



Programa de Doctorado en Biotecnología Sanitaria

Nuevas estrategias microbiológicas ante las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*.

Tesis Doctoral presentada para optar al grado de Doctor

Celia García Rivera

Director de la tesis

Dr. Juan Carlos Rodríguez Díaz

Codirectora de la tesis

Dra. Mónica Parra Grande

Universidad Miguel Hernández de Elche

Alicante, España

2025

La presente Tesis Doctoral, titulada

“Nuevas estrategias microbiológicas ante las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*.”

Se presenta bajo la modalidad de tesis por compendio de las siguientes publicaciones:

- García-Rivera C, Parra-Grande M, Merino E, Boix V, Rodríguez JC. Concordance of the filmarray blood culture identification panel 2 and classical microbiological methods in a bacteriemia diagnostic unit. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2022 Dec;104(4):115787. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2022.115787. Epub 2022 Aug 10. PMID: 36162284.
- García-Rivera C, Ricart-Silvestre A, Parra Grande M, Ventero MP, Tyshkovska-Germak I, Sánchez-Bautista A, Merino E, Rodríguez JC. Evaluation of the quickmic system in the rapid diagnosis of Gram-negative bacilli bacteremia. *Microbiol Spectr*. 2024 Oct 3;12(10):e0401123. doi: 10.1128/spectrum.04011-23. Epub 2024 Aug 28. PMID: 39194288; PMCID: PMC11448121.
- García-Rivera C, Navarro M, Parra M, Sánchez Bautista A, Gómez I, Ventero MP, Rodríguez JC. Actividad in vitro de delafloxacino frente a aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos en una etapa previa al uso clínico de este fármaco. *Rev Esp Quimioter*. 2024 Feb;37(1):104-105. Spanish. doi: 10.37201/req/080.2023. Epub 2023 Dec 22. PMID: 38140799; PMCID: PMC10874670.
- García-Rivera C, Sánchez-Bautista A, Parra-Grande M, Ricart-Silvestre A, Ventero MP, Tyshkovska I, Merino E, Rodríguez Díaz JC. Comparison of Different Methods for Assaying the In Vitro Activity of Cefiderocol against Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains: Influence of Bacterial Inoculum. *Antibiotics (Basel)*. 2024 Jul 18;13(7):663. doi: 10.3390/antibiotics13070663. PMID: 39061345; PMCID: PMC11273683.
- García-Rivera C, Molina-Pardines C, Haro-Moreno JM, Parra Grande M, Rodríguez JC, López-Pérez M. Genomic Analysis of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from a "One Health" Perspective. *Microorganisms*. 2024 Aug 27;12(9):1770. doi: 10.3390/microorganisms12091770. PMID: 39338445; PMCID: PMC11433808.



Dr. JUAN CARLOS RODRÍGUEZ DÍAZ, director

Dra. MÓNICA PARRA GRANDE, codirectora

INFORMAN

Celia García Rivera ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado “**Nuevas estrategias microbiológicas ante las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa***” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos para los efectos oportunos, en Alicante a 25 de Abril de 2025

Director de la tesis

Juan Carlos Rodríguez Díaz

Codirectora de la tesis

Mónica Parra Grande



El Dr. Gregorio Fernández Ballester, Coordinador del Programa de Doctorado en **Biología Sanitaria**

INFORMA:

Que Dña. Celia García Rivera ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado “**Nuevas estrategias microbiológicas ante las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa***” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en Elche a 20 de Mayo de 2025

