar poques mostres, per la utilització de diferents metodologies per a determinar l'heteroresistència i per la gran variabilitat en les taxes d'heteroresistència detectades [257].

Per altra banda, el primer cas de resistència adaptativa a polimixines es va reportar en *P. aeruginosa* [190]. Des d'aleshores, s'han detectat casos en *E. coli* [191], *A. baumannii* [258] i, recentment, Zavascki *et al.* [259] suggereixen que els fenotips de resistència a polimixina B observats durant el tractament de *K. pneumoniae* podrien ser com a conseqüència d'una resistència adaptativa a polimixina B.

Malgrat que cada vegada hi hagin més estudis que reporten resultats d'heterogeneïtat fenotípica a la colistina, actualment, hi ha una escassetat de dades sobre l'heteroresistència i resistència adaptativa a colistina en *S. maltophilia*. Així doncs, tot i que hi ha casos que mostren que seria convenient tenir en compte l'existència d'aquests fenòmens [188], en el present treball hem estudiat, per primera vegada, resistència heterogènia a colistina en soques clíniques de *S. maltophilia*. Aquesta resistència heterogènia observada no està relacionada amb l'exposició

prèvia a la colistina, tot i que també s'ha demostrat que les soques de *S. maltophilia* tenen capacitat d'adaptar-se a aquest antibiòtic. Per tant, aquests dos fenòmens observats poden conviure en *S. maltophilia* malgrat que el predomini d'aquests sigui heterogeni.

4.3. Determinants genètics associats a la resistència a la colistina

L'objectiu principal d'aquest treball consisteix en estudiar els fenòmens involucrats en la resistència a la colistina en *S. maltophilia* i, al mateix temps, saber quins són els gens que hi podrien estar implicats. En aquest apartat, doncs, es detallaran els resultats obtinguts en la recerca de determinants genètics involucrats en la resistència a colistina, fent, en primer lloc, una selecció de gens candidats en *S. maltophilia* a partir de gens homòlegs descrits en altres espècies i a partir de l'estudi de part del resistoma a colistina en *P. aeruginosa*. Finalment, s'exposaran els estudis fenotípics comparatius entre la soca salvatge K279a i els mutants de quatre gens dianes seleccionats que participen en tres mecanismes diferents de resistència: *smlt2804* i *smlt3571* (homòlegs dels gens *mcr*), *parS* (*smlt3730*) i *smeGH* (*smlt3170-3171*).

4.3.1. Predicció per homologia dels determinants a la resistència a la colistina (resistoma) en *S. maltophilia*

Per fer la predicció dels determinants a la resistència a la colistina en *S. maltophilia*, en primer lloc, es va elaborar un llistat de mecanismes de resistència descrits en altres bacteris per mitjà de la recerca bibliogràfica. Posteriorment, es van obtenir les seqüències de les soques de *S. maltophilia* K279a, M30, D457 i R551-3 de la base de dades de genomes del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) i l'anàlisi de la conservació de les proteïnes homòlogues relacionades amb la resistència a la colistina en altres bacteris va ser realitzada per integrants del grup.

D'aquesta manera, doncs, s'han trobat en les quatre soques resistents seleccionades de *S. maltophilia* molts gens determinants que poden suggerir o demostrar la resistència a colistina en altres espècies, uns gens que s'han comparat amb la soca ambiental de referència R551-3 (Taula 19). Cal tenir present que la soca R551-3 és un aïllat susceptible a la colistina amb una CMI de $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ [19], mentre que les altres quatre soques poden considerar-se aïllats resistents a la colistina amb diferents graus de resistència heterogènia. Els mecanismes trobats inclouen, en la majoria dels casos, modificacions del LPS i, en menor proporció, bombes d'expulsió. A més a més, *S. maltophilia* presenta tres mecanismes reguladors de dos components (PhoP/Q, ParR/S i PmrA/B) que en altres espècies participen en la resistència a colistina.

4. Resultats i discussió

Taula 19. Presència i conservació en *S. maltophilia* de proteïnes homòlogues a aquelles relacionades amb la resistència a la colistina ja estudiades i validades en altres bacteris.

Nom de la proteïna pre dita i funció	Locus Tag (% d'identitat ^a)				
	K279a	D457	M30	PG157-Sl13	R551-3
Reguladors de dos components					
PhoP	Smlt0277	SMD_0261 (100%)	DF40_016020 (100%)	AS591_02870 (100%)	Smal_0229 (100%)
PhoQ	Smlt0278	SMD_0262 (99%)	DF40_016015 (99%)	AS591_02875 (100%)	Smal_0230 (99%)
ParR	Smlt_RS17765*	SMD_3332 (96%)	DF40_011525 (96%)	AS591_03665 (100%)	Smal_3142 (94%)
ParS	Smlt3730 ^b	SMD_3333 (97%)	DF40_011520 (97%)	AS591_03670 (99%)	Smal_3143 (93%)
PmrB	Smlt3948	SMD_3547 (97%)	DF40_001000 (97%)	AS591_04250 (99%)	Smal_3358 (98%)
PmrA	Smlt3949	SMD_3548 (99%)	DF40_001005 (99%)	AS591_04255 (99%)	Smal_3359 (97%)
Modificació i síntesi del LPS					
Phosphoethanolamine transferase EptB (Mcr-1/PmrC) homolog	Smlt3571 ^b	SMD_3146 (97%)	DF40_023100 (96%)	AS591_09745 (98%)	Smal_2995 (95%)
Phosphoethanolamine transferase EptA (Mcr-1/PmrC) homolog	Smlt2804 ^b	SMD_2457 (90%)	DF40_018460 (90%)	AS591_15175 (99%)	No
Putative undecaprenyl-phosphate 4-deoxy-4-formamido-l-arabinose transferase (ArnC)	Smlt0641	No	No	No	No
Undecaprenyl phosphate-alpha-L-Ara4N transferase (ArnT)	Smlt4175	SMD_3774 (81%)	DF40_022365 (81%)	AS591_00155 (99%)	Smal_3582 (87%)
Putative ArnT, undecaprenyl phosphate-alpha-L-Ara4N transferase	Smlt1022	SMD_0972 (95%)	DF40_012320 (95%)	AS591_07215 (99%)	Smal_0865 (96%)
Putative ArnT, 4-amino-4-deoxy-L-arabinose transferase	Smlt3569	SMD_3144 (95%)	DF40_023110 (95%)	AS591_09735 (99%)	Smal_2993 (96%)
Putative lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase	Smlt4167	SMD_3767 (95%)	DF40_022400 (95%)	AS591_00115 (99%)	Smal_3574 (96%)
Putative lipid A biosynthesis lauroyl acyltransferase	Smlt3931	SMD_3534 (98%)	DF40_019400 (97%)	AS591_03380 (100%)	Smal_3346 (98%)
Putative lipid A biosynthesis acyltransferase	Smlt4566	SMD_4100 (98%)	DF40_005775 (98%)	AS591_19255 (99%)	Smal_3918 (99%)
Putative LpxA ortholog, UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase	Smlt1495	SMD_1326 (98%)	DF40_000540 (98%)	AS591_18235 (100%)	Smal_1254 (98%)
Putative LpxC ortholog, UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] N-acetylglucosamine deacetylase	Smlt0761	SMD_0649 (98%)	DF40_004315 (99%)	AS591_11500 (100%)	Smal_0608 (99%)

Continuació Taula 19.

Nom de la proteïna predite i funció	Locus Tag (% d'identitat ^a)				
	K279a	D457	M30	PG157-Sl13	R551-3
Putative LpxD ortholog, UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] glucosamine N-acyltransferase	Smlt1497	SMD_1328 (98%)	DF40_000550 (98%)	AS591_18245 (99%)	Smal_1256 (99%)
Putative LpxR ortholog, 3'-O-deacylase	Smlt4049	SMD_3637 (98%)	DF40_002665 (98%)	AS591_04690 (99%)	Smal_3445 (97%)
Putative LpxO ortholog, aspartyl beta-hydroxylase	Smlt4366	SMD_3953 (96%)	DF40_002535 (96%)	AS591_05770 (100%)	Smal_3770 (98%)
Putative LmtA ortholog, lipid A Kdo2 1-phosphate O-methyltransferase	Smlt2369	SMD_2153 (91%)	DF40_013105 (92%)	AS591_01555 (98%)	Smal_1952 (90%)
Bombes d'expulsió					
AcrB ortholog (SmeE)	Smlt4071	SMD_3657 (99%)	DF40_010340 (99%)	AS591_04795 (100%)	Smal_3467 (96%)
AcrA ortholog (SmeD)	Smlt4072	SMD_3658 (98%)	DF40_010345 (98%)	AS591_04800 (99%)	Smal_3468 (97%)
Small MDR efflux pump KpnEF ortholog (EmrE)	Smlt3363	SMD_2935 (94%)	DF40_013890 (94%)	AS591_17075 (100%)	Smal_2787 (96%)

^aIdentitats de seqüències calculades respecte a K279a.^bDianes seleccionades per a la generació de mutants en K279a.

*Aquest gen s'ha identificat després de la primera anotació d'aquest genoma.

De la mateixa manera que altres bacteris gramnegatius [192], [257], *S. maltophilia* podria haver desenvolupat diverses estratègies per protegir-se de les polimixines, incloent una varietat de modificacions del LPS, com ara modificacions covalents del lípid A amb fosfoetanolamina (P-EtN) i 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa (L-Ara4N) o canvis d'acilació o hidroxilació. L'operó clàssic *arnBCADTEF* que participa en l'addició de L-Ara4N al LPS no sembla estar present en *S. maltophilia*, almenys de la manera que està en altres espècies. Curiosament també, tots els aïllats de *S. maltophilia* resistents a la colistina inclosos en aquest anàlisi comparatiu tenen dues còpies paràlogues del gen que codifica per a una P-EtN transferasa (*smlt2804* i *smlt3571*); en canvi, la soca sensible a la colistina R551-3 només conté un d'aquests dos gens (Taula 19). Precisament, aquests dos gens són homòlegs als gens *mcr* descrits recentment [159] i que han causat un gran impacte en la comunitat científica com a conseqüència de ser el primer mecanisme de resistència plasmídic a polimixines [260]. Així doncs, a causa de la importància i l'interès recent i al fet que algunes soques de *S. maltophilia* presenten dues còpies paràlogues a *mcr*, aquests gens seran estudiats amb més profunditat al llarg d'aquesta tesi.

També és sorprenent que el gen putatiu *arnC* (*smlt0641*) que participa en la modificació del L-Ara4N del lípid A sigui exclusiu de la soca K279a. Finalment, s'han detectat canvis d'aminoàcids en totes les alineacions de proteïnes ortòlogues implicades en la resistència a la colistina (Taula 19), excepte en PhoP que està 100% conservada en les cinc soques. Per contra, PhoQ està conservat en les soques K279a i PG157-Sl13, però, en canvi, s'han detectat mutacions en les soques D457 i M30 (A61S, D154G, A454T i S459A) i R551-3 (E229A, A454T i R469Q).

En nombrosos estudis de diferents bacteris gramnegatius com ara, *A. baumannii* [261], *K.pneumoniae* [262], [263], *E. coli* [264], *S. enterica* [264] o *P. aeruginosa* [265] està reportat que alteracions en els sistemes de dos components PmrA/B i PhoP/Q causades per mutacions puntuals contribueixen a l'increment de la resistència a polimixines. A més a més, en *P. aeruginosa* també s'han descrit altres sistemes de dos components involucrats en la resistència a polimixines, com el sistema ParR/S [190], del qual també s'han identificat mutacions específiques [265]. Així doncs, tal i com és palès en la literatura [147], mutacions puntuals en aquests sistemes globals de dos components tenen una gran importància en el desenvolupament de resistència a la colistina.

4.3.2. Selecció de gens candidats mitjançant la validació del sistema ortòleg en *P. aeruginosa*

Aprofitant la disponibilitat de la biblioteca de mutants de *P. aeruginosa* (llibreria de mutants per transposició de la Universitat de Washington) i a les similituds genètiques i fenotípiques entre les dues espècies, es va decidir estudiar en aquesta espècie alguns dels gens ortòlegs a aquells predits a *S. maltophilia* com determinants de la resistència a colistina. En total, es va avaluar la susceptibilitat a colistina de 43 mutants de *P. aeruginosa* MPAO₁ amb deficiències en els sistemes reguladors de dos components o a les bombes d'expulsió de tipus RND. És conegut que les bombes de tipus RND participen en els mecanismes de resistència a múltiples classes d'antibiòtics [266], però no s'ha vist que participin específicament en la resistència a polimixines. No obstant això, sí que s'ha observat que podrien participar d'una manera indirecta o inespecífica en la tolerància a la colistina [170]. Pels gens de *S. maltophilia* possiblement involucrat en la modificació del LPS no s'ha estudiat els ortòlegs en *P. aeruginosa* perquè, en cas d'haver-ne, ja estaven validats per altres grups.

Un total de 19 mutants, és a dir, la meitat dels gens seleccionats, han donat valors diferents de CMI respecte de la soca salvatge de MPAO₁, el qual és de 4 µg/mL mitjançant el mètode de la microdilució (Taula 20). Més concretament, s'han obtingut un total 4 gens reguladors de dos components i, sorprenentment, 15 de la categoria de bombes d'expulsió RND. D'aquesta manera, s'han validat els tres sistemes reguladors de dos components predits en l'apartat anterior i, particularment, ParS amb una reducció de 4 vegades el valor de CMI per a la colistina.

Taula 20. Valors de CMI de colistina mitjançant el mètode de la microdilució i el mètode Etest d'una selecció de mutants de *P. aeruginosa* MPAO₁ per als gens ortòlegs a aquells predits en *S. maltophilia* com possibles determinants de la resistència a la colistina.

Ortòleg en K279a.	PA ORF	Gen	CMI BMD en µg/mL (Fold*)
Reguladors de dos components			
Smlt0277	PA1179	<i>phoP</i>	2 (2)
Smlt0278	PA1180	<i>phoQ</i>	2 (2)
Smlt3948	PA4777	<i>pmrB</i>	2 (2)
Smlt3730	PA1798	<i>ParS</i>	1 (4)
Sistemes RND (Resistance-Nodulation-Cell Division)			
Smlt4071	PA0426	<i>mexB</i>	2 (4)
Smlt4070	PA4597	<i>oprJ</i>	1 (2)

Continuació Taula 20.

Ortòleg en K279a.	PA ORF	Gen	CMI BMD en µg/mL (Fold*)
Sistemes RND (<i>Resistance-Nodulation-Cell Division</i>)			
Smlt4072	PA4599	<i>mexC</i>	2 (2)
Smlt1830	PA2493	<i>mexE</i>	2 (2)
Smlt1831	PA2494	<i>mexF</i>	2 (2)
Smlt1833	PA2495	<i>oprN</i>	1 (2)
Smlt3171	PA2018		1 (4)
Smlt3170	PA2019		2 (2)
Smlt3925	PA3677		2 (2)
Smlt3788	PA4206	<i>mexH</i>	2 (2)
Smlt3787	PA4207	<i>mexI</i>	2 (2)
Smlt1833	PA4208	<i>opmD</i>	2 (2)
Smlt1831	PA3522		2 (2)
Smlt4281	PA2526		2 (2)
Smlt4279	PA2528		2 (2)

*En relació a la CMI de la soca parental MPAO1 que és de 4 µg/mL mitjançant el mètode BMD.

4.3.3. Diances seleccionades per a la generació de mutants en *S. maltophilia* K279a

A partir dels resultats obtinguts en l'estudi dels gens ortòlegs en *P. aeruginosa* i segons la importància en la literatura descrita, s'ha seleccionat un gen de la categoria de mecanismes descrits en altres espècies (*PA1798-parS*) i un gen de la categoria de bombes d'expulsió de tipus RND (*PA2018-2019-smeGH*) per tal de generar mutants en *S. maltophilia* i estudiar quin paper poden tenir aquests gens en la resistència a colistina.

Paral·lelament, com a conseqüència de la recent descripció a la literatura del primer mecanisme plasmídic de resistència a colistina [159], s'han realitzat també mutants dels gens homòlegs als gens *mcr*. MCR-1 és un membre de la família d'enzims transferasa P-EtN i, a més de ser un gen plasmídic, s'han observat gens P-EtN transferasa cromosòmics en diversos patògens gramnegatius [267]–[269] i, en el cas de *S. maltophilia*, hem observat que moltes soques en tenen dues còpies: *smlt2804* i *smlt3571*. Així doncs, per estudiar l'efecte del gen P-EtN transferasa en la resistència a la colistina s'han realitzat els dos mutants simples i el doble mutant d'aquest gen.

Tots aquests quatre gens candidats representen tres tipus de resistència adquirida possiblement implicats en la resistència a la colistina: reguladors globals, bombes de d'expulsió i modificació del LPS (Taula 21). Tots els mutants s'han realitzat en la soca clínica de referència K279a i els fenotips obtinguts per cada un d'aquests mutants es presenten als apartats següents.

Taula 21. Diances seleccionades per a la generació de mutants en K279a.

Mecanisme de resistència	Locus tag en K279a	Funció putativa o anotació en <i>S. maltophilia</i>	Ortòleg	
Modificació del LPS	<i>smlt2804</i>	Phosphoethanolamine transferase EptA	EptA(PmrC)	<i>E. coli</i>
	<i>smlt3571</i>	Phosphoethanolamine transferase EptB	EptA(PmrC)	
Reguladors globals	<i>smlt3730</i>	Sensor histidine kinase RstB	PA1798 (<i>parS</i>)	<i>P. aeruginosa</i>
Bomba d'expulsió	<i>smlt3170-3171</i>	MDR efflux pump SmeGH	PA2018-2019	

4.3.4. Anàlisi fenotípic de mutants per als homòlegs a *S. maltophilia* dels gens *mcr*

Les soques de *S. maltophilia* seleccionades en aquest treball presenten dues còpies cromosòmiques homòlogues al gen plasmídic d'*E. coli* de la família de gens *mcr*. Aquests paràlegs fan referència als gens *smlt2804* i *smlt3571* de *S. maltophilia* que codifiquen per dues fosfoetanolamina transferases que, hipotèticament, addicionen fosfoetanolamina (pEtN) al lípid A provocant que el LPS esdevingui més catiònic.

Malgrat hi hagi una similitud amb la variant plasmídica de les fosfoetanolamina transferases (gens *mcr*), el veritable ortòleg per als gens *smlt2804* i *smlt3571* sembla ser el gen cromosòmic *eptA* d'*E. coli* també denominat *pmrC* en altres enterobacteris. Els dos paràlegs en *S. maltophilia* són 35,3% indèntics entre ells, i aquests, a la vegada són entre un 32% i un 43% indèntics a les proteïnes EptA(PmrC) i MCR d'*E. coli*. El producte d'expressió del gen *smlt3571* sembla ser el més divergent dels dos respecte als dos membres de la família de les fosfoetanolamina transferases d'*E. coli*.

A continuació, s'exposa l'alineament múltiple realitzat amb el programa ClustalW2 de les proteïnes EptA(PmrC) i MCR d'*E. coli* i *Smlt2804* i *Smlt3571* de la soca *S. maltophilia* K279a (Figura 25). S'aprecien, clarament, regions i motius molt conservats, sobretot en la regió central de les seqüències (entre les posicions 200 i 500 de l'alineament), fet que valida les relacions evolutives entre aquestes proteïnes.

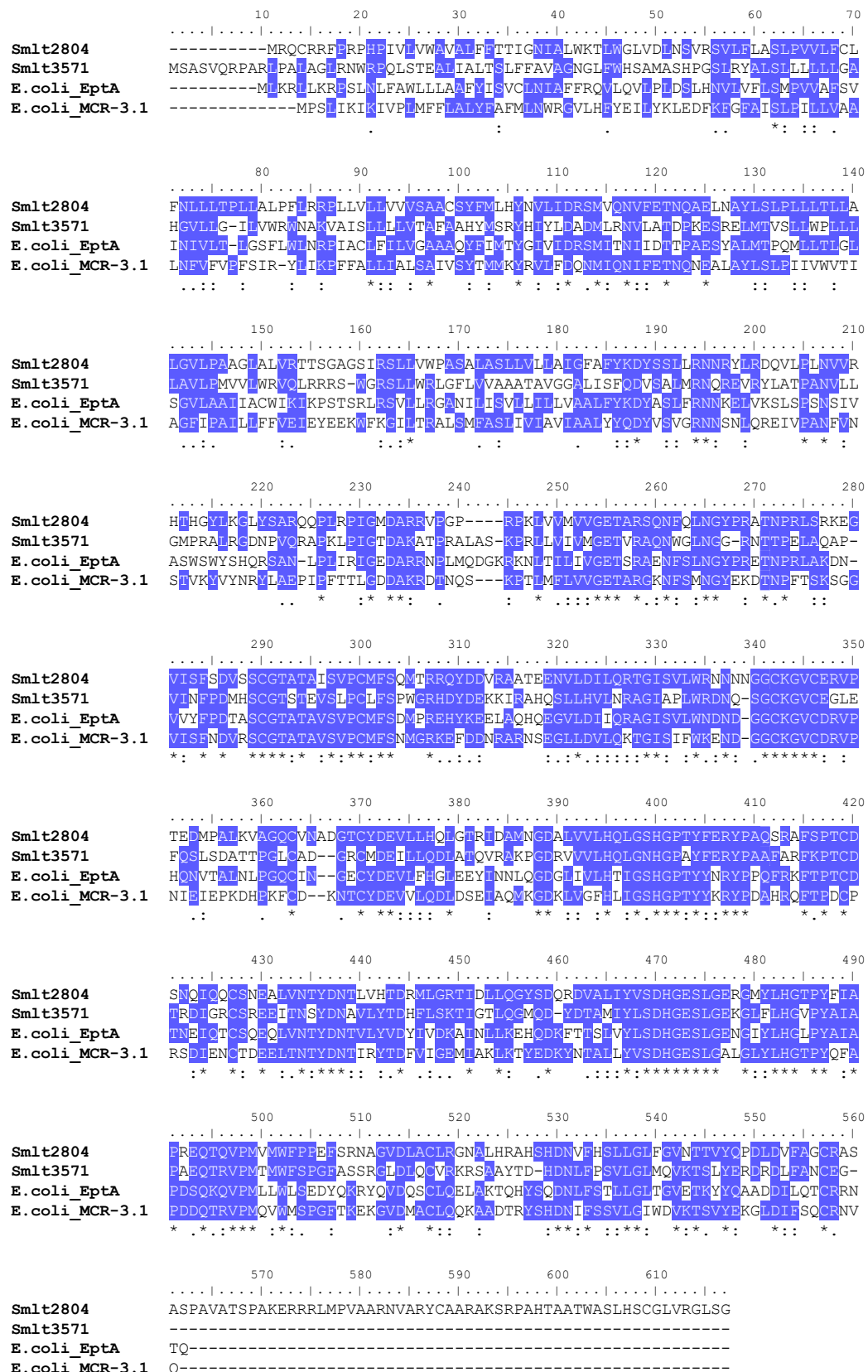


Figura 25. Alineament múltiple entre les proteïnes Smlt2804 i Smlt3571 de *S. maltophilia* i dos fosfoetanolamina transferases de *E. coli*: EptA(PmrC) i Mcr-3.1. Mcr-3.1 és una variant dels gens coneguts com *mcr* (*mobile colistin resistance*). Les posicions idèntiques o similars entre les 4 seqüències s'indiquen amb "*" i ":" o "\.", respectivament. Els aminoàcids que es repteixen en cada posició estan indicats en blau.

Un cop identificats els gens homòlegs a *mcr* en *S. maltophilia*, s'ha procedit a l'obtenció de mutants simples per cada un dels gens identificats en la soca clínica K279a (*K279aΔsmlt2804* i *K279aΔsmlt3571*), a la vegada que un doble mutant per aquests dos gens (*K279aΔsmlt2804Δsmlt3571*) i, a continuació, s'han realitzat diferents proves fenotípiques relacionades amb la susceptibilitat a la colistina. Aquests mutants van ser comprovats per PCR i per seqüenciació de la regió deleccionada.

En primer lloc (Figura 26A), s'ha volgut obtenir la CMI de colistina per cada una de les soques seguint les recomanacions CLSI, on observem que només un dels dos mutants simples presenta una susceptibilitat a la colistina superior a la soca salvatge. Més concretament, només el simple mutant *K279aΔsmlt3571* presenta una CMI 3 vegades inferior, passant d'uns valors de 16 µg/mL de la soca salvatge a uns valors de 2 µg/mL. En canvi, la *K279aΔsmlt2804* presenta la mateixa CMI que la soca salvatge. Si ens fixéssim només en aquests resultats exposats, podríem arribar a la conclusió que només el gen *smlt3571* participa en la resistència a la colistina; no obstant això, el doble mutant *K279aΔsmlt2804Δsmlt3571* presenta dues vegades menys resistència a la colistina que el simple mutant *K279aΔsmlt3571*, obtenint una CMI de 0,5 µg/mL. Per tant, l'efecte en la resistència a la colistina que provoquen els productes d'expressió d'aquests dos gens sobre el LPS sembla ser additiu. Una altra dada interessant és que en el mutant simple *K279aΔsmlt3571* encara s'observa una zona de creixement incomplet en la placa de microdilució (entre 0,5 i 1) que desapareix en el doble mutant.

Curiosament, la soca ambiental de referència R551-3, la qual és sensible a la colistina, presenta només la còpia *smlt3571* (Taula 19) i és, precisament, aquest mutant simple que dona diferències en la susceptibilitat, suggerint que, probablement, és el gen principal en *S. maltophilia* en addicionar fosfoetanolamina al lípid A, comportant un augment de càrrega del LPS i, per la qual cosa, participant en la resistència a la colistina. No obstant això, aquelles soques que tenen les dues còpies del gen fosfoetanolamina transferasa són més resistents als antibiòtics policatiònics perquè, possiblement, l'acció del gen *smlt2804* provoca l'addició de grups P-EtN a diferents llocs de la molècula LPS, com succeeix en *E. coli*, on almenys hi ha tres enzims codificats cromosòmicament de la família de P-EtN transferasa (EptA, EptB i EptC) que participen en les modificacions P-EtN del lípid A i del nucli del LPS [270].

No obstant això, aquesta conclusió exposada podria caure si ens fixem en els resultats exposats en la Figura 26B, on s'ha dut a terme l'avaluació de la susceptibilitat de les soques amb un preinòcul amb concentracions subinhibitòries de colistina (1 µg/mL) per estudiar si hi ha algun fenomen de resistència adaptativa associada amb aquests gens.

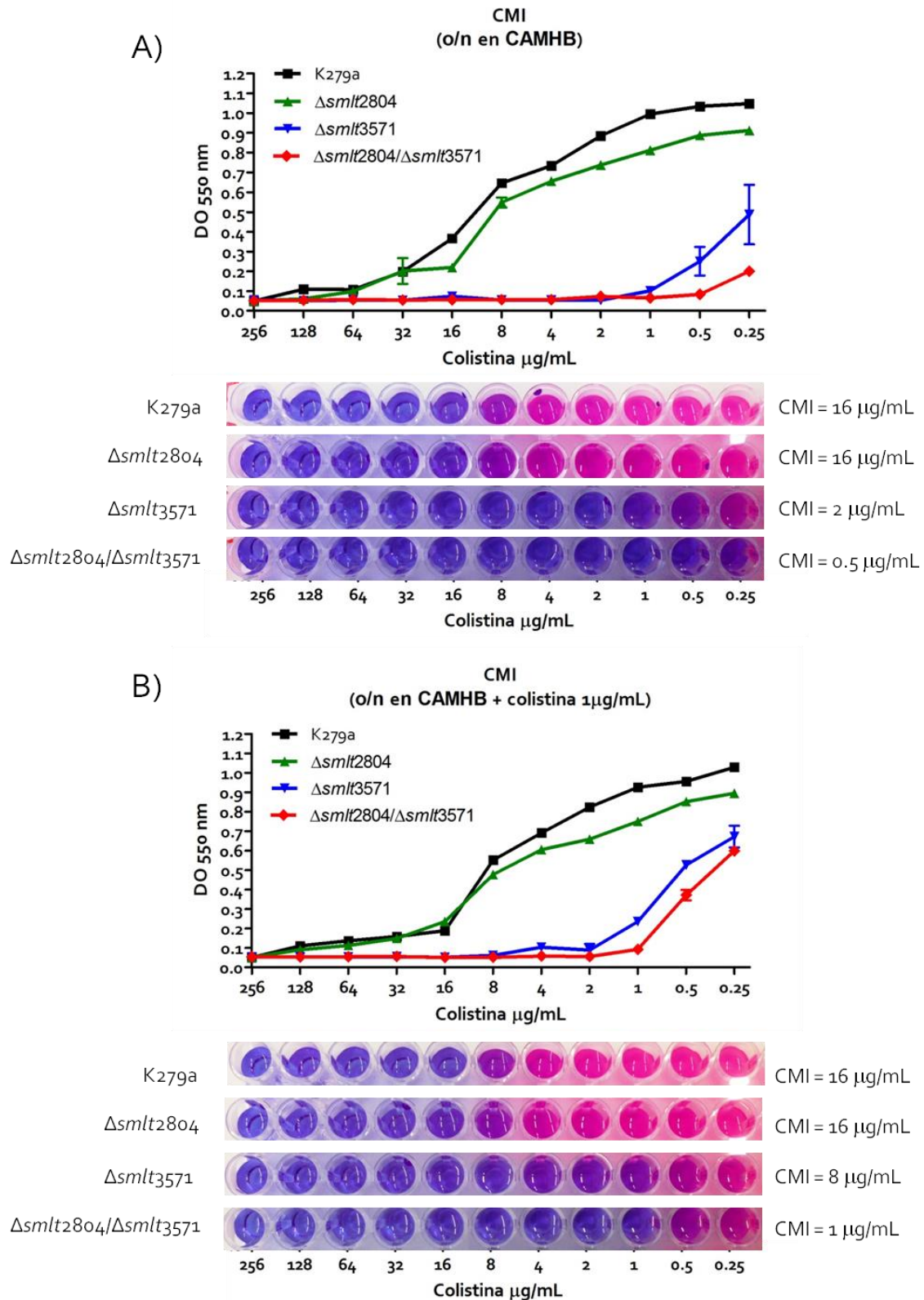


Figura 26. Determinació de la CMI mitjançant el mètode de la microdilució seguint les recomanacions CLSI **(A)** i addicionant 1μg/mL de colistina al preinòcul **(B)** de la soca clínica de referència K279a i els seus mutants K279aΔsmlt2804, K279aΔsmlt3571 i K279aΔsmlt2804Δsmlt3571. A cada un dels pouets, abans del revelat amb resazurina, s'ha mesurat la densitat òptica del cultiu (DO a 550nm) la qual és representada en gràfics a la part superior de la imatge de les plaques revelades.

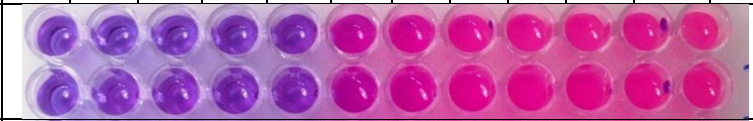

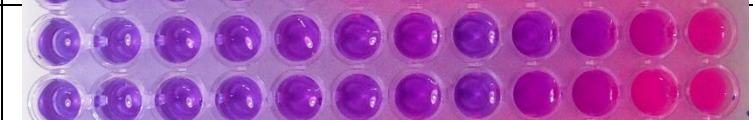

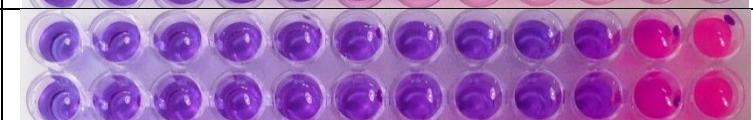

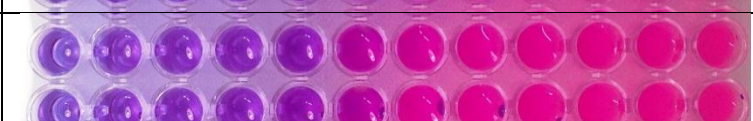

Com es pot apreciar en la Figura 26B, de la mateixa manera que en l'apartat 26A, només s'observen diferències respecte a la soca salvatge en el mutant $K279a\Delta smlt3571$ i en el doble mutant $K279a\Delta smlt2804\Delta smlt3571$. Sorprenentment, però, si comparem els resultats de l'experiment amb preinòcul sense colistina amb els del preinòcul amb colistina, sembla ser que només s'ha adaptat el simple mutant $K279a\Delta smlt3571$, podent arribar a la conclusió que el gen $smlt3571$ no intervé en la resistència adaptativa a la colistina. La CMI d'aquest mutant ha augmentat quatre vegades després de preinduir amb colistina $1 \mu\text{g/mL}$ amb motiu de la presència d'una "zona de transició" en la placa de microdilució de creixement incomplet entre 1 i $4 \mu\text{g/mL}$.

Per al contrari, el doble mutant $K279a\Delta smlt2804\Delta smlt3571$ no s'ha adaptat d'aquesta mateixa manera a l'antibiòtic en estudi i podríem pensar que el gen $smlt2804$ podria estar involucrat en la resistència adaptativa, fet que també ens explica les no diferències observades en el primer experiment entre la susceptibilitat a la colistina de $K279a$ i $K279a\Delta smlt2804$. Per altra banda, si ens fixem només en el simple mutant $K279a\Delta smlt3571$, podríem suggerir que en la resistència adaptativa observada estan intervenint altres sistemes, però aquesta adaptació a l'antibiòtic també s'hauria d'observar en el doble mutant.

Per aquest motiu, i juntament amb tot el que s'ha exposat anteriorment, per primer cop en *S. maltophilia* es presenta un sistema de resistència adaptativa a la colistina en el qual, a partir del gen $smlt2804$, s'addiciona P-EtN al lípid A, quan aquest gen és activat per la presència de colistina fins i tot a dosis molt baixes ($1 \mu\text{g/mL}$). Cal destacar que en aquests estudis fenotípics no es va poder utilitzar la concentració de $4 \mu\text{g/mL}$ utilitzada en el capítol anterior per adaptar la soca $K279a$ perquè amb aquesta concentració els mutants no eren viables.

A continuació, s'exposen els resultats de la complementació dels dos mutants simples així com també del doble complementat amb els seus respectius controls (Taula 22). Si ens fixem amb el simple mutant $K279a\Delta smlt3571$, com ja s'ha exposat anteriorment (Figura 26) el valor de CMI obtingut en la determinació de la susceptibilitat a la colistina mitjançant el mètode de microdilució és tres/quatre vegades inferior al de la soca salvatge, un fenotip que s'ha revertit amb la realització del seu complementat ($K279a\Delta smlt3571/pBBR5\text{-BAD-}smlt3571$). Curiosament, en la determinació de la CMI d'aquest mutant simple s'observa clarament una "zona de transició" o de creixement incomplet que desapareix completament al doble mutant ($K279a\Delta smlt2804\Delta smlt3571$), el qual presenta una CMI de $0,5 \mu\text{g/mL}$ sense problemes d'interpretació. El doble complementat $K279a\Delta smlt2804\text{-}\Delta smlt3571/pBBR5\text{-BAD-}smlt3571\text{-}smlt2804$ reporta el mateix valor que la soca salvatge. Així doncs, amb els resultats mostrats en la Taula 22, s'ha pogut descartar que els fenotips observats en els mutants $K279a\Delta smlt3571$ i $K279a\Delta smlt2804\Delta smlt3571$ són com a conseqüència d'una mutació espontània no detectada en un altre gen o per efecte de la inserció o delecció en gens corrent avall, ja que, mitjançant la complementació, s'ha restablert el funcionament dels gens en qüestió.

Taula 22. Determinació de la susceptibilitat a la colistina mitjançant el mètode de la microdilució de les tres soques mutants K279aΔsmlt2804, K279aΔsmlt3571 i K279aΔsmlt2804Δsmlt3571, complementats i controls.

	Colistina (µg/mL)												MIC
	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0	
K279aΔsmlt2804/pBBR5													16
K279aΔsmlt2804/pBBR5-smlt2804													16
K279aΔsmlt3571/pBBR5-BAD													1-0.5
K279aΔsmlt3571/pBBR5-BAD-smlt3571													16
K279aΔsmlt2804-Δsmlt3571/pBBR5-BAD													0.5
K279aΔsmlt2804-Δsmlt3571/pBBR5-BAD-smlt3571-smlt2804													16-8
K279a/pBBR5													16
K279a/pBBR5-BAD													16

4.3.5. Anàlisi feontípic d'un mutant deficient en ParS en *S. maltophilia*

El sistema ParR-ParS juga un paper decisiu en l'adquisició de resistència adaptativa en pèptids antimicrobians en *P. aeruginosa* [190] i, en aquest apartat, volem estudiar quin rol té ParS en *S. maltophilia*.

A *P. aeruginosa*, el gen *parS* (PA1798), que codifica el sensor quinasa ParS, se suposa que està en cotranscripció amb *parR* (PA1799). Està reportat que el sistema ParR/S és necessari per l'activació de l'operó de modificació del LPS *arnBCADTEF-ugd* en presència de concentracions subinhibitòries de diversos pèptids policatiònics bacterians (polimixina B i colistina) i eucariotes (indolicidina) i, en conseqüència, ser responsable de la resistència adaptativa a aquests pèptids [190]. L'operó *arnBCADTEF-ugd* codifica els enzims responsables de la biosíntesi i la unió de L-Ara₄N al lípid A com a conseqüència de la presència de polimixines. Tal i com s'ha mencionat anteriorment, *S. maltophilia* no posseeix aquest operó *arn*, però sí ortòlegs al sistema regulador de dos components ParR/S (Smlt_RS17765/Smlt3730).

En aquest treball hem construït un mutant per al gen amb locus tag *smlt7370* en la soca K279a, el qual s'ha denominat K279a Δ *parS*. Aquest mutant ha estat comprovat per PCR i per seqüenciació de la regió delecionada.

En primer lloc, s'ha volgut estudiar la susceptibilitat a colistina d'aquest mutant sense l'exposició a altres agents externs. S'ha determinat la CMI mitjançant el mètode Etest i el mètode de la microdilució i, tal i com s'exposa en la Figura 27, no s'observen diferències entre la soca K279a salvatge i el mutant *parS*. A més a més, se segueix observant la presència de colònies aïllades resistents dins l'halus d'inhibició a concentracions menors o iguals a 8 μ g/mL.

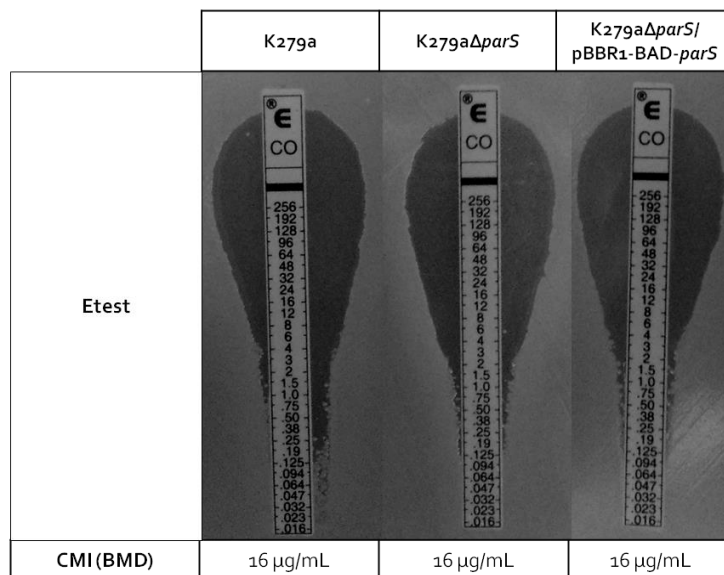


Figura 27. Determinació de la CMI de colistina de la soca K279a i el seu mutant *parS* mitjançant els mètodes Etest i microdilució

Malgrat que els resultats obtinguts en l'avaluació dels mutants de MPAO1 determinaven que el mutant de *parS* en *P. aeruginosa* comportava una reducció de la CMI respecte a la soca salvatge (Taula 20), els resultats mostrats en *S. maltophilia* no són sorprenents si tenim en compte que aquest sistema participa en la regulació de la resistència a colistina quan el bacteri està sota condicions d'estrés (colistina, cations, etc.), de la mateixa manera que les dades recollides per Fernández *et al.* [190] conclouen que ParR/S contribueix exclusivament en la resistència adaptativa als pèptids i aminoglicòsids, però no en la resistència intrínseca.

Per estudiar el paper del sistema ParRS en la resistència adaptativa, a continuació, s'han realitzat corbes de creixement amb i sense exposició prèvia a colistina (Figura 28). Els precultius de la soca salvatge K279a i la soca K279a Δ *parS* s'han cultivat en CAMHB sense colistina i amb concentracions subinhibitòries d'aquest antibiòtic (4 μ g/mL) i, posteriorment, s'han dut a terme corbes de creixement en placa de 96 pouets després de l'addició al temps zero de 16 μ g/mL de colistina, concentració equivalent a la CMI reportada per K279a.

Si ens fixem en la Figura 28, tant la soca salvatge com la soca K279a Δ *parS* amb exposició prèvia a l'antibiòtic són capaces de realitzar una cinètica de creixement normal; en canvi, ambdues soques, sense preincubació amb una concentració subinhibitòria de l'antibiòtic, fins a les 6-8 hores no comencen a créixer.