Dr. Gregorio Fernández Ballester

Coordinador del Programa de Doctorado en **Biología Sanitaria**

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno prioritario para la microbiología clínica ya que provoca infecciones muy graves, muchas de ellas en el ámbito nosocomial y además presenta alta capacidad para desarrollar resistencia a múltiples antibióticos, lo que complica su tratamiento y control. Para mejorar su abordaje clínico, se evaluaron distintas estrategias microbiológicas. En el diagnóstico, se analizó el rendimiento clínico del sistema molecular FilmArray BCID2 en hemocultivos positivos, que permite identificar el patógeno y genes de resistencia en aproximadamente una hora. Su facilidad de uso y automatización facilita su integración en laboratorios de microbiología clínica, agilizando el inicio de tratamientos dirigidos en infecciones graves. También se evaluó el sistema QuickMIC, capaz de proporcionar perfiles de sensibilidad fenotípica en 2 a 4 horas. Este método permitió detectar mecanismos de resistencia no genotípicos, como la hiperproducción de AmpC o alteraciones en porinas, mejorando la toma de decisiones terapéuticas en infecciones por bacilos gramnegativos multirresistentes y contribuyendo a reducir el uso innecesario de antibióticos de amplio espectro. En el ámbito terapéutico, se estudió la actividad in vitro de delafloxacino frente a cepas clínicas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, observándose una eficacia superior a otras fluoroquinolonas, lo que sugiere su utilidad en contextos con opciones limitadas, siempre que se caractericen previamente los mecanismos de resistencia. Por su parte, cefiderocol mostró una elevada actividad frente a cepas multirresistentes, incluidas productoras de metalo- β -lactamasas, aunque su eficacia se vio influida por el método de sensibilidad empleado y el tamaño del inóculo. El E-test mostró mejor correlación con el método de referencia que la técnica de disco, y se observó una reducción de la actividad del fármaco con inóculos elevados, lo que podría favorecer la aparición de mutantes resistentes. Desde el punto de vista epidemiológico, se llevó a cabo un análisis genómico comparativo de 749 cepas de *P. aeruginosa* procedentes de entornos clínicos, acuáticos y del suelo, donde se refleja una alta plasticidad genética e independencia entre diversidad genética y entorno. Se identificaron elementos móviles con genes de resistencia compartidos entre entornos, algunos con distribución global, lo que representa un riesgo potencial para la salud pública. Estos hallazgos refuerzan la necesidad de adoptar una estrategia integrada bajo el enfoque “One Health”, que incluya vigilancia ambiental, uso racional de antimicrobianos y control microbiológico riguroso para contener la diseminación de resistencias y preservar la eficacia terapéutica.

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa is a priority pathogen in clinical microbiology due to its ability to cause severe infections, many of them in nosocomial settings, and its high capacity to develop resistance to multiple antibiotics, which complicates treatment and control. To improve its clinical management, various microbiological strategies were evaluated. In the diagnostic field, the clinical performance of the molecular system FilmArray BCID2 was assessed in positive blood cultures, enabling pathogen identification and resistance gene detection in approximately one hour. Its ease of use and automation facilitate integration into clinical microbiology laboratories, expediting the initiation of targeted therapies for severe infections. The QuickMIC system was also evaluated, providing phenotypic susceptibility profiles within 2 to 4 hours. This method allowed the detection of non-genotypic resistance mechanisms, such as AmpC hyperproduction or porin alterations, thus improving therapeutic decision-making in infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli and contributing to reduced use of broad-spectrum antibiotics. In the therapeutic field, the in vitro activity of delafloxacin against clinical carbapenem-resistant *P. aeruginosa* strains was studied, showing greater efficacy than other fluoroquinolones, suggesting its potential utility in contexts with limited treatment options, provided that resistance mechanisms are previously characterized. Cefiderocol also demonstrated high activity against multidrug-resistant strains, including metallo- β -lactamase producers, although its efficacy was influenced by the susceptibility testing method and inoculum size. The E-test showed better correlation with the reference method than disk diffusion, and decreased drug activity was observed with high inocula, which may favor the emergence of resistant mutants. From an epidemiological perspective, a comparative genomic analysis of 749 *P. aeruginosa* strains from clinical, aquatic, and soil environments revealed high genetic plasticity and independence between genetic diversity and ecological niche. Mobile elements carrying resistance genes were identified across environments, some with global distribution, representing a potential public health risk. These findings reinforce the need for an integrated strategy under the “One Health” approach, including environmental surveillance, rational antimicrobial use, and strict microbiological control to contain the spread of resistance and preserve therapeutic efficacy.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico	ME	Membrana externa
ARGs	Genes de resistencia a antimicrobianos	MI	Membrana interna
BCID2	BioFire FilmArray Blood Culture ID Panel 2	OMS	Organización Mundial de la Salud
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria	PDR	Panresistencia
CLSI	Comité de Estándares de Laboratorio Clínico	PVD	Pioverdina
CO₂	Dióxido de carbono	PROA	Programa de Optimización del Uso de Antimicrobianos
eDNA	ADN extracelular	QS	Quorum sensing
EPS	Sustancias poliméricas extracelulares	RAM	Resistencia antimicrobiana
ESBL	β -lactamasas de espectro extendido	ROS	Especies reactivas de oxígeno
ETA	Exotoxina A	T1SS	Sistema de secreción tipo I
EUCAST	Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana	T2SS	Sistema de secreción tipo II
FQ	Fibrosis quística	T3SS	Sistema de secreción tipo III
ITU	Infecciones del tracto urinario	T5SS	Sistema de secreción tipo V
LPS	Lipopolisacárido	T6SS	Sistema de secreción tipo VI
MALDI-TOF	Espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz tiempo de vuelo	UFC/ml	Unidad formadora de colonia por mililitro
MBL	Metallo- β -lactamasas	UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
MDR	Multirresistencia	XDR	Resistencia extendida