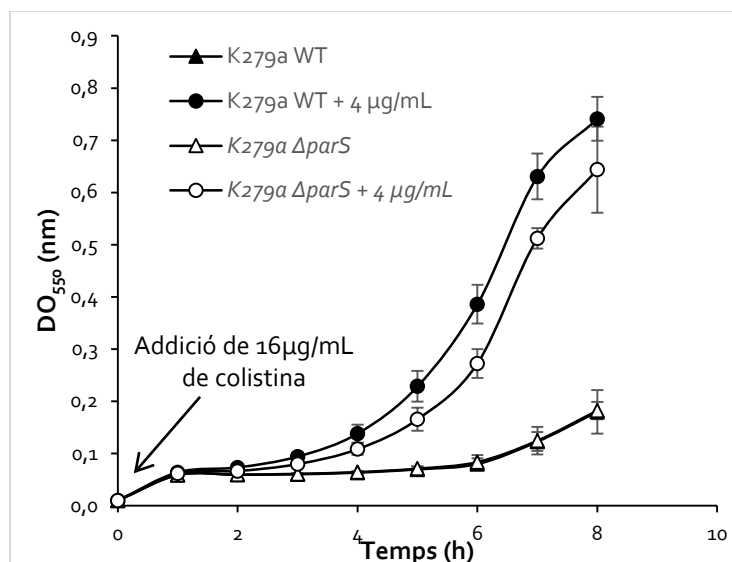


Figura 28. Efecte de la preincubació amb una concentració subinhibitòria de colistina (4 µg/mL) en les corbes de creixement de les soques K279a i K279aΔparS en medi Mueller-Hinton suplementat amb cations i amb una concentració inhibidòria de colistina (16 µg/mL).

Aquests resultats ens mostren, com ja s'ha demostrat en l'apartat 4.2.3 d'aquest treball, que la soca K279a presenta resistència adaptativa a la colistina, una resistència adaptativa també observada en el mutant *parS* i que, per tant, ens portarien a la conclusió que *parS* en *S. maltophilia* no intervé en la resistència adaptativa o, probablement, sí que hi participa (la taxa de creixement del mutant adaptat és lleugerament més baixa que la de la soca salvatge adaptada) però hi ha vies alternatives o compensatòries en el desenvolupament de la resistència adaptativa a la colistina. A *P. aeruginosa* estan descrits cinc sistemes de 2 components que estimulen la transcripció de l'operó *arnBCADTEF-ugd* en resposta a l'exposició a pèptids antimicrobians o a l'esgotament de cations divalents en el medi. Aquests sistemes són PmrAB, PhoPQ, ParRS, ColRS i CprRS i la resistència a colistina pot no dependre exclusivament d'un dels cinc sistemes de dos components descrits [265].

Un altre motiu que ens podria explicar la manca de diferències observada entre K279a i K279aΔparS, podria ser el fet que no tots els pèptids antimicrobians promouen la participació de ParRS per induir l'operó *arn* de modificació de LPS, un fet descrit per McPhee *et al.* [271] en *P. aeruginosa*, i que en *S. maltophilia* podria ser que la colistina emprada no provoqui l'activació del sistema ParRS.

Finalment, s'ha volgut estudiar quin paper juga el catió magnesi en la regulació del sistema ParR/S en *S. maltophilia*. Així doncs, s'ha avaluat la susceptibilitat de la soca salvatge i de la soca *parS* mutant mitjançant el mètode de la microdilució en medi BM2 amb dues concentracions de magnesi diferents (20µM i 2 mM). En aquest cas, com que es vol estudiar l'efecte del magnesi en la susceptibilitat a la colistina, enlloc d'utilitzar-se el medi CAMHB, s'ha emprat el medi mínim BM2 que conté una baixa concentració magnesi.

Per cada una de les soques i per cada concentració de magnesi, la CMI s'ha avaluat a partir de dos preinòculs diferents: un sense incubació amb colistina i l'altre amb preincubació amb concentracions subinhibitòries de l'antibiòtic (Taula 23).

Taula 23. Determinació de la CM de colistina amb el mètode de microdilució amb medi BM2 suplementat amb 2mM o 20µM de magnesi de la soca K279a i el mutant K279aΔ*parS* amb preincubació sense antibiòtic o bé amb concentracions subinhibitòries de colistina (2µg/mL).

Medi BMD	Soca	Precultiu colistina	CMI (µg/mL)
BM2 + 2mM de magnesi	K279a	0 µg/mL	16
		2µg/mL	128
	K279aΔ <i>parS</i>	0 µg/mL	16
		2µg/mL	32
BM2 + 20µM de magnesi	K279a	0 µg/mL	16
		2µg/mL	16
	K279aΔ <i>parS</i>	0 µg/mL	16
		2µg/mL	16

Els resultats exposats a la Taula 23 ens mostren que el sistema ParR/S només intervé en la resistència a la colistina quan a l'ambient hi ha presència de magnesi (2mM) i només s'observen les diferències en la CMI quan les soques K279a i K279aΔ*parS* han estat preincubades amb una concentració subinhibitòria (2 µg/mL) de colistina. En aquest cas, la soca salvatge amb exposició prèvia a la colistina adquireix uns nivells més alts de resistència, fet que suggereix que s'ha adaptat a aquest antibiòtic i, en canvi, amb delecció del gen *parS*, aquesta adaptació no és tan notòria. Per contra, tant la soca salvatge com la soca mutant presenten la mateixa CMI si no han estat prèviament en contacte amb l'antibiòtic. Curiosament, aquests resultats exposats només s'observen quan al medi hi ha la concentració més alta de magnesi provada (2 mM) i és, precisament, a la concentració que es troba de magnesi en el cos humà (1 a 2 mM) i quatre vegades més que en el medi CAMHB recomanat per mesurar la susceptibilitat a colistina. En concentracions inferiors de magnesi no s'observen diferències entre la soca salvatge i la soca mutant i és un dels altres motius que expliquen el perquè en la figura anterior (Figura 28) en les corbes de creixement no s'han observat gaires diferències entre K279a i K279aΔ*parS*, ja que en aquell experiment no hi havia concentració de magnesi notòria, sinó que s'havia realitzat en medi MHB amb ajustament de cations segons les recomanacions CLSI (12,5 mg/L final de Mg⁺⁺).

Així doncs, amb els resultats exposats en aquest apartat podem concloure que, per primera vegada, s'ha descrit el paper que té el sistema ParR/S en *S. maltophilia* el qual, de la mateixa manera que *P. aeruginosa* [190], [272], només s'activa en presència de magnesi i pèptids antimicrobians en dosis subinhibitòries, tenint doncs, un paper clau en la resistència adaptativa a la colistina. En *P. aeruginosa*, la resistència adaptativa a polimixines està més descrita i la literatura exposa que els sistemes reguladors de dos components PmrA/B, PhoP/Q, ParR/S i CprR/S estimulen la transcripció de l'operó *arnBCADTEF* que modificarà el LPS com a resposta a l'exposició a pèptids antimicrobians o a l'esgotament del catió divalents [265], de la mateixa manera que també intervenen la bomba d'expulsió MexXY i la porina OprD [272]. En aquest treball només s'ha descrit el rol de *parS* en *S. maltophilia* i, per tant, són necessaris més estudis per tal de comprendre la base molecular del complex sistema de resistència adaptativa a la colistina en *S. maltophilia* ja que, molt probablement, intervenen altres components com en el cas de *P. aeruginosa*.

4.3.6. Anàlisi fenotípic d'un mutant deficient en la bomba d'expulsió SmeGH en *S. maltophilia*

Les bombes d'expulsió són proteïnes de transport implicades en l'expulsió de substàncies tòxiques de la cèl·lula que contribueixen en la resistència intrínseca a antibiòtics. *S. maltophilia* posseeix una gran resistència a la majoria d'antibiòtics d'ampli espectre, en gran part, per la presència d'aquestes bombes d'expulsió. La seqüenciació del genoma de la soca K279a ha revelat la presència de 8 bombes de tipus RND [9], anomenades, SmeABC, SmeDEF, SmeGH, SmeIJK, SmeMN, SmeOP, SmeVWX, i SmeYZ, de les quals, 6 (SmeABC, SmeEF, SmeIJK, SmeOP, SmeVWX i SmeYZ) ja ha estat caracteritzades anteriorment [21], [74]. Conseqüentment, en aquest treball, les bombes SmeGH i SmeNM eren les candidates inicials a ser estudiades més a fons per tal de poder descriure quin paper tenen en la resistència als antibiòtics en *S. maltophilia*. No obstant això, després dels resultats obtinguts en l'estudi de determinants de la resistència colistina en *P. aeruginosa* (Taula 20), els mutants de la bomba GH (PA2018-PA2019) presenten uns valors més interessants respecte a la resistència a la colistina que els mutants de la bomba MN (PA4206-PA4207) i, per la qual cosa, es procedeix a l'obtenció del mutant *smeGH* en *S. maltophilia* K279a (*K279aΔsmeGH*) per a la seva posterior avaluació fenotípica.

Un cop construït i comprovat per seqüenciació el mutant *K279aΔsmeGH* sobre la soca de referència K279a, s'ha avaluat la seva susceptibilitat antimicrobiana mitjançant el mètode de la microdilució a deu antibiòtics diferents. Tal i com s'observa en la Taula 24, en 6 dels 10 antibiòtics no s'observen diferències en els valors de la CMI entre la soca salvatge i el mutant *smeGH*, unes diferències sí observades amb els antibiòtics amikacina, gentamicina, ciprofloxacina i levofloxacina. Per aquests quatre antibiòtics, el mutant *K279aΔsmeGH* presenta una CMI inferior respecte la soca salvatge. Curiosament, la soca salvatge i la soca mutant presenten la mateixa susceptibilitat a la colistina, uns resultats diferents als observats en aquest treball i també descrits per Pamp *et al.* [170] en *P. aeruginosa* i que van comportar l'elecció d'aquesta diana.

Taula 24. Susceptibilitats antimicrobianes de la soca K279a i el seu mutant de delecció per als gens *smeGH*.

Classe o subclasse	Agent	CMI (µg/mL)	
		K279a	K279aΔsmeGH
Aminoglicòsids	Amikacina	16	8
	Gentamicina	8	4
Fluoroquinolones	Ciprofloxacina	8	4
	Levofloxacina	32	16
Tetraciclins	Minociclina	0,5	0,5
	Tetraciclina	64	64
Cloramfenicol	Cloramfenicol	128	128
Polimixines	Colistina	16	16
Inhibidors de la ruta de l'àcid fòlic	Trimetoprim-sulfametoxazol	8	8
Penicil·lins	Piperaciclina	>512	>512

La bomba SmeGH és una bomba de tipus RND molt estudiada en altres gramnegatius. *P. aeruginosa* posseeix 12 bombes de la família RND, de les quals, 4 contribueixen de manera molt significativa en la resistència als antibiòtics: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN i MexXY-OprM.[273]. MexB, homòleg de SmeH, té un ampli espectre de substrats que inclou grans (per exemple, eritromicina –macròlid) i carregades (per exemple, colistina i aztreonam) molècules, transportant β -lactàmics, aminoglicòsids, fluoroquinolones, macròlids, penicil·lines, tetraciclins, sulfonamides, desinfectants, solvents, detergents.... i diverses homoserin lactoses implicades en el *quorum sensing*. En *E. coli*, la sobreproducció de la bomba ArcAB-TolC, homòloga de la bomba MexAB-OprM en *P. aeruginosa*, provoca que la CMI de diversos agents antimicrobians es vegi afectada [274].

Així doncs, els homòlegs de la bomba SmeGH en altres bacteris gramnegatius són bombes poliespecífiques, una poliespecificitat no observada en els nostres resultats, en els quals es conclou que la bomba SmeGH de *S. maltophilia* només presenta una interacció notable amb fluoroquinolones i aminoglicòsids. La resistència a fluoroquinolones per mitjà de l'acció de bombes d'expulsió també s'ha descrit en altres bombes de tipus RND en *S. maltophilia*, més concretament, en les bombes SmeABC, SmeDEF, SmeIJK i SmeVWX [133], [136], [137], [275], [276]; i la resistència a aminoglicòsids s'ha descrit en les bombes d'expulsió SmeABC, SmeDEF, SmeIJK, SmeOP, SmeYZ i SmeVWX [123], [133], [137], [277]–[279]. A aquestes llistes de bombes d'expulsió que confereixen resistència a les quinolones i aminoglicòsids, gràcies als resultats d'aquest treball, es pot afegir la bomba SmeGH. En efecte, tant les fluoroquinolones com els aminoglicòsids com a conseqüència de la seva afinitat a un gran nombre de bombes d'expulsió i per la presència de mecanismes específics, no serien uns antibiòtics recomanats per al tractament de les infeccions causades per *S. maltophilia*.

A més a més dels rols coneguts en l'extrusió d'antibiòtics, les bombes del tipus RND són cada vegada més reconegudes com a components associats a la fisiologia bacteriana i a la virulència [279]. Per exemple, la inhibició de les bombes d'expulsió afecta la formació de biofilm en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [280].

Mitjançant l'assaig de la determinació de la formació de biofilm amb cristall violeta s'ha quantificat el biofilm format de la soca salvatge i el mutant per als gens *smeGH*. El mutant K279a Δ *smeGH* ha presentat menor capacitat de produir biofilm (OD_{550}/OD_{620} : $0,51 \pm 0,38$) que la soca salvatge (OD_{550}/OD_{620} : $1,45 \pm 0,26$) ($P < 0,0001$), comportant una reducció del 64% (Figura 29). Aquests resultats són similars als reportats per a la bomba SmeYZ [279] i que indiquen que les bombes d'expulsió tenen un paper central en la biologia dels bacteris, on no només tenen funcions en la resistència a diferents antimicrobians, si no que també estan involucrades indirectament en la supervivència, colonització i virulència dels mateixos.

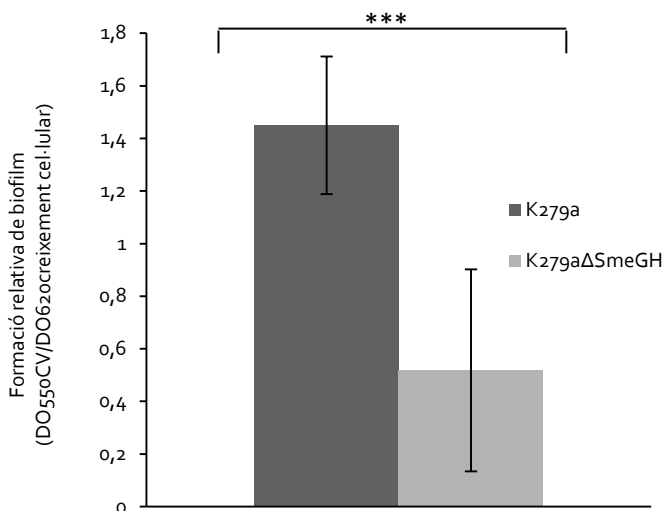


Figura 29. Formació relativa de biofilm de la soca K279a i el seu mutant SmeGH en medi MHB a 37°C. Es representa la mitjana de deu assajos independents. ***, $P < 0,0001$.

Malgrat que alguns antibiòtics són capaços d'inhibir o desfer els biofilms formats per bacteris gramnegatius [85], [281], hi ha nombrosos estudis que mostren que alguns antibiòtics en baixes concentracions poden induir significativament la formació de biofilms [282]. Així doncs, paral·lelament a la comparativa entre la soca K279a i el mutant K279aΔ*smeGH* pel que fa a la determinació de la CMI i a la formació de biofilm, en aquest treball s'ha volgut investigar quin és l'efecte de la presència de diferents antibiòtics en la formació de biofilm *in vitro* en *S. maltophilia*. Per aquest motiu, en la pròpia placa de microdilució on es va determinar la susceptibilitat als antibiòtics, es va retirar el medi de cultiu després d'estimar el valor de CMI i es va calcular la quantitat de biofilm enganxat a les parets dels pouets. S'ha calculat la formació de biofilm relatiu a la quantitat de cèl·lules present en el cultiu planctònic corresponent al pouet determinat com a CMI ja que és en aquest pouet on la concentració del valor de CMI provoca una inhibició del creixement bacterià.

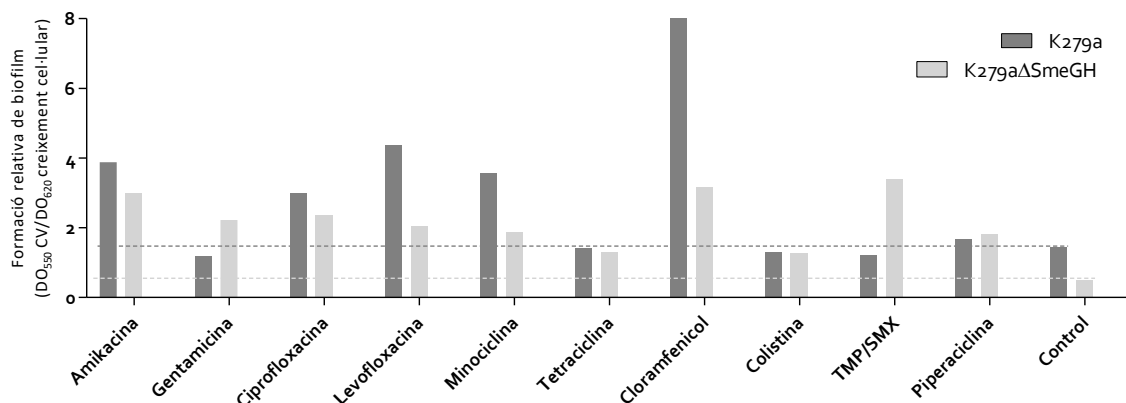


Figura 30. Formació relativa de biofilm de la soca clínica K279a i el mutant K279aΔ*smeGH* en plaques de 96 pouets amb medi MHB i incubades a 37°C amb presència de diferents antibiòtics a una concentració corresponent al valor de la CMI. Amb dues línies puntejades, una de gris fosc i l'altra de gris clar, es representa el valor de formació de biofilm de la soca salvatge i de la soca mutant, respectivament, sense presència d'antibiòtics.

Tal i com s'observa en la Figura 30, en presència de la majoria d'antibiòtics testats, tant la soca salvatge com la soca mutant, presenten una formació relativa de biofilm superior a les mostres avaluades sense antibiòtic. Més concretament, si ens fixem en la soca K279a, només els assajos avaluats amb gentamicina, tetraciclina, colistina i TMP/SMX presenten uns nivells de biofilm similars al del control, mentre que en els assajos amb els antibiòtics restants (amikacina, ciprofloxacina, levofloxacina, minociclina, cloramfenicol i piperaciclina), la K279a produeix més biofilm que sense antibiòtic. En el cas de la soca K279a Δ smeGH, en presència de tots els antibiòtics, la formació relativa de biofilm és superior que en absència d'aquests. Curiosament, la presència de gentamicina i TMP/SMX provoca que la soca salvatge produeixi menys biofilm que la soca mutant, uns resultats oposats a la resta d'antibiòtics i als exposats anteriorment en la Figura 29 sense presència d'antibiòtics.

Cal mencionar que els fenotips observats en el mutant K279a Δ smeGH encara no s'han complementat i que, actualment, en el nostre grup de treball, s'està duent a terme el procés de complementació d'aquest mutant per efectuar els posteriors estudis fenotípics.

Resumint tot el que s'ha exposat en aquest apartat, en termes generals, en el present treball s'exposa per primera vegada que la presència d'antibiòtics fa incrementar la capacitat de formar biofilm en *S. maltophilia*, un efecte demostrat en altres bacteris gramnegatius [283]–[285] i que segurament és com a resposta d'una adaptació evolutiva per tal de defensar-se dels antibiòtics produïts per altres bacteris. Així mateix, hem demostrat com la bomba d'expulsió SmeGH, a part d'estar implicada en la resistència als antibiòtics, també participa en la formació de biofilm. Donant suport a aquests resultats obtinguts, cada vegada hi ha més estudis que suggereixen que les bombes d'expulsió poden tenir almenys quatre rols diferents en la formació de biofilms: regulació del QS, regulació indirecta de gens implicats en la formació de biofilms, expulsió de molècules nocives com ara antibiòtics i metabòlits intermediaris i participació en l'agregació a superfícies o altres cèl·lules [286]. En *P. aeruginosa*, per exemple, el QS és necessari per a la formació de biofilm i les bombes d'expulsió podrien jugar un paper en el transport de components necessaris per a la formació de biofilm com les molècules AHLs [286]–[289]. No obstant això, moltes de les funcions exactes de les bombes d'expulsió en la formació de biofilm no estan clares i són necessaris més estudis d'investigació.



DISCUSSIÓ GENERAL

El més important és no deixar de fer-se preguntes.

Albert Einstein (1879-1955)

5. DISCUSSIÓ GENERAL

La investigació en *Stenotrophomonas maltophilia* rep interès per molts motius: és un bacteri multiresistent (MDR) oportunista capaç de viure en una àmplia varietat de nínxols, forma biofilms en diverses superfícies biòtiques i abiòtiques, inclosos els dispositius mèdics i, tot i que no és un patògen molt virulent, es reconeix com un patògen nosocomial emergent [7].

L'objectiu general d'aquest treball s'ha basat en l'estudi de mecanismes de resistència a antibiòtics en *S. maltophilia* i, més concretament, en les implicacions en la resistència a colistina. És per aquest motiu que, en primer lloc, s'ha dut a terme una caracterització fenotípica i genotípica d'una col·lecció de soques clíniques aïllades en diversos hospitals europeus i, posteriorment, s'ha seleccionat un subconjunt d'aquestes soques per tal d'avaluar els diferents mètodes de susceptibilitat a la colistina i demostrar que *S. maltophilia* presenta diferents mecanismes de resistència poblacional que poden aparèixer durant les proves de susceptibilitat.

Un factor de virulència rellevant en *S. maltophilia* és la resistència als antibiòtics i el seu tractament pot ser problemàtic. La problemàtica en el tractament rau en el fet que aquest microorganisme presenta alts nivells de resistència intrínseca a molts agents antimicrobians com a conseqüència de la presència de diversos factors com ara la baixa permeabilitat de la membrana externa, la producció de β -lactamases, la presència de bombes d'expulsió, els enzims modificadors d'aminoglicòsids o la resistència a la quinolona mitjançant el gen *Smqnr* [21].

El 68,85% de les soques estudiades en aquest treball han estat resistents a tres o més antibiòtics, considerant-se, doncs, soques multiresistents (MDR). Malgrat l'elevat percentatge de soques MDR, el trimetoprim-sulfametoaxol, juntament amb la minociclina, continuen sent la primera opció per al tractament ja que, en aquest treball, s'han reportat uns valors de susceptibilitat molt satisfactoris, tot i que es comencin a reportar resistències a trimetoprim-sulfametoaxol [50].

Les soques clíniques de *S. maltophilia* d'aquest treball han estat recol·lectades en diferents països, presenten diferents perfils de resistència i, a partir del perfil MLST, es classifiquen en 37 STs (dels quals 30 han estat descrits per primera vegada) i es distribueixen en 10 grups genòmics. Cal destacar un grup genòmic, el C, per la rellevància dels seus fenotips de resistència i virulència. Aquest genogrup conté la soca D457, un aïllat clínic que s'ha utilitzat com a referència per estudiar la presència d'elements que contribueixen a la resistència a *S. maltophilia* i els reguladors d'aquests elements [290]. Així mateix, també formen part d'aquest genogrup les soques UV74 i M30, les quals, a part de les característiques fenotípiques exposades en aquest treball, presenten mortalitats del 84% i 55%, respectivament, en model de Zebrafish després de 48h d'injecció [291]. A més a més, d'aquestes soques se'n disposa del seu genoma [290], [292], [293] amb l'objectiu d'entendre la seva evolució i la seva patogenicitat.

Tractant-se doncs, d'un genogrup amb alta capacitat de formar biofilm, amb una forta virulència i amb una resposta heterogènia a la resistència a la colistina és important tenir en compte que aquests clons s'han aïllat en diferents països europeus (Espanya, França, Alemanya i Bèlgica) i que, per tant, el C és un grup genòmic de gran importància epidemiològica.

Gràcies a tot el conjunt de dades recollides durant aquest treball, s'observa l'existència d'una heterogeneïtat fenotípica àmpliament estesa entre els aïllats clínics, independentment dels seus genotips i dels perfils de resistència. Més concretament, en el present estudi, s'ha demostrat per primera vegada que *S. maltophilia* és capaç de desenvolupar heterogeneïtat fenotípica pel que fa a la resistència a la colistina com a resultat de l'acció col·laborativa de diferents fenotips de resistència a aquest antibiòtic a nivell de població.

La resistència heterogènia a la colistina està esdevenint un problema clínic creixent entre els patògens gramnegatius i es tracta d'un fenomen en el qual diferents subpoblacions dins d'un sol aïllat presenten diverses susceptibilitats a aquest antibiòtic [179], [181], [184]–[187].

Malgrat que encara hi hagi controvèrsies en la definició d'aquests conceptes, la resistència adaptativa i l'heteroresistència s'han diferenciat en funció de la temporalitat i la reversibilitat dels fenòmens. Així doncs, tot i que ambdós fenotips representen subpoblacions amb susceptibilitats heterogènies a un agent antimicrobià particular, l'heteroresistència s'ha referit com un fenomen de subpoblacions genèticament diferents que coexisteixen en un sol aïllat i que són heretades per diverses generacions [181], [182]. D'altra banda, la resistència adaptativa té una naturalesa transitòria i implica un augment de la capacitat de resistència a un fàrmac per l'alteració en l'expressió gènica com a conseqüència de l'exposició a nivells subinhibitoris de l'antibiòtic o d'altres estressos [294].

Els resultats suggereixen que ambdós fenòmens poblacionals poden conviure en *S. maltophilia*, tal i com s'observa en les soques resistents K279a, M30 i D457. No obstant això, el predomini i l'impacte de cadascun d'aquests mecanismes en la resistència global a la colistina poden variar entre els aïllats. Per exemple, fins i tot en M30 i D457, dues soques genèticament molt properes (grup clonal ST-77), el fenotip de resistència ha resultat ser clarament diferent. Per contra, encara que la soca PG157-SI13 es pot classificar com heteroresistent intermedi [180] i pertany al mateix grup genòmic que la soca K279a, sembla ser que aquesta soca no és capaç de desenvolupar heteroresistència o resistència adaptativa, fet que suggereix que alguns aïllats de *S. maltophilia* poden no tenir aquests mecanismes de "resistència col·lectiva" per colistina. Finalment, i basant-nos en els resultats inconsistents obtinguts amb els mètodes Etest i BMD per a les soques restants d'aquest treball, es pot concloure que l'heterogeneïtat fenotípica podria estar present tant en els aïllats resistents com els susceptibles a la colistina; tot i que cal destacar que, curiosament, per a les dues soques aïllades filogenèticament OU152-BE13 (genogrup #5) i OU111-BE13 (genogrup A) aquests fenòmens semblen no existir.

L'heteroresistència s'ha identificat en les soques resistents seleccionades per mitjà de la prova Etest i, posteriorment, mitjançant el perfil d'anàlisi poblacional (PAP). Aquesta heteroresistència no ha estat relacionada amb l'exposició prèvia a la colistina, tot i que s'ha demostrat, de manera paral·lela, que aquestes soques tenen capacitat d'adaptar-se a la colistina. No obstant això, el concepte d'heteroresistència definit anteriorment no es pot explicar estrictament a les soques estudiades perquè la subpoblació heteroresistent de *S. maltophilia* perd la resistència a colistina quan es torna a cultivar en un medi sense antibiòtic. Per aquesta raó, doncs, atès que el principi de resistència adaptativa es pot aplicar al subconjunt de cèl·lules que poden sobreviure a l'estrés per antibiòtic, aquí es pot definir un nou concepte mixt denominat "**Heteroresistència adaptativa**". En aïllats clínics de *P. aeruginosa* [295] i

E. cloacae [181] també s'ha descrit un fenotip similar i, en el cas del *E. cloacae*, els autors van referir aquest fenomen de resistència com a "heteroresistència clonal", atribuint-lo a una subpoblació menor resistent a l'antibiòtic capaç de replicar-se en presència de colistina i suportar alts nivells de resistència a l'antibiòtic. Aquesta subpoblació resistent no és el resultat d'una mutació estable i es selecciona molt ràpidament durant la primera exposició a l'antibiòtic en les primeres generacions bacterianes, com per exemple, durant la primera hora d'exposició en les proves de susceptibilitat. Probablement, això és el que succeeix en els nostres aïllats de *S. maltophilia* amb una resistència heterogènia a la colistina; no obstant això, considerem que és més apropiat anomenar aquest fenomen d'una altra manera ja que els resultats obtinguts suggereixen que una subpoblació inicial esdevé heteroresistent com a conseqüència de canvis fenotípics transitoris. Tot i així, són necessàries més investigacions, com ara la seqüenciació genòmica juntament amb anàlisis basats en transcriptomes d'aïllaments consecutius sota estrès d'antibiòtic, per tal d'entendre si aquesta manifestació fenotípica combinada s'ha produït dins d'una soca genèticament homogènia.

En aquest estudi s'ha demostrat que la colistina presenta una baixa activitat *in vitro* contra *S. maltophilia* seguint el mètode de la microdilució recomanat per CLSI (31,1% dels aïllats són susceptibles), però, en canvi, sembla mostrar una "falsa" bona activitat (75,4% dels aïllats són susceptibles) si s'utilitzen les tires Etest com a mètode per avaluar la susceptibilitat a aquest antibiòtic. Segons indiquen El-Halfawy i Valvano [180], quan ens trobem davant aquest cas, és a dir, valors de CMI elevats mitjançant BMD però valors baixos per Etest, és indicatiu de resistència heterogènia al fàrmac en estudi. Així doncs, la impossibilitat de determinar correctament els valors de CMI de la colistina en *S. maltophilia* és, probablement, com a conseqüència dels mecanismes de resistència poblacionals descrits anteriorment. No obstant això, la discordança entre els valors de susceptibilitat *in vitro* contra *S. maltophilia* també s'ha reportat en altres estudis i molt segurament és pel fet d'utilitzar diferents mètodes per avaluar la susceptibilitat a la colistina [47], [52], [70], [296]. A més a més, malgrat que el mètode de la microdilució segueix sent el mètode de referència per determinar la CMI [193], [194], s'ha de tenir en compte, com s'ha observat en aquest treball, l'aparició d'una "zona de transició" de creixement incomplet quan s'avalua la susceptibilitat a la colistina en *S. maltophilia* en plaques de microdilució. Aquesta zona de transició provoca valors de CMI no interpretables a causa del creixement de subpoblacions resistents en els pous de la placa de microdilució que contenen baixes concentracions d'antibiòtic.

Els mecanismes que provoquen resistència a la colistina en *S. maltophilia* estan poc estudiats. En bacteris gramnegatius, la resistència a la colistina pot esdevenir-se a partir de diversos mecanismes [160], com ara modificacions del LPS, mutacions en gens implicats en la síntesi del LPS, variacions en l'expressió gènica induïdes per canvis ambientals (com variacions en el pH o cations) [297] o, fins i tot, per polipèptids antimicrobians catiónics [190], [298]. En aquest treball s'han pogut predir en *S. maltophilia* diversos gens relacionats amb les modificacions del LPS i sistemes reguladors de dos components que estan associats a la resistència a la colistina [147], [160] i, entre ells, només el regulador de resposta PhoP del sistema de dos components PhoP/Q està 100% conservat en totes les soques investigades. Una de les mutacions detectades en la proteïna sensora histidina quinasa PhoQ (D154G) ha estat associada amb la resistència adquirida a colistina en *K. pneumoniae* [299]. Recentment, s'ha demostrat que PhoP/Q de *S. maltophilia* participa en la modificació de la integritat de la membrana externa al ser activat per

baixes concentracions de magnesi i, d'aquesta manera, regular les susceptibilitats antimicrobianes [300]. A més a més, en totes les soques de *S. maltophilia* s'ha detectat un ortòleg putatiu del sistema regulador de dos components ParR/S de *P. aeruginosa*. Tot i que les dues proteïnes dels dos components han presentat una gran variabilitat, aquest sistema podria contribuir en la resistència adaptativa a la colistina, una funció que s'ha demostrat que és necessària per a l'activació de l'operó *arn* de modificació del LPS de *P. aeruginosa* en presència de concentracions subinhibitòries de colistina [190].

Així doncs, en aquest treball s'ha volgut estudiar quin rol té el sistema ParR/S en *S. maltophilia* creant un mutant *parS* en la soca clínica de referència K279a. A partir de l'avaluació de la susceptibilitat a la colistina de la soca salvatge i de la soca mutant sense exposició a altres agents externs, podem arribar a la conclusió que ParR-ParS contribueix exclusivament en la resistència adaptativa als pèptids, però no en la resistència intrínseca, ja que en les proves posteriors de susceptibilitat amb exposició prèvia a concentracions subinhibitòries de colistina, la soca salvatge adquireix uns nivells més alts de resistència, fet que suggereix que s'ha adaptat a aquest antibiòtic. En canvi, amb delecció del gen *parS*, aquesta adaptació no és tan notòria. Cal destacar que aquests resultats només s'observen quan al medi hi ha la concentració més alta de magnesi provada (2 mM) i és, precisament, a la concentració que es troba de magnesi en el cos humà (1 a 2 mM), un fet altament destacable i que cal tenir en compte en el moment de fer el tractament i prevenir l'adaptació de *S. maltophilia* a l'estrés per antibiòtic, sobretot en el cas de tractaments d'infeccions cròniques on, normalment, s'utilitzen baixes concentracions d'antibiòtic. En aquest treball, doncs, per primera vegada, s'ha descrit el paper que té el sistema ParRS en *S. maltophilia* el qual, de la mateixa manera que *P. aeruginosa* [190], [272], només s'activa en presència de magnesi a alta concentració i pèptids antimicrobians en dosis subinhibitòries, tenint doncs, un paper clau en la resistència adaptativa a la colistina.

Fins fa un parell d'anys, la resistència a la colistina es creia que només tenia origen cromosòmic però, recentment, s'ha identificat el gen *mcr-1* en un plasmidi d'*E. coli* que suggereix la possibilitat de la transferència lateral de la resistència a colistina entre bacteris [159]. A més de ser un gen plasmídic, s'han observat gens P-EtN transferasa cromosòmics en diversos patògens gramnegatius que confereixen resistència a les polimixines [160]. Curiosament, en aquest estudi s'han trobat en *S. maltophilia* dos gens cromosòmics, *smlt2804* i *smlt3571*, homòlegs als gens d'*E. coli mcr* amb 53% i 57% d'identitat amb una de les seves variants respectivament. Per la qual cosa, en el present treball s'ha volgut estudiar quina implicació tenen aquests gens en la resistència a la colistina.

És per aquest motiu que s'han obtingut tres mutants en la soca K279a, és a dir, un simple mutant per cada un dels gens i un doble mutant i s'han realitzat diferents proves fenotípiques. Les proves de susceptibilitat ens revelen que el gen implicat directament en la resistència a la colistina és el *smlt3571* que, justament, és la única còpia que presenta la soca sensible a la colistina R551-3. Per altra banda, les soques resistents seleccionades presenten també la còpia del gen *smlt2804* el qual s'ha demostrat en aquest treball que podria estar relacionat en la resistència adaptativa a la colistina, descrivint, per primera vegada, un mecanisme d'addició de P-EtN al lípid A activat per la presència de concentracions subinhibitòries del fàrmac en estudi. No obstant això, s'haurien de realitzar futurs experiments per demostrar que la funció d'aquests gens és modificar el lípid A.

S. maltophilia presenta una gran resistència a la majoria d'antibiòtics d'ampli espectre, principalment, per la presència de bombes d'expulsió i en aquest treball s'ha volgut estudiar més detalladament la bomba SmeGH. A diferència dels resultats observats en *P. aeruginosa* [170], la bomba SmeGH en *S. maltophilia* no intervé en la resistència a la colistina però, en canvi, influeix en la resistència als antibiòtics de les classes de les fluoroquinolones i aminoglicòsids. A més a més, s'ha volgut estudiar quin paper juga en la formació de biofilm, ja que últimament les bombes d'expulsió del tipus RND s'associen a la fisiologia bacteriana [277]. Cal tenir present que la formació de biofilm es considera un mecanisme de resistència fenotípica [71], ja que els bacteris desenvolupen biofilm en resposta a diversos factors com ara, l'exposició a concentracions subhibitòries d'antibiòtic, a senyals nutritives i metabòliques o a senyals derivades de l'hoste [286]. Així doncs, en aquest treball s'ha pogut observar com el mutant K279aΔ*smeGH* redueix fins a un 64% la capacitat de formar biofilm respecte a la soca salvatge, indicant que les bombes d'expulsió, a part del seu paper en la resistència a antibiòtics, també estan involucrades en la supervivència, colonització i virulència dels bacteris, participant doncs, en la formació de biofilm.

És conegut que la presència d'antibiòtics en baixes concentracions estimula la formació de biofilms [279] i, per la qual cosa, en aquest treball també s'ha volgut investigar quin paper hi juguen diferents antibiòtics en la formació de biofilm en *S. maltophilia*. No obstant això, en primer lloc, s'ha avaluat la capacitat de formar biofilm de les diferents soques de *S. maltophilia* on hem observat que és molt variada entre els aïllats i que no existeix cap associació significativa entre la resistència als antibiòtics que pugui tenir una soca i la quantitat de biofilm que pugui formar. D'altra banda, i d'acord amb les observacions prèvies del nostre grup [101], hem demostrat que les soques que contenen el gen *rpfF-2* són més productores de biofilm que les soques que contenen la variant *rpfF-1*. Paral·lelament, s'ha demostrat en aquest treball que, per primera vegada, la capacitat de formar biofilm en *S. maltophilia* augmenta en presència d'antibiòtics. Aquesta evidència s'ha reportat en altres bacteris gramnegatius [280], [282], [283] i cal tenir present que pot tenir una gran rellevància clínica ja que els biofilms estan implicats en un 60% de les infeccions de ferides cròniques, unes infeccions que sovint són difícils de tractar i a on els bacteris estan exposats a baixes concentracions d'antibiòtic de dosificació continuada, fet que genera un increment en la formació de biofilms.

Recollint tot el que s'ha dit, gràcies a les proves de caracterització fenotípica i genotípica realitzades al llarg d'aquest treball, s'ha pogut observar l'existència d'una gran variabilitat entre els diferents aïllats clínics, suggerint que *S. maltophilia* presenta una població heterogènia a tot Europa. El nostre estudi s'ha centrat en alguns factors de virulència coneguts en *S. maltophilia* com la formació de biofilms i la resistència a antibiòtics. Així doncs, totes les soques analitzades en aquest treball presenten capacitat de formar biofilms, mostren diferents graus de virulència front a *C. elegans* i la major susceptibilitat s'observa en minociclina i el TMP/SMX. Paral·lelament, aquest estudi mostra que els mètodes de susceptibilitat recomanats per colistina en *S. maltophilia* poden provocar resultats poc fiables com a conseqüència d'una interacció complexa entre diferents mecanismes de resistència, incloent el fenomen d'heteroresistència adaptativa proposat en aquest treball.

Finalment, s'han estudiat tres mecanismes que podrien estar implicats de manera directa o indirecta en la resistència a la colistina en *S. maltophilia*: el sistema de dos components ParR/S,

la bomba d'expulsió SmeGH i els gens homòlegs als gens *mcr* (Figura 31). Malgrat les hipòtesis inicials, la bomba d'expulsió SmeGH no intervé directament en la resistència a la colistina en *S. maltophilia*, però en canvi, el gen *smlt3571* té una interacció directa amb la resistència a aquest fàrmac, sent, probablement, el gen principal i responsable de l'addició de grups P-EtN al lípid A. Per altra banda, en aquest treball s'han descrit dos sistemes que podrien estar implicats en la resistència adaptativa a la colistina, un relacionat indirectament amb l'addició de grups L-Ara₄N al lípid A i l'altre directament amb l'addició de grups P-EtN al lípid A. El primer, regulat pel sistema ParR/S, s'activa en presència de concentracions subinhibitòries de colistina i altes concentracions de magnesi al medi; en canvi, el segon, en el qual intervé el gen *smlt2804*, s'activa només si es detecta concentracions d'antibiòtic, fins i tot a unes dosis més baixes que el sistema ParR/S. En aquests moments, el nostre grup està realitzant experiments per tal de determinar les modificacions que pateix el LPS de *S. maltophilia* després del contacte amb la colistina i entre aquests dos mutants i la soca salvatge.

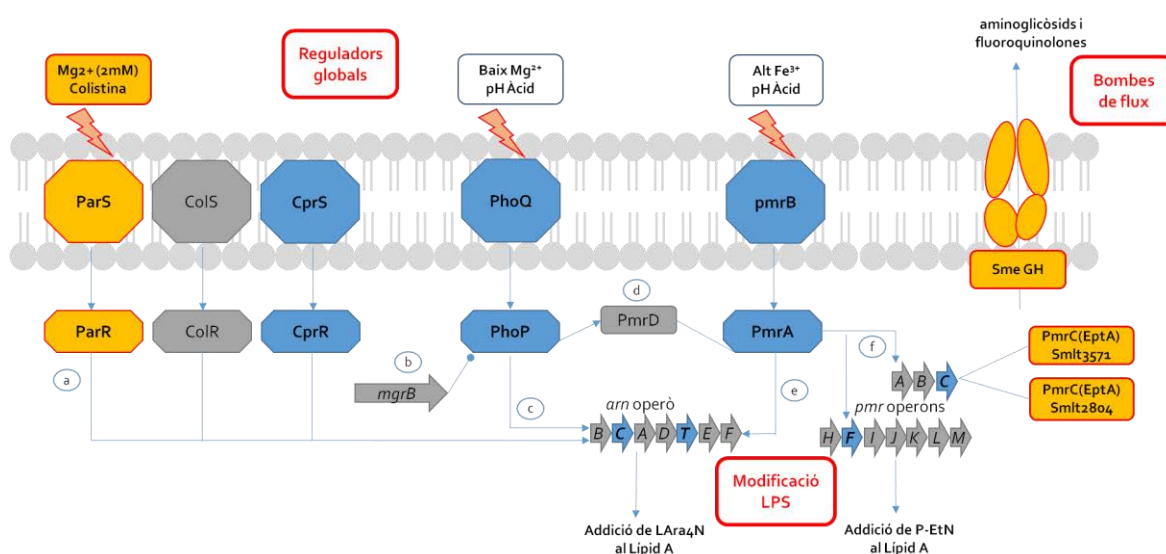


Figura 31. Mecanismes de resistència a polimixines descrits en bacteris gramnegatius. En taronja apareixen els mecanismes de resistència estudiats en aquest treball, els quals representen dos tipus de resistència adquirida a colistina (reguladors globals i modificació del LPS), així com també una bomba d'expulsió. En blau es representen aquells mecanismes que tenen un ortòleg en *S. maltophilia* i, en gris, aquells gens que no s'ha trobat un ortòleg clar en *S. maltophilia*. **(A)** Activació de l'operó *arnBCADTEF* per ParRS, CoRS, CprRS per l'addició de 4-amino-4-desoxi-L-arabinosa (LAra₄N), descrits únicament en *P. aeruginosa* i, per primera vegada, ParS en *S. maltophilia* en aquest treball. **(B)** Activació de l'operó *arnBCADTEF* per *mgrB* per l'addició de LAra₄N. **(C)** La fosforilació de PhoP activa directament l'operó *arnBCADTEF* per a l'addició del LAra₄N. **(D)** L'activació de PmrD, per PhoP, el qual activa PmrA per l'activació de l'operó *arnBCADTEF*. **(E)** La fosforilació de *pmrA* activa directament l'operó *arnBCADTEF*. **(F)** Activació de PmrC per mitjà de *pmrB* que activa l'operó *pmrHFIKLM* per l'addició de fosfoetanolamina (P-EtN). En resum, les rutes *arnBCADTEF* i *pmrHFIKLM* són les dues rutes principals responsables de la incorporació de LAra₄ i pEtN al LPS, provocant que el LPS esdevingui més catiònic i, com a conseqüència, confereixi resistència a les polimixines. Figura adaptada de Bakthavatchalam *et al.* [192].

Malgrat que en aquest treball s'hagin descrit els rols del sistema ParR/S, la bomba d'expulsió SmeGH i els gens homòlegs als gens *mcr*, encara són necessaris molts estudis per tal de comprendre la base molecular del complex sistema de resistència (fins i tot, resistència adaptativa i heteroresistència) a la colistina en *S. maltophilia* ja que, molt probablement, intervenen altres components com en el cas de *P. aeruginosa* [265], [272].

Així doncs, per tot el que s'ha exposat en aquest treball, la colistina no hauria de ser considerada com una opció terapèutica rutinària contra *S. maltophilia* utilitzant aquest antibiòtic com a fàrmac únic, a part per la seva toxicitat demostrada, principalment, per la seva capacitat d'adaptar-se a l'antibiòtic, tot i que no s'ha de descartar com a fàrmac d'últim recurs. L'estudi dels mecanismes de resistència en aquest bacteri obrirà les portes al disseny de noves estratègies antimicrobianes o al descobriment de drogues que combinades amb la colistina puguin eliminar els fenòmens que hem denominat com "heteroresistència adaptativa" i/o disminuir l'aparició de resistències o la seva toxicitat.



CONCLUSIONS

Un investigador no té pàtria; el seu treball és patrimoni de la humanitat.

Mariano Barbacid (1949)

6. CONCLUSIONS

1. *Stenotrophomonas maltophilia* presenta una gran heterogeneïtat genotípica, la qual s'ha demostrat en la identificació de 37 STs diferents entre les 78 soques aïllades de pacients de diferents països europeus. 30 d'aquestes STs s'han descrit per primera vegada.
2. Existeix una gran diversitat fenotípica entre els aïllats clínics ja que, de manera general, no existeix associació entre les variables genotípiques i els fenotips de resistència i virulència avaluats. La única associació observada ha estat en relació a la major capacitat de formació de biofilm de les soques del tipus *rpffF-2* vers les soques de la variant *rpffF-1*.
3. El grup genòmic C podria considerar-se com un clon de risc epidemiològic com a conseqüència de la seva expansió en diferents països europeus, la seva capacitat elevada de formació de biofilm, la seva virulència i la resistència heterogènia a la colistina.
4. Es confirma que els antibiòtics més eficaços són la minociclina i el trimetoprim-sulfamethoxazol. No obstant això, és destacable que un 68,8% dels aïllats d'aquest treball són considerats soques MDR i que un 67,21% són resistents a la colistina, un antibiòtic recentment considerat d'última elecció.
5. La interpretació de la susceptibilitat a la colistina mitjançant el mètode recomanat de la microdilució (BMD) ha estat complicada com a conseqüència de l'aparició d'una "zona de transició" en les plaques a causa d'una inhibició de creixement incompleta per un fenomen de resistència heterogènia a la colistina.
6. *Stenotrophomonas maltophilia* presenta resistència heterogènia a la colistina mitjançant mecanismes de resistència diferencial a nivell poblacional, uns mecanismes que no tots els aïllats presenten de la mateixa manera ni expressen al mateix nivell, comportant l'existència d'una heterogeneïtat fenotípica a la colistina intra- i inter-soques.
7. La resistència heterogènia observada no ha estat relacionada amb canvis fenotípics estables i heretables, denominant el nou concepte com a heteroresistència adaptativa, en el qual, una subpoblació inicial esdevé heteroresistent com a conseqüència de canvis fenotípics transitoris molt poc temps després del contacte amb l'antibiòtic.
8. Entre els determinants genètics de la resistència a colistina en destaquen els sistemes de regulació de dos components i els gens que codifiquen per a proteïnes que participen en la regulació del LPS. En particular, *S. maltophilia* pot presentar dos gens cromosòmics (*smlt3571* i *smlt2804*) homòlegs als gens *mcr* d'enterobacteris que codifiquen per a dos enzims de la família de la *fosfoetanolamina transferasa* que modifica l'estructura del Lípid A.
9. Els gens paràlegs *smlt3571* i *smlt2804* participen en la resistència a la colistina de manera additiva i, probablement, mitjançant mecanismes diferents. El gen *smlt3571* està implicat

directament en la resistència a la colistina, mentre que el *smlt2804* podria estar relacionat més en la resistència adaptativa ja que un mutant d'aquest gen sol ha mostrat un fenotip més susceptible sota condicions de pre-inducció amb l'antibiòtic.

- 10.** El sistema ParRS en *S. maltophilia* participa en la resistència adaptativa a la colistina i semblar estar regulat per la presència de magnesi i pèptids.
- 11.** La bomba d'expulsió SmeGH participa en la resistència a fluoroquinolones i aminoglicòsids i no intervé en la resistència directa a la colistina. Una soca deficient d'aquesta bomba redueix considerablement la capacitat de formar biofilm, fins i tot, sota els efectes de baixes concentracions d'antibiòtics que promouen la seva formació en comparació a la soca salvatge.



BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] R. P. Ryan *et al.*, «The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*», *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 7, núm. 7, p. 514-525, jul. 2009.
- [2] I. Sánchez-Castro *et al.*, «*Stenotrophomonas bentonitica* sp. nov., isolated from bentonite formations», *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 67, núm. 8, p. 2779-2786, ago. 2017.
- [3] R. Hugh i E. Ryschenkow, «*Pseudomonas maltophilia*, an alcaligenes-like species», *J. Gen. Microbiol.*, vol. 26, p. 123-132, set. 1961.
- [4] N. J. Palleroni i J. F. Bradbury, «*Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings *et al.* 1983», *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 43, núm. 3, p. 606-609, jul. 1993.
- [5] J. SWINGS, P. DE VOS, M. VAN den MOOTER, i J. DE LEY, «Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the Genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov.», *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 33, núm. 2, p. 409-413, 1983.
- [6] M. Denton i K. G. Kerr, «Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*», *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 11, núm. 1, p. 57-80, gen. 1998.
- [7] J. S. Brooke, «*Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen», *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 25, núm. 1, p. 2-41, gen. 2012.
- [8] L. A. Carmody, T. Spilker, i J. J. LiPuma, «Reassessment of *Stenotrophomonas maltophilia* Phenotype», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 49, núm. 3, p. 1101-1103, març 2011.
- [9] L. C. Crossman *et al.*, «The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants», *Genome Biol.*, vol. 9, núm. 4, p. R74, abr. 2008.
- [10] S. C. Vazquez, L. N. R. Merino, W. P. MacCormack, i E. R. Fraile, «Protease-producing psychrotrophic bacteria isolated from Antarctica», *Polar Biol.*, vol. 15, núm. 2, p. 131-135, gen. 1995.
- [11] I. J. Abbott, M. A. Slavin, J. D. Turnidge, K. A. Thursky, i L. J. Worth, «*Stenotrophomonas maltophilia*: emerging disease patterns and challenges for treatment», *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, vol. 9, núm. 4, p. 471-488, abr. 2011.
- [12] G. Berg, L. Eberl, i A. Hartmann, «The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria», *Environ. Microbiol.*, vol. 7, núm. 11, p. 1673-1685, nov. 2005.
- [13] O. Nyc i J. Matejková, «*Stenotrophomonas maltophilia*: Significant contemporary hospital pathogen - review», *Folia Microbiol. (Praha)*, vol. 55, núm. 3, p. 286-294, maig 2010.
- [14] E. Senol, «*Stenotrophomonas maltophilia*: the significance and role as a nosocomial pathogen», *J. Hosp. Infect.*, vol. 57, núm. 1, p. 1-7, maig 2004.
- [15] P. Mukherjee i P. Roy, «Genomic Potential of *Stenotrophomonas maltophilia* in Bioremediation with an Assessment of Its Multifaceted Role in Our Environment», *Front. Microbiol.*, vol. 7, juny 2016.
- [16] K. M. Elhalag, N. a. S. Messiha, H. M. Emará, i S. A. Abdallah, «Evaluation of antibacterial activity of *Stenotrophomonas maltophilia* against *Ralstonia solanacearum* under different application conditions», *J. Appl. Microbiol.*, vol. 120, núm. 6, p. 1629-1645, juny 2016.
- [17] W. J. Looney, M. Narita, i K. Mühlemann, «*Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen», *Lancet Infect. Dis.*, vol. 9, núm. 5, p. 312-323, maig 2009.
- [18] S. Taghavi *et al.*, «Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees», *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, núm. 3, p. 748-757, feb. 2009.
- [19] B. Youenou *et al.*, «Comparative Genomics of Environmental and Clinical *Stenotrophomonas maltophilia* Strains with Different Antibiotic Resistance Profiles», *Genome Biol. Evol.*, vol. 7, núm. 9, p. 2484-2505, set. 2015.
- [20] J. S. Brooke, «New strategies against *Stenotrophomonas maltophilia*: a serious worldwide intrinsically drug-resistant opportunistic pathogen», *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, vol. 12, núm. 1, p. 1-4, gen. 2014.
- [21] Y.-T. Chang, C.-Y. Lin, Y.-H. Chen, i P.-R. Hsueh, «Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options», *Front. Microbiol.*, vol. 6, set. 2015.
- [22] H. S. Sader i R. N. Jones, «Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli», *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 25, núm. 2, p. 95-109, feb. 2005.
- [23] G. Gherardi, R. Creti, A. Pompilio, i G. Di Bonaventura, «An overview of various typing methods for clinical epidemiology of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*», *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 81, núm. 3, p. 219-226, març 2015.
- [24] A. C. Nicodemo i J. I. G. Paez, «Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections», *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.*, vol. 26, núm. 4, p. 229-237, abr. 2007.
- [25] A. Safdar i K. V. Rolston, «*Stenotrophomonas maltophilia*: Changing Spectrum of a Serious Bacterial Pathogen in Patients with Cancer», *Clin. Infect. Dis.*, vol. 45, núm. 12, p. 1602-1609, des. 2007.
- [26] M. E. Falagas, A. C. Kastoris, E. K. Vouloumanou, i G. Dimopoulos, «Community-acquired *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review», *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 28, núm. 7, p. 719, jul. 2009.
- [27] D. J. Farrell, H. S. Sader, R. K. Flamm, i R. N. Jones, «Ceftolozane/tazobactam activity tested against Gram-negative bacterial isolates from hospitalised patients with pneumonia in US and European medical centres (2012)», *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 43, núm. 6, p. 533-539, juny 2014.
- [28] M. Boktour *et al.*, «Central venous catheter and *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in cancer patients», *Cancer*, vol. 106, núm. 9, p. 1967-1973, maig 2006.
- [29] H. Hanna *et al.*, «Central venous catheter-related bacteremia due to gram-negative bacilli: significance of catheter removal in preventing relapse», *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, vol. 25, núm. 8, p. 646-649, ago. 2004.
- [30] C.-H. Lai *et al.*, «Central venous catheter-related *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia and associated relapsing bacteraemia in haematology and oncology patients», *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 12, núm. 10, p. 986-991, oct. 2006.
- [31] D. J. Weber, W. A. Rutala, E. E. Sickbert-Bennett, G. P. Samsa, V. Brown, i M. S. Niederman, «Microbiology of ventilator-associated pneumonia compared with that of hospital-acquired pneumonia», *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, vol. 28, núm. 7, p. 825-831, jul. 2007.

7. Bibliografia

- [32] R. Chaplow, B. Palmer, R. Heyderman, J. Moppett, i D. I. Marks, «Stenotrophomonas maltophilia bacteraemia in 40 haematology patients: risk factors, therapy and outcome», *Bone Marrow Transplant.*, vol. 45, núm. 6, p. 1109-1110, juny 2010.
- [33] S. Wakino *et al.*, «Clinical importance of Stenotrophomonas maltophilia nosocomial pneumonia due to its high mortality in hemodialysis patients», *Ther. Apher. Dial. Off. Peer-Rev. J. Int. Soc. Apher. Jpn. Soc. Apher. Jpn. Soc. Dial. Ther.*, vol. 13, núm. 3, p. 193-198, juny 2009.
- [34] W.-P. Tsai, C.-L. Chen, W.-C. Ko, i S.-C. Pan, «Stenotrophomonas maltophilia bacteremia in burn patients», *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.*, vol. 32, núm. 2, p. 155-158, març 2006.
- [35] G. Valenza *et al.*, «Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis», *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.*, vol. 7, núm. 2, p. 123-127, març 2008.
- [36] G. Steinkamp *et al.*, «Prospective evaluation of emerging bacteria in cystic fibrosis», *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.*, vol. 4, núm. 1, p. 41-48, març 2005.
- [37] A. Pompilio *et al.*, «Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by Stenotrophomonas maltophilia isolates from cystic fibrosis patients», *BMC Microbiol.*, vol. 10, p. 102, abr. 2010.
- [38] L. Spicuzza, C. Sciuto, G. Vitaliti, G. Di Dio, S. Leonardi, i M. La Rosa, «Emerging pathogens in cystic fibrosis: ten years of follow-up in a cohort of patients», *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.*, vol. 28, núm. 2, p. 191-195, feb. 2009.
- [39] S. W. Anderson, J. R. Stapp, J. L. Burns, i X. Qin, «Characterization of small-colony-variant Stenotrophomonas maltophilia isolated from the sputum specimens of five patients with cystic fibrosis», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 45, núm. 2, p. 529-535, feb. 2007.
- [40] Y.-T. Chang *et al.*, «Stenotrophomonas maltophilia bloodstream infection: comparison between community-onset and hospital-acquired infections», *J. Microbiol. Immunol. Infect. Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, vol. 47, núm. 1, p. 28-35, feb. 2014.
- [41] V. Fihman *et al.*, «Stenotrophomonas maltophilia--the most worrisome threat among unusual non-fermentative gram-negative bacilli from hospitalized patients: a prospective multicenter study», *J. Infect.*, vol. 64, núm. 4, p. 391-398, abr. 2012.
- [42] M. E. Falagas, A. C. Kastoris, E. K. Vouloumanou, P. I. Rafailidis, A. M. Kapaskelis, i G. Dimopoulos, «Attributable mortality of Stenotrophomonas maltophilia infections: a systematic review of the literature», *Future Microbiol.*, vol. 4, núm. 9, p. 1103-1109, nov. 2009.
- [43] M. A. Toleman, P. M. Bennett, D. M. C. Bennett, R. N. Jones, i T. R. Walsh, «Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in Stenotrophomonas maltophilia mediated by acquisition of sul genes», *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 13, núm. 4, p. 559-565, abr. 2007.
- [44] D. J. Farrell, H. S. Sader, i R. N. Jones, «Antimicrobial susceptibilities of a worldwide collection of Stenotrophomonas maltophilia isolates tested against tigecycline and agents commonly used for S. maltophilia infections», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, núm. 6, p. 2735-2737, juny 2010.
- [45] R. N. Jones, H. S. Sader, i M. L. Beach, «Contemporary in vitro spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18569 strains non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001)», *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 22, núm. 6, p. 551-556, des. 2003.
- [46] I. J. Abbott i A. Y. Peleg, «Stenotrophomonas, Achromobacter, and nonmelioid Burkholderia species: antimicrobial resistance and therapeutic strategies», *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 36, núm. 1, p. 99-110, feb. 2015.
- [47] A. C. Nicodemo, M. R. E. Araujo, A. S. Ruiz, i A. C. Gales, «In vitro susceptibility of Stenotrophomonas maltophilia isolates: comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution methods», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 53, núm. 4, p. 604-608, abr. 2004.
- [48] C. Betriu, I. Rodríguez-Avial, B. A. Sánchez, M. Gómez, i J. J. Picazo, «Comparative in vitro activities of tigecycline (GAR-936) and other antimicrobial agents against Stenotrophomonas maltophilia», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 50, núm. 5, p. 758-759, nov. 2002.
- [49] K. Weiss, C. Restieri, E. De Carolis, M. Laverdière, i H. Guay, «Comparative activity of new quinolones against 326 clinical isolates of Stenotrophomonas maltophilia», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 45, núm. 3, p. 363-365, març 2000.
- [50] S. Valdezate, A. Vindel, E. Loza, F. Baquero, i R. Cantón, «Antimicrobial susceptibilities of unique Stenotrophomonas maltophilia clinical strains», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 45, núm. 5, p. 1581-1584, maig 2001.
- [51] I. Galani *et al.*, «Colistin susceptibility testing by Etest and disk diffusion methods», *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 31, núm. 5, p. 434-439, maig 2008.
- [52] S. M. Moskowitz *et al.*, «Colistin susceptibility testing: evaluation of reliability for cystic fibrosis isolates of Pseudomonas aeruginosa and Stenotrophomonas maltophilia», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 65, núm. 7, p. 1416-1423, jul. 2010.
- [53] A. M. Somily, «Comparison of E-test and disc diffusion methods for the in vitro evaluation of the antimicrobial activity of colistin in multi-drug resistant Gram-negative Bacilli», *Saudi Med. J.*, vol. 31, núm. 5, p. 507-511, maig 2010.
- [54] A. C. Gales, R. N. Jones, i H. S. Sader, «Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004)», *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 12, núm. 4, p. 315-321, abr. 2006.
- [55] E. J. Giamarellou-Bourboulis, L. Karnesis, i H. Giamarellou, «Synergy of colistin with rifampin and trimethoprim/sulfamethoxazole on multidrug-resistant Stenotrophomonas maltophilia», *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 44, núm. 3, p. 259-263, nov. 2002.
- [56] M. E. Falagas, P.-E. Valkimadi, Y.-T. Huang, D. K. Matthaiou, i P.-R. Hsueh, «Therapeutic options for Stenotrophomonas maltophilia infections beyond co-trimoxazole: a systematic review», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 62, núm. 5, p. 889-894, nov. 2008.
- [57] J. L. Muñoz Bellido, S. Muñoz Criado, I. García García, M. A. Alonso Manzanares, M. N. Gutiérrez Zufiaurre, i J. A. García-Rodríguez, «In vitro activities of beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations against Stenotrophomonas maltophilia: correlation between methods for testing inhibitory activity, time-kill curves, and bactericidal activity», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 41, núm. 12, p. 2612-2615, des. 1997.
- [58] A. C. Gales, R. N. Jones, K. R. Forward, J. Liñares, H. S. Sader, i J. Verhoef, «Emerging importance of multidrug-resistant Acinetobacter species and Stenotrophomonas maltophilia as pathogens in seriously ill patients: geographic patterns, epidemiological features, and trends in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1999)», *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*, vol. 32 Suppl 2, p. S104-113, maig 2001.

- [59] F. J. Schmitz, R. Sadurski, J. Verhoef, D. Milatovic, i A. C. Fluit, «Typing of 154 clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* by pulsed-field gel electrophoresis and determination of the in vitro susceptibilities of these strains to 28 antibiotics», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 45, núm. 6, p. 921-923, juny 2000.
- [60] M. Leccso-Bornet i E. Bergogne-Bérézin, «Susceptibility of 100 strains of *Stenotrophomonas maltophilia* to three beta-lactams and five beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 40, núm. 5, p. 717-720, nov. 1997.
- [61] S. Vartivarian, E. Anaissie, G. Bodey, H. Sprigg, i K. Rolston, «A changing pattern of susceptibility of *Xanthomonas maltophilia* to antimicrobial agents: implications for therapy», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 38, núm. 3, p. 624-627, març 1994.
- [62] C.-J. Pien *et al.*, «Risk factors for levofloxacin resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* from respiratory tract in a regional hospital», *J. Microbiol. Immunol. Infect. Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, vol. 48, núm. 3, p. 291-295, juny 2015.
- [63] C.-H. Huang, C.-C. Lai, Y.-H. Chen, i P.-R. Hsueh, «The potential role of nemonoxacin for treatment of common infections», *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 16, núm. 2, p. 263-270, feb. 2015.
- [64] M. Bassetti, P. Della Siega, D. Pecori, C. Scarparo, i E. Righi, «Delafloxacin for the treatment of respiratory and skin infections», *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 24, núm. 3, p. 433-442, març 2015.
- [65] P. San Gabriel, J. Zhou, S. Tabibi, Y. Chen, M. Trauzzi, i L. Saiman, «Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 48, núm. 1, p. 168-171, gen. 2004.
- [66] K. E. N. Milne i I. M. Gould, «Combination antimicrobial susceptibility testing of multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* from cystic fibrosis patients», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 56, núm. 8, p. 4071-4077, ago. 2012.
- [67] M. Castanheira, R. E. Mendes, i R. N. Jones, «Update on *Acinetobacter* species: mechanisms of antimicrobial resistance and contemporary in vitro activity of minocycline and other treatment options», *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*, vol. 59 Suppl 6, p. S367-373, des. 2014.
- [68] C. Rizek *et al.*, «In vitro activity of potential old and new drugs against multidrug-resistant gram-negatives», *J. Infect. Chemother. Off. J. Jpn. Soc. Chemother.*, vol. 21, núm. 2, p. 114-117, feb. 2015.
- [69] M. Hornsey, C. Longshaw, L. Phee, i D. W. Wareham, «In vitro activity of telavancin in combination with colistin versus Gram-negative bacterial pathogens», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 56, núm. 6, p. 3080-3085, juny 2012.
- [70] J. W. Betts, L. M. Phee, N. Woodford, i D. W. Wareham, «Activity of colistin in combination with tigecycline or rifampicin against multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia*», *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.*, vol. 33, núm. 9, p. 1565-1572, set. 2014.
- [71] J. Olivares, A. Bernardini, G. Garcia-Leon, F. Corona, M. B Sanchez, i J. L. Martinez, «The intrinsic resistome of bacterial pathogens», *Front. Microbiol.*, vol. 4, p. 103, 2013.
- [72] L. Martínez-Martínez, «Muerte bacteriana y heterorresistencia a los antimicrobianos», *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica*, p. 481-484.
- [73] G. D. Wright, «The antibiotic resistome», *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 5, núm. 8, p. 779-788, ago. 2010.
- [74] M. B. Sánchez, «Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*», *Front. Microbiol.*, vol. 6, p. 658, 2015.
- [75] C. R. H. Raetz i C. Whitfield, «Lipopolysaccharide Endotoxins», *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 71, p. 635-700, 2002.
- [76] D. J. Neal i S. G. Wilkinson, «Lipopolysaccharides from *Pseudomonas maltophilia*. Structural studies of the side-chain, core, and lipid-A regions of the lipopolysaccharide from strain NCTC 10257», *Eur. J. Biochem.*, vol. 128, núm. 1, p. 143-149, nov. 1982.
- [77] O. Holst, «The structures of core regions from enterobacterial lipopolysaccharides - an update», *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 271, núm. 1, p. 3-11, juny 2007.
- [78] G. A. McKay, D. E. Woods, K. L. MacDonald, i K. Poole, «Role of phosphoglucomutase of *Stenotrophomonas maltophilia* in lipopolysaccharide biosynthesis, virulence, and antibiotic resistance», *Infect. Immun.*, vol. 71, núm. 6, p. 3068-3075, juny 2003.
- [79] W. J. Looney, «Role of *Stenotrophomonas maltophilia* in hospital-acquired infection», *Br. J. Biomed. Sci.*, vol. 62, núm. 3, p. 145-154; quiz 1 p following 154, 2005.
- [80] T.-P. Huang, E. B. Somers, i A. C. L. Wong, «Differential biofilm formation and motility associated with lipopolysaccharide/exopolysaccharide-coupled biosynthetic genes in *Stenotrophomonas maltophilia*», *J. Bacteriol.*, vol. 188, núm. 8, p. 3116-3120, abr. 2006.
- [81] T. K. Wood, S. J. Knabel, i B. W. Kwan, «Bacterial persister cell formation and dormancy», *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 79, núm. 23, p. 7116-7121, des. 2013.
- [82] B. R. Levin i D. E. Rozen, «Non-inherited antibiotic resistance», *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 4, núm. 7, p. 556-562, jul. 2006.
- [83] J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, i H. M. Lappin-Scott, «Microbial biofilms», *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 49, p. 711-745, 1995.
- [84] G. Di Bonaventura *et al.*, «Molecular characterization of virulence determinants of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from patients affected by cystic fibrosis», *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, vol. 20, núm. 3, p. 529-537, set. 2007.
- [85] G. Di Bonaventura, I. Spedicato, D. D'Antonio, I. Robuffo, i R. Piccolomini, «Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 48, núm. 1, p. 151-160, gen. 2004.
- [86] R. Briandet *et al.*, «Fluorescence correlation spectroscopy to study diffusion and reaction of bacteriophages inside biofilms», *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, núm. 7, p. 2135-2143, abr. 2008.
- [87] A. Hostacká, I. Ciznár, i M. Stefkovicová, «Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm», *Folia Microbiol. (Praha)*, vol. 55, núm. 1, p. 75-78, gen. 2010.
- [88] D. de Oliveira-Garcia *et al.*, «Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces», *Cell. Microbiol.*, vol. 5, núm. 9, p. 625-636, set. 2003.
- [89] A. K. Zgair i S. Chhibber, «*Stenotrophomonas maltophilia* flagellin induces a compartmentalized innate immune response in mouse lung», *J. Med. Microbiol.*, vol. 59, núm. Pt 8, p. 913-919, ago. 2010.
- [90] D. de Oliveira-Garcia, M. Dall'Agnol, M. Rosales, A. C. G. S. Azzuz, M. B. Martinez, i J. A. Girón, «Characterization of flagella produced by clinical strains of *Stenotrophomonas maltophilia*», *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 8, núm. 9, p. 918-923, set. 2002.
- [91] V. J. Waters, M. I. Gómez, G. Soong, S. Amin, R. K. Ernst, i A. Prince, «Immunostimulatory properties of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*», *Infect. Immun.*, vol. 75, núm. 4, p. 1698-1703, abr. 2007.

7. Bibliografia

- [92] G. A. O'Toole i R. Kolter, «Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development», *Mol. Microbiol.*, vol. 30, núm. 2, p. 295-304, oct. 1998.
- [93] M. R. Parsek i E. P. Greenberg, «Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, núm. 16, p. 8789-8793, ago. 2000.
- [94] X.-M. Kang, F.-F. Wang, H. Zhang, Q. Zhang, i W. Qiana, «Genome-wide identification of genes necessary for biofilm formation by nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* reveals that orphan response regulator FsnR is a critical modulator», *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 81, núm. 4, p. 1200-1209, feb. 2015.
- [95] H. Mulcahy, L. Charron-Mazenod, i S. Lewenza, «Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms», *PLoS Pathog.*, vol. 4, núm. 11, p. e1000213, nov. 2008.
- [96] L. Johnson *et al.*, «Extracellular DNA-induced antimicrobial peptide resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium», *BMC Microbiol.*, vol. 13, p. 115, maig 2013.
- [97] C. M. Waters i B. L. Bassler, «Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria», *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 21, p. 319-346, 2005.
- [98] B. L. Bassler, «Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria», *Cell*, vol. 109, núm. 4, p. 421-424, maig 2002.
- [99] Y. Fouhy *et al.*, «Diffusible signal factor-dependent cell-cell signaling and virulence in the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*», *J. Bacteriol.*, vol. 189, núm. 13, p. 4964-4968, jul. 2007.
- [100] T.-P. Huang i A. C. Lee Wong, «Extracellular fatty acids facilitate flagella-independent translocation by *Stenotrophomonas maltophilia*», *Res. Microbiol.*, vol. 158, núm. 8-9, p. 702-711, nov. 2007.
- [101] P. Huedo *et al.*, «Two different rpf clusters distributed among a population of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains display differential diffusible signal factor production and virulence regulation», *J. Bacteriol.*, vol. 196, núm. 13, p. 2431-2442, jul. 2014.
- [102] Y. Kim i T. K. Wood, «Toxins Hha and CspD and small RNA regulator Hfq are involved in persister cell formation through MqsR in *Escherichia coli*», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 391, núm. 1, p. 209-213, gen. 2010.
- [103] L. Fernández, E. B. M. Breidenstein, i R. E. W. Hancock, «Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics», *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.*, vol. 14, núm. 1, p. 1-21, feb. 2011.
- [104] T. Patel i A. Levitin, «*Escherichia Coli* Adaptive Resistance to Clinical Antibiotics», *JSM Microbiol.*, gen. 2014.
- [105] J. A. Karlowsky, D. J. Hoban, S. A. Zelenitsky, i G. G. Zhanel, «Altered denA and anr gene expression in aminoglycoside adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 40, núm. 3, p. 371-376, set. 1997.
- [106] W. Yuan *et al.*, «Cell wall thickening is associated with adaptive resistance to amikacin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 68, núm. 5, p. 1089-1096, maig 2013.
- [107] M. Braoudaki i A. C. Hilton, «Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 42, núm. 1, p. 73-78, gen. 2004.
- [108] E. Roscetto *et al.*, «Functional characterization of the RNA chaperone Hfq in the opportunistic human pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*», *J. Bacteriol.*, vol. 194, núm. 21, p. 5864-5874, nov. 2012.
- [109] M. B. Sanchez, A. Hernandez, i J. L. Martinez, «*Stenotrophomonas maltophilia* drug resistance», *Future Microbiol.*, vol. 4, núm. 6, p. 655-660, ago. 2009.
- [110] M. B. Avison, C. S. Higgins, P. J. Ford, C. J. von Heldreich, T. R. Walsh, i P. M. Bennett, «Differential regulation of L1 and L2 beta-lactamase expression in *Stenotrophomonas maltophilia*», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 49, núm. 2, p. 387-389, feb. 2002.
- [111] L. Zhang, X. Z. Li, i K. Poole, «Multiple antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: involvement of a multidrug efflux system», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, núm. 2, p. 287-293, feb. 2000.
- [112] A. Okazaki i M. B. Avison, «Induction of L1 and L2 beta-lactamase production in *Stenotrophomonas maltophilia* is dependent on an AmpR-type regulator», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 52, núm. 4, p. 1525-1528, abr. 2008.
- [113] C.-W. Lin, Y.-W. Huang, R.-M. Hu, K.-H. Chiang, i T.-C. Yang, «The role of AmpR in regulation of L1 and L2 beta-lactamases in *Stenotrophomonas maltophilia*», *Res. Microbiol.*, vol. 160, núm. 2, p. 152-158, març 2009.
- [114] Y.-W. Huang, C.-W. Lin, R.-M. Hu, Y.-T. Lin, T.-C. Chung, i T.-C. Yang, «AmpN-AmpG operon is essential for expression of L1 and L2 beta-lactamases in *Stenotrophomonas maltophilia*», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, núm. 6, p. 2583-2589, juny 2010.
- [115] C.-W. Lin, R.-M. Hu, S.-C. Huang, Y.-J. Hsiao, i T.-C. Yang, «Induction potential of clavulanic acid toward L1 and L2 beta-lactamases of *Stenotrophomonas maltophilia*», *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.*, vol. 27, núm. 12, p. 1273-1275, des. 2008.
- [116] N. al Naiemi, B. Duim, i A. Bart, «A CTX-M extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*», *J. Med. Microbiol.*, vol. 55, núm. Pt 11, p. 1607-1608, nov. 2006.
- [117] H. H. Cho, J. Y. Sung, K. C. Kwon, i S. H. Koo, «Expression of Sme efflux pumps and multilocus sequence typing in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*», *Ann. Lab. Med.*, vol. 32, núm. 1, p. 38-43, gen. 2012.
- [118] M. Putman, H. W. van Veen, i W. N. Konings, «Molecular properties of bacterial multidrug transporters», *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR*, vol. 64, núm. 4, p. 672-693, des. 2000.
- [119] R. Barbolla *et al.*, «Class 1 integrons increase trimethoprim-sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 48, núm. 2, p. 666-669, feb. 2004.
- [120] H.-S. Chung, K. Kim, S. S. Hong, S. G. Hong, K. Lee, i Y. Chong, «The sul1 gene in *Stenotrophomonas maltophilia* with high-level resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole», *Ann. Lab. Med.*, vol. 35, núm. 2, p. 246-249, març 2015.
- [121] L.-F. Hu *et al.*, «*Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of sul and dfrA genes in a plasmid-mediated class 1 integron», *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 37, núm. 3, p. 230-234, març 2011.
- [122] M. B. Sánchez i J. L. Martínez, «The efflux pump SmeDEF contributes to trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 59, núm. 7, p. 4347-4348, jul. 2015.
- [123] C.-W. Lin, Y.-W. Huang, R.-M. Hu, i T.-C. Yang, «SmeOP-TolCsm efflux pump contributes to the multidrug resistance of *Stenotrophomonas maltophilia*», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 58, núm. 4, p. 2405-2408, 2014.
- [124] S. Valdezate, A. Vindel, J. A. Saéz-Nieto, F. Baquero, i R. Cantón, «Preservation of topoisomerase genetic sequences during in vivo and in vitro development of high-level resistance to ciprofloxacin in isogenic *Stenotrophomonas maltophilia* strains», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 56, núm. 1, p. 220-223, jul. 2005.

- [125] M. B. Sánchez i J. L. Martínez, «SmQnr contributes to intrinsic resistance to quinolones in *Stenotrophomonas maltophilia*», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, núm. 1, p. 580-581, gen. 2010.
- [126] G. García-León, F. Salgado, J. C. Oliveros, M. B. Sánchez, i J. L. Martínez, «Interplay between intrinsic and acquired resistance to quinolones in *Stenotrophomonas maltophilia*», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 16, núm. 5, p. 1282-1296, maig 2014.
- [127] X.-Z. Li, L. Zhang, G. A. McKay, i K. Poole, «Role of the acetyltransferase AAC(6')-Iz modifying enzyme in aminoglycoside resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 51, núm. 4, p. 803-811, abr. 2003.
- [128] A. Okazaki i M. B. Avison, «Aph(3')-IIc, an aminoglycoside resistance determinant from *Stenotrophomonas maltophilia*», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 51, núm. 1, p. 359-360, gen. 2007.
- [129] T. Tada *et al.*, «Identification of a novel 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase, AAC(6')-Iak, from a multidrug-resistant clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 58, núm. 10, p. 6324-6327, oct. 2014.
- [130] R.-M. Hu, K.-J. Huang, L.-T. Wu, Y.-J. Hsiao, i T.-C. Yang, «Induction of L1 and L2 beta-lactamases of *Stenotrophomonas maltophilia*», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 52, núm. 3, p. 1198-1200, març 2008.
- [131] T.-C. Yang, Y.-W. Huang, R.-M. Hu, S.-C. Huang, i Y.-T. Lin, «AmpDI is involved in expression of the chromosomal L1 and L2 beta-lactamases of *Stenotrophomonas maltophilia*», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, núm. 7, p. 2902-2907, jul. 2009.
- [132] C.-W. Lin, H.-C. Lin, Y.-W. Huang, T.-C. Chung, i T.-C. Yang, «Inactivation of *mrcA* gene derepresses the basal-level expression of L1 and L2 β -lactamases in *Stenotrophomonas maltophilia*», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 66, núm. 9, p. 2033-2037, set. 2011.
- [133] X.-Z. Li, L. Zhang, i K. Poole, «SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of *Stenotrophomonas maltophilia*», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 46, núm. 2, p. 333-343, feb. 2002.
- [134] L. Zhang, X. Z. Li, i K. Poole, «SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 45, núm. 12, p. 3497-3503, des. 2001.
- [135] A. Alonso i J. L. Martínez, «Cloning and characterization of SmeDEF, a novel multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, núm. 11, p. 3079-3086, nov. 2000.
- [136] V. C. Gould, A. Okazaki, i M. B. Avison, «Coordinate hyperproduction of SmeZ and SmeJK efflux pumps extends drug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 57, núm. 1, p. 655-657, gen. 2013.
- [137] C.-H. Chen, C.-C. Huang, T.-C. Chung, R.-M. Hu, Y.-W. Huang, i T.-C. Yang, «Contribution of resistance-nodulation-division efflux pump operon *smeU1-V-W-U2-X* to multidrug resistance of *Stenotrophomonas maltophilia*», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 55, núm. 12, p. 5826-5833, des. 2011.
- [138] A. Al-Hamad, M. Upton, i J. Burnie, «Molecular cloning and characterization of SmrA, a novel ABC multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 64, núm. 4, p. 731-734, oct. 2009.
- [139] Y.-T. Lin, Y.-W. Huang, R.-S. Liou, Y.-C. Chang, i T.-C. Yang, «MacABCsm, an ABC-type tripartite efflux pump of *Stenotrophomonas maltophilia* involved in drug resistance, oxidative and envelope stress tolerances and biofilm formation», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 69, núm. 12, p. 3221-3226, des. 2014.
- [140] Y.-W. Huang, R.-M. Hu, F.-Y. Chu, H.-R. Lin, i T.-C. Yang, «Characterization of a major facilitator superfamily (MFS) tripartite efflux pump EmrCABsm from *Stenotrophomonas maltophilia*», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 68, núm. 11, p. 2498-2505, nov. 2013.
- [141] R.-M. Hu, S.-T. Liao, C.-C. Huang, Y.-W. Huang, i T.-C. Yang, «An inducible fusaric acid tripartite efflux pump contributes to the fusaric acid resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*», *PLoS One*, vol. 7, núm. 12, p. e51053, 2012.
- [142] Y.-C. Chang, M.-J. Tsai, Y.-W. Huang, T.-C. Chung, i T.-C. Yang, «SmQnrR, a DeoR-type transcriptional regulator, negatively regulates the expression of Smqnr and SmtcrA in *Stenotrophomonas maltophilia*», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 66, núm. 5, p. 1024-1028, maig 2011.
- [143] R. G. Benedict i A. F. Langlykke, «Antibiotic activity of *Bacillus polymyxa*», *J. Bacteriol.*, vol. 54, núm. 1, p. 24, jul. 1947.
- [144] M. E. Falagas i S. K. Kasiakou, «Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections», *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*, vol. 40, núm. 9, p. 1333-1341, maig 2005.
- [145] T. Velkov, P. E. Thompson, R. L. Nation, i J. Li, «Structure-activity relationships of polymyxin antibiotics», *J. Med. Chem.*, vol. 53, núm. 5, p. 1898-1916, març 2010.
- [146] T. Velkov, K. D. Roberts, R. L. Nation, P. E. Thompson, i J. Li, «Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics», *Future Microbiol.*, vol. 8, núm. 6, juny 2013.
- [147] L. Poirel, A. Jayol, i P. Nordmann, «Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes», *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 30, núm. 2, p. 557-596, abr. 2017.
- [148] A. Z. Bialvaei i H. Samadi Kafil, «Colistin, mechanisms and prevalence of resistance», *Curr. Med. Res. Opin.*, vol. 31, núm. 4, p. 707-721, abr. 2015.
- [149] M. J. Trimble, P. Mlynářčík, M. Kolář, i R. E. W. Hancock, «Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance», *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 6, núm. 10, oct. 2016.
- [150] «Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial susceptibility testing. Approved standard. 28th edition. M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2018».
- [151] «European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0. 2018. Available at: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/».
- [152] A. P. Zavascki i R. L. Nation, «Nephrotoxicity of Polymyxins: Is There Any Difference between Colistimethate and Polymyxin B?»», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 61, núm. 3, feb. 2017.
- [153] L. Sorlí *et al.*, «Trough colistin plasma level is an independent risk factor for nephrotoxicity: a prospective observational cohort study», *BMC Infect. Dis.*, vol. 13, p. 380, ago. 2013.
- [154] L. Sorlí *et al.*, «Impact of colistin plasma levels on the clinical outcome of patients with infections caused by extremely drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*», *BMC Infect. Dis.*, vol. 17, gen. 2017.
- [155] N. Petrosillo, E. Ioannidou, i M. E. Falagas, «Colistin monotherapy vs. combination therapy: evidence from microbiological, animal and clinical studies», *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 14, núm. 9, p. 816-827, set. 2008.
- [156] O. Zusman *et al.*, «Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 57, núm. 10, p. 5104-5111, oct. 2013.
- [157] M. Paul *et al.*, «Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 69, núm. 9, p. 2305-2309, set. 2014.

7. Bibliografia

- [158] J. Lora-Tamayo *et al.*, «Activity of colistin combined with doripenem at clinically relevant concentrations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro dynamic biofilm model», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 69, núm. 9, p. 2434-2442, set. 2014.
- [159] Y.-Y. Liu *et al.*, «Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study», *Lancet Infect. Dis.*, vol. 16, núm. 2, p. 161-168, feb. 2016.
- [160] A. O. Olaitan, S. Morand, i J.-M. Rolain, «Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria», *Front. Microbiol.*, vol. 5, p. 643, 2014.
- [161] M. D. Adams *et al.*, «Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, núm. 9, p. 3628-3634, set. 2009.
- [162] E. Llobet, M. A. Campos, P. Giménez, D. Moranta, i J. A. Bengoechea, «Analysis of the Networks Controlling the Antimicrobial-Peptide-Dependent Induction of *Klebsiella pneumoniae* Virulence Factors», *Infect. Immun.*, vol. 79, núm. 9, p. 3718-3732, gen. 2011.
- [163] J. H. Moffatt *et al.*, «Colistin Resistance in *Acinetobacter baumannii* Is Mediated by Complete Loss of Lipopolysaccharide Production», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, núm. 12, p. 4971-4977, gen. 2010.
- [164] S. Baron, L. Hadjadj, J.-M. Rolain, i A. O. Olaitan, «Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns», *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 48, núm. 6, p. 583-591, des. 2016.
- [165] S. D. Majumdar *et al.*, «Elucidation of the RamA Regulon in *Klebsiella pneumoniae* Reveals a Role in LPS Regulation», *PLOS Pathog.*, vol. 11, núm. 1, p. e1004627, gen. 2015.
- [166] M. R. Spinosa, C. Progida, A. Talà, L. Cogli, P. Alifano, i C. Bucci, «The *Neisseria meningitidis* capsule is important for intracellular survival in human cells», *Infect. Immun.*, vol. 75, núm. 7, p. 3594-3603, jul. 2007.
- [167] V. B. Srinivasan i G. Rajamohan, «KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 57, núm. 9, p. 4449-4462, set. 2013.
- [168] J. R. Chambers i K. Sauer, «The MerR-like regulator BrIR impairs *Pseudomonas aeruginosa* biofilm tolerance to colistin by repressing PhoPQ», *J. Bacteriol.*, vol. 195, núm. 20, p. 4678-4688, oct. 2013.
- [169] D. M. Warner i S. B. Levy, «Different effects of transcriptional regulators MarA, SoxS and Rob on susceptibility of *Escherichia coli* to cationic antimicrobial peptides (CAMPs): Rob-dependent CAMP induction of the marRAB operon», *Microbiol. Read. Engl.*, vol. 156, núm. Pt 2, p. 570-578, feb. 2010.
- [170] S. J. Pamp, M. Gjermansen, H. K. Johansen, i T. Tolker-Nielsen, «Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the pmr and mexAB-oprM genes», *Mol. Microbiol.*, vol. 68, núm. 1, p. 223-240, abr. 2008.
- [171] R. Gao *et al.*, «Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance», *PLoS Pathog.*, vol. 12, núm. 11, nov. 2016.
- [172] K. Zurfluh, T. Tasara, L. Poirel, P. Nordmann, i R. Stephan, «Draft Genome Sequence of *Escherichia coli* S51, a Chicken Isolate Harboring a Chromosomally Encoded mcr-1 Gene», *Genome Announc.*, vol. 4, núm. 4, ago. 2016.
- [173] L. Poirel, N. Kieffer, A. Brink, J. Coetze, A. Jayol, i P. Nordmann, «Genetic Features of MCR-1-Producing Colistin-Resistant *Escherichia coli* Isolates in South Africa», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 60, núm. 7, p. 4394-4397, jul. 2016.
- [174] V. Di Pilato *et al.*, «mcr-1.2, a New mcr Variant Carried on a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain of Sequence Type 512», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 60, núm. 9, p. 5612-5615, set. 2016.
- [175] B. B. Xavier *et al.*, «Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016», *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.*, vol. 21, núm. 27, jul. 2016.
- [176] J. A. Hammerl *et al.*, «mcr-5 and a novel mcr-5.2 variant in *Escherichia coli* isolates from food and food-producing animals, Germany, 2010 to 2017», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 73, núm. 5, p. 1433-1435, maig 2018.
- [177] J. Zhang *et al.*, «Molecular detection of colistin resistance genes (mcr-1, mcr-2 and mcr-3) in nasal/oropharyngeal and anal/ocloacal swabs from pigs and poultry», *Sci. Rep.*, vol. 8, núm. 1, p. 3705, feb. 2018.
- [178] G. Klein, S. Müller-Loennies, B. Lindner, N. Kobylak, H. Brade, i S. Raina, «Molecular and structural basis of inner core lipopolysaccharide alterations in *Escherichia coli*: incorporation of glucuronic acid and phosphoethanolamine in the heptose region», *J. Biol. Chem.*, vol. 288, núm. 12, p. 8111-8127, març 2013.
- [179] T. Halaby *et al.*, «Genomic Characterization of Colistin Heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* during a Nosocomial Outbreak», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 60, núm. 11, p. 6837-6843, nov. 2016.
- [180] O. M. El-Halfawy i M. A. Valvano, «Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity», *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 28, núm. 1, p. 191-207, gen. 2015.
- [181] V. I. Band *et al.*, «Antibiotic failure mediated by a resistant subpopulation in *Enterobacter cloacae*», *Nat. Microbiol.*, vol. 1, núm. 6, p. 16053, 09 2016.
- [182] A. Brauner, O. Fridman, O. Gefen, i N. Q. Balaban, «Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment», *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 14, núm. 5, p. 320-330, 2016.
- [183] J. Li *et al.*, «Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 50, núm. 9, p. 2946-2950, set. 2006.
- [184] K. Hjort, H. Nicoloff, i D. I. Andersson, «Unstable tandem gene amplification generates heteroresistance (variation in resistance within a population) to colistin in *Salmonella enterica*», *Mol. Microbiol.*, vol. 102, núm. 2, p. 274-289, oct. 2016.
- [185] J. Barin, A. F. Martins, B. L. Heineck, A. L. Barth, i A. P. Zavascki, «Hetero- and adaptive resistance to polymyxin B in OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates», *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, vol. 12, p. 15, jul. 2013.
- [186] B. A. Napier, V. Band, E. M. Burd, i D. S. Weiss, «Colistin heteroresistance in *Enterobacter cloacae* is associated with cross-resistance to the host antimicrobial lysozyme», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 58, núm. 9, p. 5594-5597, set. 2014.
- [187] F. Guérin *et al.*, «Cluster-dependent colistin hetero-resistance in *Enterobacter cloacae* complex», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 71, núm. 11, p. 3058-3061, nov. 2016.
- [188] V. Romero Díaz-Maroto, C. Pérez Menéndez-Conde, M. I. Morosini Reilly, i T. Bermejo Vicedo, «[Treatment of *Stenotrophomonas maltophilia* meningoencephalitis with intraventricular colistin]», *Farm. Hosp. Organo Of. Expresion Cient. Soc. Espanola Farm. Hosp.*, vol. 38, núm. 3, p. 252-253, maig 2014.
- [189] E. B. M. Breidenstein, C. de la Fuente-Núñez, i R. E. W. Hancock, «*Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance», *Trends Microbiol.*, vol. 19, núm. 8, p. 419-426, ago. 2011.

- [190] L. Fernández, W. J. Gooderham, M. Bains, J. B. McPhee, I. Wiegand, i R. E. W. Hancock, «Adaptive resistance to the “last hope” antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, núm. 8, p. 3372-3382, ago. 2010.
- [191] N. Prim, A. Rivera, M. Español, B. Mirelis, i P. Coll, «In Vivo Adaptive Resistance to Colistin in *Escherichia coli* Isolates», *Clin. Infect. Dis.*, vol. 61, núm. 10, p. 1628-1629, nov. 2015.
- [192] Y. D. Bakthavatchalam, A. K. Pragasam, I. Biswas, i B. Veeraraghavan, «Polymyxin susceptibility testing, interpretative breakpoints and resistance mechanisms: An update», *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, vol. 12, p. 124-136, set. 2017.
- [193] «Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. 10th edition. M07 A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2015». .
- [194] «The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and Clinical and Laboratory Standards Institute. Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. 2016. Available at: http://www.eucast.org/guidance_documents/». .
- [195] D. Landman, J. Salamera, i J. Quale, «Irreproducible and Uninterpretable Polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 51, núm. 12, p. 4106-4111, gen. 2013.
- [196] J. A. Hindler i R. M. Humphries, «Colistin MIC Variability by Method for Contemporary Clinical Isolates of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 51, núm. 6, p. 1678-1684, gen. 2013.
- [197] B. Behera *et al.*, «Evaluation of susceptibility testing methods for polymyxin», *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 14, núm. 7, p. e596-e601, jul. 2010.
- [198] J. R. Lo-Ten-Foe, A. M. G. A. de Smet, B. M. W. Diederer, J. A. J. W. Kluytmans, i P. H. J. van Keulen, «Comparative Evaluation of the VITEK 2, Disk Diffusion, Etest, Broth Microdilution, and Agar Dilution Susceptibility Testing Methods for Colistin in Clinical Isolates, Including Heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* Strains», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 51, núm. 10, p. 3726-3730, gen. 2007.
- [199] M. Hogardt, S. Schmoldt, M. Götzfried, K. Adler, i J. Heesemann, «Pitfalls of polymyxin antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 54, núm. 6, p. 1057-1061, des. 2004.
- [200] S. M. Maalej, M. R. Meziou, F. M. Rhimi, i A. Hammami, «Comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution for susceptibility testing of colistin against *Enterobacteriaceae*», *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 53, núm. 5, p. 546-551, nov. 2011.
- [201] L. A. Arroyo *et al.*, «Reliability of the E-Test Method for Detection of Colistin Resistance in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 43, núm. 2, p. 903-905, gen. 2005.
- [202] T. Y. Tan i S. Y. Ng, «Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin», *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 13, núm. 5, p. 541-544, maig 2007.
- [203] L. R. R. Perez, «Evaluation of polymyxin susceptibility profile among KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* using Etest and MicroScan WalkAway automated system», *APMIS*, vol. 123, núm. 11, p. 951-954, nov. 2015.
- [204] A. Ribera, J. Ruiz, M. T. Jimenez de Anta, i J. Vila, «Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 49, núm. 4, p. 697-698, abr. 2002.
- [205] A. Ribera *et al.*, «In vitro activity of ciprofloxacin in comparison with other quinolones against *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates in the presence and absence of reserpine», *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 42, núm. 2, p. 123-128, feb. 2002.
- [206] M. A. Jacobs *et al.*, «Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, núm. 24, p. 14339-14344, nov. 2003.
- [207] D. F. Aubert, M. A. Hamad, i M. A. Valvano, «A markerless deletion method for genetic manipulation of *Burkholderia cenocepacia* and other multidrug-resistant gram-negative bacteria», *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 1197, p. 311-327, 2014.
- [208] S. Kaiser, K. Biehler, i D. Jonas, «A *Stenotrophomonas maltophilia* multilocus sequence typing scheme for inferring population structure», *J. Bacteriol.*, vol. 191, núm. 9, p. 2934-2943, maig 2009.
- [209] Y. L. Wang, M. R. Scipione, Y. Dubrovskaya, i J. Papadopoulos, «Monotherapy with Fluoroquinolone or Trimethoprim-Sulfamethoxazole for Treatment of *Stenotrophomonas maltophilia* Infections», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 58, núm. 1, p. 176-182, gen. 2014.
- [210] A.-P. Magiorakos *et al.*, «Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance», *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 18, núm. 3, p. 268-281, març 2012.
- [211] S. D. Sarker, L. Nahar, i Y. Kumarasamy, «Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals», *Methods San Diego Calif*, vol. 42, núm. 4, p. 321-324, ago. 2007.
- [212] J. Li *et al.*, «Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 50, núm. 9, p. 2946-2950, set. 2006.
- [213] M.-W. Tan, L. G. Rahme, J. A. Sternberg, R. G. Tompkins, i F. M. Ausubel, «*Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 96, núm. 5, p. 2408-2413, feb. 1999.
- [214] M. A. Hamad, A. M. Skeldon, i M. A. Valvano, «Construction of Aminoglycoside-Sensitive *Burkholderia cenocepacia* Strains for Use in Studies of Intracellular Bacteria with the Gentamicin Protection Assay», *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, núm. 10, p. 3170-3176, maig 2010.
- [215] J. Sambrook, E. F. Fritsch, i T. Maniatis, «Molecular cloning: a laboratory manual.», *Mol. Cloning Lab. Man.*, núm. Ed. 2, 1989.
- [216] K.-H. Choi, A. Kumar, i H. P. Schweizer, «A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation», *J. Microbiol. Methods*, vol. 64, núm. 3, p. 391-397, març 2006.
- [217] W. J. Kent, «BLAT--the BLAST-like alignment tool», *Genome Res.*, vol. 12, núm. 4, p. 656-664, abr. 2002.
- [218] S. Kumar, G. Stecher, i K. Tamura, «MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets», *Mol. Biol. Evol.*, vol. 33, núm. 7, p. 1870-1874, jul. 2016.
- [219] J. H. Song *et al.*, «[Analysis of acquired resistance genes in *Stenotrophomonas maltophilia*], *Korean J. Lab. Med.*, vol. 30, núm. 3, p. 295-300, juny 2010.

7. Bibliografia

- [220] D. Gülmez i G. Hasçelik, «Stenotrophomonas maltophilia: antimicrobial resistance and molecular typing of an emerging pathogen in a Turkish university hospital», *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 11, núm. 11, p. 880-886, nov. 2005.
- [221] S. Valdezate, A. Vindel, P. Martín-Dávila, B. S. Del Saz, F. Baquero, i R. Cantón, «High genetic diversity among Stenotrophomonas maltophilia strains despite their originating at a single hospital», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 42, núm. 2, p. 693-699, feb. 2004.
- [222] L. H. Travassos, M. N. Pinheiro, F. S. Coelho, J. L. M. Sampaio, V. L. C. Merquior, i E. A. Marques, «Phenotypic properties, drug susceptibility and genetic relatedness of Stenotrophomonas maltophilia clinical strains from seven hospitals in Rio de Janeiro, Brazil», *J. Appl. Microbiol.*, vol. 96, núm. 5, p. 1143-1150, 2004.
- [223] A. Guyot, J. F. Turton, i D. Garner, «Outbreak of Stenotrophomonas maltophilia on an intensive care unit», *J. Hosp. Infect.*, vol. 85, núm. 4, p. 303-307, des. 2013.
- [224] M.-S. Abbassi *et al.*, «Stenotrophomonas maltophilia responsible for respiratory infections in neonatal intensive care unit: antibiotic susceptibility and molecular typing», *Pathol. Biol. (Paris)*, vol. 57, núm. 5, p. 363-367, jul. 2009.
- [225] M. Crispino, M. C. Boccia, M. Bagattini, P. Villari, M. Triassi, i R. Zarrilli, «Molecular epidemiology of Stenotrophomonas maltophilia in a university hospital», *J. Hosp. Infect.*, vol. 52, núm. 2, p. 88-92, oct. 2002.
- [226] L. Hauben, L. Vauterin, E. R. Moore, B. Hoste, i J. Swings, «Genomic diversity of the genus Stenotrophomonas», *Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. 49 Pt 4, p. 1749-1760, oct. 1999.
- [227] H.-S. Chung *et al.*, «Antimicrobial susceptibility of stenotrophomonas maltophilia isolates from Korea, and the activity of antimicrobial combinations against the isolates», *J. Korean Med. Sci.*, vol. 28, núm. 1, p. 62-66, gen. 2013.
- [228] S. W. Gallo, T. P. Figueiredo, M. C. Bessa, V. E. Pagnussatti, C. A. S. Ferreira, i S. D. Oliveira, «Isolation and Characterization of Stenotrophomonas maltophilia Isolates from a Brazilian Hospital», *Microb. Drug Resist. Larchmt. N.*, vol. 22, núm. 8, p. 688-695, des. 2016.
- [229] H. Wu *et al.*, «A multicenter surveillance of antimicrobial resistance on Stenotrophomonas maltophilia in Taiwan», *J. Microbiol. Immunol. Infect. Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, vol. 45, núm. 2, p. 120-126, abr. 2012.
- [230] M. Xun, Y. Zhang, B.-L. Li, M. Wu, Y. Zong, i Y.-M. Yin, «Clinical characteristics and risk factors of infections caused by Stenotrophomonas maltophilia in a hospital in northwest China», *J. Infect. Dev. Ctries.*, vol. 8, núm. 8, p. 1000-1005, ago. 2014.
- [231] A. Pompilio *et al.*, «Stenotrophomonas maltophilia Phenotypic and Genotypic Diversity during a 10-year Colonization in the Lungs of a Cystic Fibrosis Patient», *Front. Microbiol.*, vol. 7, p. 1551, 2016.
- [232] C. Wei, W. Ni, X. Cai, J. Zhao, i J. Cui, «Evaluation of Trimethoprim/Sulfamethoxazole (SXT), Minocycline, Tigecycline, Moxifloxacin, and Ceftazidime Alone and in Combinations for SXT-Susceptible and SXT-Resistant Stenotrophomonas maltophilia by In Vitro Time-Kill Experiments», *PLoS One*, vol. 11, núm. 3, p. e0152132, 2016.
- [233] J. Y. Rhee, J. H. Song, i K. S. Ko, «Current Situation of Antimicrobial Resistance and Genetic Differences in Stenotrophomonas maltophilia Complex Isolates by Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis», *Infect. Chemother.*, vol. 48, núm. 4, p. 285-293, des. 2016.
- [234] G. Samonis *et al.*, «Stenotrophomonas maltophilia infections in a general hospital: patient characteristics, antimicrobial susceptibility, and treatment outcome», *PLoS One*, vol. 7, núm. 5, p. e37375, 2012.
- [235] S. Biswas, J.-C. Dubus, M. Reynaud-Gaubert, N. Stremler, i J.-M. Rolain, «Evaluation of colistin susceptibility in multidrug-resistant clinical isolates from cystic fibrosis, France», *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.*, vol. 32, núm. 11, p. 1461-1464, nov. 2013.
- [236] R. P. Ryan, S. An, J. H. Allan, Y. McCarthy, i J. M. Dow, «The DSF Family of Cell-Cell Signals: An Expanding Class of Bacterial Virulence Regulators», *PLoS Pathog.*, vol. 11, núm. 7, p. e1004986, jul. 2015.
- [237] S.-J. Liaw, Y.-L. Lee, i P.-R. Hsueh, «Multidrug resistance in clinical isolates of Stenotrophomonas maltophilia: roles of integrons, efflux pumps, phosphoglucosyltransferase (SpgM), and melanin and biofilm formation», *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 35, núm. 2, p. 126-130, feb. 2010.
- [238] A. Pompilio *et al.*, «Phenotypic and genotypic characterization of Stenotrophomonas maltophilia isolates from patients with cystic fibrosis: genome diversity, biofilm formation, and virulence», *BMC Microbiol.*, vol. 11, p. 159, 2011.
- [239] C. Kong, S.-A. Eng, M.-P. Lim, i S. Nathan, «Beyond Traditional Antimicrobials: A Caenorhabditis elegans Model for Discovery of Novel Anti-infectives», *Front. Microbiol.*, vol. 7, p. 1956, 2016.
- [240] R. Mittal, S. Sharma, S. Chhibber, S. Aggarwal, V. Gupta, i K. Harjai, «Correlation between serogroup, in vitro biofilm formation and elaboration of virulence factors by uropathogenic Pseudomonas aeruginosa», *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 58, núm. 2, p. 237-243, març 2010.
- [241] Y. Wang, W. Zhang, Z. Wu, i C. Lu, «Reduced virulence is an important characteristic of biofilm infection of Streptococcus suis», *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 316, núm. 1, p. 36-43, març 2011.
- [242] A. Sierńko *et al.*, «Comparison of antibiotic resistance and virulence between biofilm-producing and non-producing clinical isolates of Enterococcus faecium», *Acta Biochim. Pol.*, vol. 62, núm. 4, p. 859-866, 2015.
- [243] A. Pompilio, V. Crocetta, S. De Nicola, F. Verginelli, E. Fiscarelli, i G. Di Bonaventura, «Cooperative pathogenicity in cystic fibrosis: Stenotrophomonas maltophilia modulates Pseudomonas aeruginosa virulence in mixed biofilm», *Front. Microbiol.*, vol. 6, p. 951, 2015.
- [244] J. Glavis-Bloom, M. Muhammed, i E. Mylonakis, «Of model hosts and man: using Caenorhabditis elegans, Drosophila melanogaster and Galleria mellonella as model hosts for infectious disease research», *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 710, p. 11-17, 2012.
- [245] M. Adamek, J. Overhage, S. Bathe, J. Winter, R. Fischer, i T. Schwartz, «Genotyping of environmental and clinical Stenotrophomonas maltophilia isolates and their pathogenic potential», *PLoS One*, vol. 6, núm. 11, p. e27615, 2011.
- [246] C. V. White, B. J. Darby, R. J. Breeden, i M. A. Herman, «A Stenotrophomonas maltophilia Strain Evades a Major Caenorhabditis elegans Defense Pathway», *Infect. Immun.*, vol. 84, núm. 2, p. 524-536, gen. 2016.
- [247] S. S. Richter *et al.*, «Evaluation of Sensititre Broth Microdilution Plate for determining the susceptibility of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae to polymyxins», *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 91, núm. 1, p. 89-92, maig 2018.
- [248] K. Gwozdziński, S. Azarderakhsh, C. Imirzalioglu, L. Falgenhauer, i T. Chakraborty, «An improved medium for colistin susceptibility testing», *J. Clin. Microbiol.*, p. JCM.01950-17, març 2018.
- [249] A. Jayol, P. Nordmann, C. André, L. Poirel, i V. Dubois, «Evaluation of three broth microdilution systems to determine colistin susceptibility of Gram-negative bacilli», *J. Antimicrob. Chemother.*, feb. 2018.

- [250] E. Matuschek, J. Åhman, C. Webster, i G. Kahlmeter, «Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter spp.*», *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, des. 2017.
- [251] E. Carretto *et al.*, «Clinical Validation of SensiTest Colistin, a Broth Microdilution-Based Method To Evaluate Colistin MICs», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 56, núm. 4, abr. 2018.
- [252] K. L. Chew, M.-V. La, R. T. P. Lin, i J. W. P. Teo, «Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and mcr-positive Enterobacteriaceae: Comparison of Sensititre, Microscan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution», *J. Clin. Microbiol.*, p. JCM.00268-17, juny 2017.
- [253] S. Vasoo, «Susceptibility Testing for the Polymyxins: Two Steps Back, Three Steps Forward?», *J. Clin. Microbiol.*, vol. 55, núm. 9, p. 2573-2582, set. 2017.
- [254] S. Simar, D. Sibley, D. Ashcraft, i G. Pankey, «Colistin and Polymyxin B Minimal Inhibitory Concentrations Determined by Etest Found Unreliable for Gram-Negative Bacilli», *Ochsner J.*, vol. 17, núm. 3, p. 239-242, 2017.
- [255] O. M. El-Halfawy i M. A. Valvano, «Chemical Communication of Antibiotic Resistance by a Highly Resistant Subpopulation of Bacterial Cells», *PLOS ONE*, vol. 8, núm. 7, p. e68874, jul. 2013.
- [256] L. Bardet, S. Baron, T. Leangapichart, L. Okdah, S. M. Diene, i J.-M. Rolain, «Deciphering Heteroresistance to Colistin in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate from Marseille, France», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 61, núm. 6, p. e00356-17, gen. 2017.
- [257] P. Srinivas i K. Rivard, «Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens», *Curr. Infect. Dis. Rep.*, vol. 19, núm. 11, p. 38, set. 2017.
- [258] S.-E. Cheah, J. Li, B. T. Tsuji, A. Forrest, J. B. Bulitta, i R. L. Nation, «Colistin and Polymyxin B Dosage Regimens against *Acinetobacter baumannii*: Differences in Activity and the Emergence of Resistance», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 60, núm. 7, p. 3921-3933, gen. 2016.
- [259] A. P. Zavascki *et al.*, «Emergence of polymyxin B resistance in a polymyxin B-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* causing bloodstream infection in a neutropenic patient during polymyxin B therapy», *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 90, núm. 2, p. 134-138, feb. 2018.
- [260] I. Caniaux, A. van Belkum, G. Zambardi, L. Poirel, i M. F. Gros, «MCR: modern colistin resistance», *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 36, núm. 3, p. 415-420, març 2017.
- [261] E. Dahdouh *et al.*, «A novel mutation in pmrB mediates colistin resistance during therapy of *Acinetobacter baumannii*», *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 49, núm. 6, p. 727-733, juny 2017.
- [262] A. Jayol, P. Nordmann, A. Brink, i L. Poirel, «Heteroresistance to Colistin in *Klebsiella pneumoniae* Associated with Alterations in the PhoPQ Regulatory System», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 59, núm. 5, p. 2780-2784, gen. 2015.
- [263] A. Jayol, L. Poirel, A. Brink, M.-V. Villegas, M. Yilmaz, i P. Nordmann, «Resistance to Colistin Associated with a Single Amino Acid Change in Protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* Isolates of Worldwide Origin», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 58, núm. 8, p. 4762-4766, gen. 2014.
- [264] A. Quesada, M. C. Porrero, S. Téllez, G. Palomo, M. García, i L. Domínguez, «Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 70, núm. 1, p. 71-74, gen. 2015.
- [265] J.-Y. Lee, E. S. Chung, I. Y. Na, H. Kim, D. Shin, i K. S. Ko, «Development of colistin resistance in pmrA-, phoP-, parR- and cprR-inactivated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 69, núm. 11, p. 2966-2971, nov. 2014.
- [266] D. M. Fernando i A. Kumar, «Resistance-Nodulation-Division Multidrug Efflux Pumps in Gram-Negative Bacteria: Role in Virulence», *Antibiotics*, vol. 2, núm. 1, p. 163-181, març 2013.
- [267] J. Huang *et al.*, «Comparative analysis of phosphoethanolamine transferases involved in polymyxin resistance across 10 clinically relevant Gram-negative bacteria», *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 51, núm. 4, p. 586-593, abr. 2018.
- [268] P. J. Stogios *et al.*, «Substrate Recognition by a Colistin Resistance Enzyme from *Moraxella catarrhalis*», *ACS Chem. Biol.*, vol. 13, núm. 5, p. 1322-1332, maig 2018.
- [269] D. D. Lucas *et al.*, «Emergence of high-level colistin resistance in an *Acinetobacter baumannii* clinical isolate mediated by inactivation of the global regulator H-NS», *Antimicrob. Agents Chemother.*, p. AAC.02442-17, abr. 2018.
- [270] J. Salazar, M. Alarcón, J. Huerta, B. Navarro, i D. Aguayo, «Phosphoethanolamine addition to the Heptose I of the Lipopolysaccharide modifies the inner core structure and has an impact on the binding of Polymyxin B to the *Escherichia coli* outer membrane», *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 620, p. 28-34, 15 2017.
- [271] J. B. McPhee, S. Lewenza, i R. E. W. Hancock, «Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*», *Mol. Microbiol.*, vol. 50, núm. 1, p. 205-217, oct. 2003.
- [272] C. Muller, P. Plésiat, i K. Jeannot, «A Two-Component Regulatory System Interconnects Resistance to Polymyxins, Aminoglycosides, Fluoroquinolones, and β -Lactams in *Pseudomonas aeruginosa*», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 55, núm. 3, p. 1211-1221, gen. 2011.
- [273] J. Dreier i P. Ruggerone, «Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*», *Front. Microbiol.*, vol. 6, 2015.
- [274] M. Puzari i P. Chetia, «RND efflux pump mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: a major issue worldwide», *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 33, núm. 2, p. 24, feb. 2017.
- [275] G. García-León, A. Hernández, S. Hernando-Amado, P. Alavi, G. Berg, i J. L. Martínez, «A function of SmeDEF, the major quinolone resistance determinant of *Stenotrophomonas maltophilia*, is the colonization of plant roots», *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, núm. 15, p. 4559-4565, ago. 2014.
- [276] G. García-León, C. Ruiz de Alegría Puig, C. García de la Fuente, L. Martínez-Martínez, J. L. Martínez, i M. B. Sánchez, «High-level quinolone resistance is associated with the overexpression of smeVWX in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates», *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 21, núm. 5, p. 464-467, maig 2015.
- [277] Y.-W. Huang, C.-W. Lin, H.-C. Ning, Y.-T. Lin, Y.-C. Chang, i T.-C. Yang, «Overexpression of SmeDEF Efflux Pump Decreases Aminoglycoside Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 61, núm. 5, maig 2017.
- [278] Y.-W. Huang, R.-S. Liou, Y.-T. Lin, H.-H. Huang, i T.-C. Yang, «A linkage between SmeJK efflux pump, cell envelope integrity, and σ E-mediated envelope stress response in *Stenotrophomonas maltophilia*», *PLoS One*, vol. 9, núm. 11, p. e111784, 2014.

7. Bibliografia

- [279] Y.-T. Lin, Y.-W. Huang, S.-J. Chen, C.-W. Chang, i T.-C. Yang, «The SmeYZ efflux pump of *Stenotrophomonas maltophilia* contributes to drug resistance, virulence-related characteristics, and virulence in mice», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 59, núm. 7, p. 4067-4073, jul. 2015.
- [280] S. Baugh, A. S. Ekanayaka, L. J. V. Piddock, i M. A. Webber, «Loss of or inhibition of all multidrug resistance efflux pumps of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in impaired ability to form a biofilm», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 67, núm. 10, p. 2409-2417, oct. 2012.
- [281] G. Di Bonaventura, S. Stepanović, C. Picciani, A. Pompilio, i R. Piccolomini, «Effect of environmental factors on biofilm formation by clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates», *Folia Microbiol. (Praha)*, vol. 52, núm. 1, p. 86-90, 2007.
- [282] J. B. Kaplan, «Antibiotic-induced biofilm formation», *Int. J. Artif. Organs*, vol. 34, núm. 9, p. 737-751, set. 2011.
- [283] J. Majtán, L. Majtánová, M. Xu, i V. Majtán, «In vitro effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on biofilm formation by clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Slovakia», *J. Appl. Microbiol.*, vol. 104, núm. 5, p. 1294-1301, maig 2008.
- [284] S. T. Aka, S. H. Haji, S. T. Aka, i S. H. Haji, «Sub-MIC of antibiotics induced biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of chlorhexidine», *Braz. J. Microbiol.*, vol. 46, núm. 1, p. 149-154, març 2015.
- [285] B. U. Tezel, N. Akçelik, F. N. Yüksel, N. T. Karatug, i M. Akçelik, «Effects of sub-MIC antibiotic concentrations on biofilm production of *Salmonella Infantis*», *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, vol. 30, núm. 6, p. 1184-1191, nov. 2016.
- [286] I. Alav, J. M. Sutton, i K. M. Rahman, «Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation», *J. Antimicrob. Chemother.*
- [287] D. G. Davies, M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton, i E. P. Greenberg, «The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm», *Science*, vol. 280, núm. 5361, p. 295-298, abr. 1998.
- [288] S. Favre-Bonté, T. Köhler, i C. Van Delden, «Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*: role of the C4-HSL cell-to-cell signal and inhibition by azithromycin», *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 52, núm. 4, p. 598-604, oct. 2003.
- [289] J. P. Pearson, C. Van Delden, i B. H. Iglewski, «Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals», *J. Bacteriol.*, vol. 181, núm. 4, p. 1203-1210, feb. 1999.
- [290] F. Lira *et al.*, «Whole-Genome Sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* D457, a Clinical Isolate and a Model Strain», *J. Bacteriol.*, vol. 194, núm. 13, p. 3563-3564, gen. 2012.
- [291] M. Ferrer-Navarro *et al.*, «Abundance of the Quorum-Sensing Factor Ax21 in Four Strains of *Stenotrophomonas maltophilia* Correlates with Mortality Rate in a New Zebrafish Model of Infection», *PLoS One*, vol. 8, núm. 6, p. e67207, 2013.
- [292] P. Huedo, O. Conchillo-Solé, D. Yero, S. Martínez-Servat, X. Daura, i I. Gibert, «Draft Genome Sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* Strain M30, Isolated from a Chronic Pressure Ulcer in an Elderly Patient», *Genome Announc.*, vol. 2, núm. 3, juny 2014.
- [293] O. Conchillo-Solé *et al.*, «Draft Genome Sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* Strain UV74 Reveals Extensive Variability within Its Genomic Group», *Genome Announc.*, vol. 3, núm. 3, juny 2015.
- [294] L. Fernández i R. E. W. Hancock, «Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance», *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 25, núm. 4, p. 661-681, gen. 2012.
- [295] J.-Y. Lee, M.-J. Choi, H. J. Choi, i K. S. Ko, «Preservation of Acquired Colistin Resistance in Gram-Negative Bacteria», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 60, núm. 1, p. 609-612, gen. 2016.
- [296] D. Gülmez, A. Cakar, B. Sener, J. Karakaya, i G. Haşçelik, «Comparison of different antimicrobial susceptibility testing methods for *Stenotrophomonas maltophilia* and results of synergy testing», *J. Infect. Chemother. Off. J. Jpn. Soc. Chemother.*, vol. 16, núm. 5, p. 322-328, oct. 2010.
- [297] E. A. Groisman, J. Kayser, i F. C. Soncini, «Regulation of polymyxin resistance and adaptation to low-Mg²⁺ environments», *J. Bacteriol.*, vol. 179, núm. 22, p. 7040-7045, nov. 1997.
- [298] M. R. Yeaman i N. Y. Yount, «Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance», *Pharmacol. Rev.*, vol. 55, núm. 1, p. 27-55, març 2003.
- [299] Y.-H. Cheng, T.-L. Lin, Y.-J. Pan, Y.-P. Wang, Y.-T. Lin, i J.-T. Wang, «Colistin Resistance Mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* Strains from Taiwan», *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 59, núm. 5, p. 2909-2913, maig 2015.
- [300] M.-C. Liu *et al.*, «*Stenotrophomonas maltophilia* PhoP, a Two-Component Response Regulator, Involved in Antimicrobial Susceptibilities», *PLoS One*, vol. 11, núm. 5, p. e0153753, 2016.



ANNEX

8. ANNEX

Taula A1. Llistat dels mutants de *P. aeruginosa* MPAO₁ utilitzats en aquest treball.

Nom de la soca	PA ORF		Gen	Funció putativa del ORF
Relacionats amb els mecanismes de resistència a colistina descrits en altres espècies				
PW ₃₁₂₈	PA ₁₁₇₉	<i>P. aeruginosa</i>	<i>phoP</i>	Regulador resposta de sistema de dos components PhoP
PW ₃₁₃₂	PA ₁₁₈₀	<i>P. aeruginosa</i>	<i>phoQ</i>	Sensor de sistema de dos components PhoQ
PW ₉₀₂₄	PA ₄₇₇₇	<i>A. baumannii</i>	<i>pmrB</i>	Sistema regulador de senyal de dos components, sensor quinasa PmrB
PW ₄₁₆₅	PA ₁₇₉₈	<i>P. aeruginosa</i>	<i>ParS</i>	Probable sensor de sistema de dos components
PW ₄₁₆₇	PA ₁₇₉₉	<i>P. aeruginosa</i>		Probable regulador de sistema de dos components
PW ₁₀₃₄₈	PA ₅₅₁₈	<i>Y. enterocolítica</i>		Probable transportador de flux de potassi
PW ₉₄₄₉	PA ₅₀₃₀	<i>Y. enterocolítica</i>		Probable transportador de la família de bombes MFS
PW ₇₅₄₄	PA ₃₈₇₇	<i>Y. enterocolítica</i>	<i>narK1</i>	Proteïna d'extrusió de nitrit
PW ₅₂₃₄	PA ₂₅₂₆	<i>C. jejuni</i>		Probable transportador de bombes de la família RND
PW ₆₉₉₇	PA ₃₅₄₀	<i>S. typhimurium</i>	<i>algD</i>	GDP-manosa 6-dehidrogenasa AlgD
Sistemes RND (Resistance-Nodulation-Cell Division)				
PW ₁₇₇₈	PA ₀₄₂₅		<i>mexA</i>	Proteïna de fusió a membrana de la bomba d'expulsió RND
PW ₁₇₈₁	PA ₀₄₂₆		<i>mexB</i>	Transportador de bomba d'expulsió RND
PW ₁₇₈₃	PA ₀₄₂₇		<i>oprM</i>	Proteïna de la membrana externa implicada en la resistència intrínseca de múltiples antibiòtics
PW ₈₇₄₈	PA ₄₅₉₇		<i>oprJ</i>	Proteïna de la membrana externa de la bomba d'expulsió
PW ₈₇₅₀	PA ₄₅₉₈		<i>mexD</i>	Transportador de bomba d'expulsió RND
PW ₈₇₅₁	PA ₄₅₉₉		<i>mexC</i>	Proteïna de fusió a membrana de la bomba d'expulsió RND
PW ₅₁₈₀	PA ₂₄₉₃		<i>mexE</i>	Proteïna de fusió a membrana de la bomba d'expulsió RND
PW ₅₁₈₄	PA ₂₄₉₄		<i>mexF</i>	Transportador de bomba d'expulsió RND
PW ₅₁₈₇	PA ₂₄₉₅		<i>oprN</i>	Proteïna de la membrana externa de la bomba d'expulsió
PW ₄₄₉₈	PA ₂₀₁₈			Transportador de bomba d'expulsió RND
PW ₄₅₀₀	PA ₂₀₁₉			Proteïna de fusió a membrana de la bomba d'expulsió RND
PW ₇₂₁₈	PA ₃₆₇₆			Probable transportador de bomba d'expulsió RND
PW ₇₂₂₀	PA ₃₆₇₇			Probable proteïna de fusió a membrana de la bomba d'expulsió RND
PW ₈₁₃₅	PA ₄₂₀₆		<i>mexH</i>	Probable proteïna de fusió a membrana de la bomba d'expulsió RND
PW ₈₁₃₇	PA ₄₂₀₇		<i>mexI</i>	Probable transportador de bomba d'expulsió RND
PW ₈₁₃₉	PA ₄₂₀₈		<i>opmD</i>	Probable proteïna de la membrana externa

Continuació Taula A1.

Nom de la soca	PA ORF	Gen	Funció putativa del ORF
Sistemes RND (<i>Resistance-Nodulation-Cell Division</i>)			
PW6960	PA3521		Probable proteïna de la membrana externa
PW6963	PA3522		Probable transportador de bomba d'expulsió RND
PW6965	PA3523		Probable proteïna de fusió a membrana de la bomba d'expulsió RND
PW3609	PA1435		Probable proteïna de fusió a membrana de la bomba d'expulsió RND
PW3611	PA1436		Probable transportador de bomba d'expulsió RND
PW8385	PA4374		Probable proteïna de fusió a membrana de la bomba d'expulsió RND
PW8390	PA4375		Probable transportador de bomba d'expulsió RND
PW5232	PA2525		Probable proteïna de la membrana externa
PW5233	PA2526		Probable transportador de bomba d'expulsió RND
PW5235	PA2527		Probable transportador de bomba d'expulsió RND
PW5237	PA2528		Probable proteïna de fusió a membrana de la bomba d'expulsió RND
PW5222	PA2520	<i>czcA</i>	Transportador de bomba de cations divalents de metalls del tipus RND
PW5224	PA2521	<i>czcB</i>	Proteïna de fusió a membrana de bomba de cations divalents de metalls del tipus RND
PW5226	PA2522	<i>czcC</i>	Proteïna de la membrana externa
PW1265	PA0156	<i>triA</i>	Proteïna de fusió a membrana de la bomba de triclosan del tipus RND
PW1267	PA0157	<i>triB</i>	Proteïna de fusió a membrana de la bomba de triclosan del tipus RND
PW1271	PA0158	<i>triC</i>	Transportador de la bomba d'expulsió de triclosan del tipus RND

Taula A2. Llistat de les 35 soques aïllades de l'hospital Charite Clinic de Berlin.

SOCA		Soca descartada en aquest estudi	Any aïllament	Hospital
PC184-DE13	Soques clòniques a	X	2012	Charite Clinic Berlin
PC185-DE13	PC186-DE13	X	2012	Charite Clinic Berlin
PC186-DE13			2012	Charite Clinic Berlin
PC187-DE13			2012	Charite Clinic Berlin
OC194-DE13			2012	Charite Clinic Berlin
OC195-DE13	Soques clòniques a	X	2012	Charite Clinic Berlin
OC196-DE13	OC197-DE13	X	2012	Charite Clinic Berlin
OC197-DE13			2012	Charite Clinic Berlin
PC226-DE13			2012	Charite Clinic Berlin
PC227-DE13		X	2012	Charite Clinic Berlin
PC228-DE13		X	2012	Charite Clinic Berlin
PC229-DE13	Soques clòniques a	X	2012	Charite Clinic Berlin
PC230-DE13	PC232-DE13	X	2012	Charite Clinic Berlin
PC231-DE13		X	2012	Charite Clinic Berlin
PC232-DE13			2012	Charite Clinic Berlin
PC237-DE13		X	2012	Charite Clinic Berlin
PC238-DE13	Soques clòniques a	X	2012	Charite Clinic Berlin
PC239-DE13	PC240-DE13	X	2012	Charite Clinic Berlin
PC240-DE13			2012	Charite Clinic Berlin
PC245-DE13			2012	Charite Clinic Berlin
PC246-DE13	Soca clònic a PC245-DE13	X	2012	Charite Clinic Berlin
PC254-DE13	Soca clònica a PC255-DE13	X	2012	Charite Clinic Berlin
PC255-DE13			2012	Charite Clinic Berlin
PC256-DE13	Soca clònica a PC257-DE13	X	2012	Charite Clinic Berlin
PC257-DE13			2012	Charite Clinic Berlin
PC271-DE13		X	2012	Charite Clinic Berlin
PC272-DE13	Soques clòniques a	X	2012	Charite Clinic Berlin
PC273-DE13	PC274-DE13	X	2012	Charite Clinic Berlin
PC274-DE13			2012	Charite Clinic Berlin
PC312-DE13			2012	Charite Clinic Berlin
PC313-DE13			2012	Charite Clinic Berlin
PC314-DE13			2012	Charite Clinic Berlin
PC315-DE13	Soca clònica a PC314-DE13	X	2012	Charite Clinic Berlin
OC322-DE13	Soca clònica a OC323-DE13	X	2012	Charite Clinic Berlin
OC323-DE13			2012	Charite Clinic Berlin

Amb una X s'han marcat aquelles soques descartades per considerar-se genèticament clònica a una altra escollida com a representativa.