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Contexto general e Importancia clínica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
1.1.1 <i>Características generales de <i>Pseudomonas aeruginosa</i></i>	3
1.1.2 <i>Patogenicidad y factores de virulencia</i>	3
1.1.3 <i>Impacto clínico de las infecciones por <i>Pseudomonas aeruginosa</i></i>	10
1.2 Mecanismos de resistencia en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
1.2.1 <i>Resistencia intrínseca</i>	12
1.2.2 <i>Resistencia adquirida</i>	14
1.2.3 <i>Resistencia adaptativa</i>	15
1.3 Métodos de diagnóstico en infecciones por <i>Pseudomonas. aeruginosa</i>	15
1.3.1 <i>Detección e identificación de bacterias</i>	16
1.3.2 <i>Pruebas de susceptibilidad antibiótica</i>	17
1.4 Opciones terapéuticas en el manejo de infecciones por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 20	
1.4.1 <i>Nuevos agentes frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i></i>	21
1.5 Epidemiología y Evolución de la Resistencia en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
2. OBJETIVOS	27
Objetivo principal	29
Objetivos específicos	29
3. MATERIAL Y MÉTODOS	31
3.1 Diseño del estudio	33
3.1.1 <i>Optimización del diagnóstico rápido de infecciones causadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i></i>	33
3.1.2 <i>Desarrollo e innovación en métodos de evaluación de susceptibilidad antibiótica</i> ... 34	
3.1.3 <i>Exploración de nuevas estrategias terapéuticas</i>	36
3.1.4 <i>Análisis genómico comparativo de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en distintos entornos</i>	38
4. RESULTADOS	41
4.1 Optimización del diagnóstico rápido de infecciones causadas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
4.2 Desarrollo e innovación en métodos de evaluación de la susceptibilidad antibiótica. 43	
4.3 Exploración de nuevas estrategias terapéuticas	44
4.3.1 <i>Delafloxacino</i>	44
4.3.1 <i>Cefiderocol</i>	45

4.4 Análisis genómico comparativo de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en distintos entornos.....	46
6. DISCUSIÓN.....	49
7. CONCLUSIONES.....	57
8. REFERENCIAS	63
9. ANEXOS	85





1. INTRODUCCIÓN

1.1 Contexto general e Importancia clínica de *Pseudomonas aeruginosa*

La especie *Pseudomonas* incluye bacilos gram-negativos (BGN) pequeños que se disponen habitualmente en parejas. Estos microorganismos utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria (bacteria aerobia estricta). Sin embargo, también pueden crecer en condiciones de anaerobiosis, utilizando nitratos o arginina como aceptor alternativo para los electrones (1). Los miembros de esta especie son ubicuos en la naturaleza y en los ambientes húmedos. Se encuentran en el suelo, en materia orgánica en descomposición, en el agua y en la vegetación. Por ello, se han convertido en patógenos relevantes en los entornos hospitalarios, donde pueden colonizar superficies, equipos médicos, aguas, lavabos, incluso soluciones desinfectantes, aumentando el riesgo de infecciones nosocomiales (1).

1.1.1 Características generales de *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es un BGN móvil que crece fácilmente en la mayoría de los medios de cultivo convencionales. Su identificación en el laboratorio es sencilla a partir del cultivo primario, donde sus colonias presentan un aspecto metálico brillante y un característico olor a uva. Las características bioquímicas utilizadas para su diagnóstico incluyen su incapacidad para fermentar lactosa en agar MacConkey y una reacción positiva en la prueba de oxidasa (2). Presenta uno de los genomas bacterianos más grandes, lo que le permite adaptarse y crecer en una amplia variedad de ambientes, distribuyéndose en diversos entornos gracias a sus sencillas exigencias de crecimiento y su versatilidad nutricional (1). Es un patógeno oportunista que se asocia con una gran variedad de infecciones, pero sobre todo con infecciones en pacientes hospitalizados y en pacientes con fibrosis quística (FQ) (2). Dada la ubicuidad del patógeno, únicamente el contacto con el microorganismo no es suficiente para producir infección. Los datos clínicos indican que, para que ocurra una infección, es necesario que se presenten simultáneamente una disminución en las defensas del hospedador, alteraciones en las mucosas y cambios fisiológicos, así como modificaciones en la flora habitual asociadas al uso de antibióticos (2).

1.1.2 Patogenicidad y factores de virulencia

P. aeruginosa se caracteriza por poseer una amplia gama de factores de virulencia que son esenciales para su eficacia como agente infeccioso. Entre estos se encuentran elementos intracelulares y extracelulares que trabajan en conjunto para potenciar su

capacidad patogénica. La expresión y control de estos factores están regulados por sistemas de señalización altamente sofisticados e interrelacionados, lo que le permite a la bacteria ajustarse rápidamente a diferentes ambientes y superar las defensas del hospedador (3). A continuación, se describen los principales factores de virulencia que intervienen en la patogenicidad de *P. aeruginosa* (Figura 1):

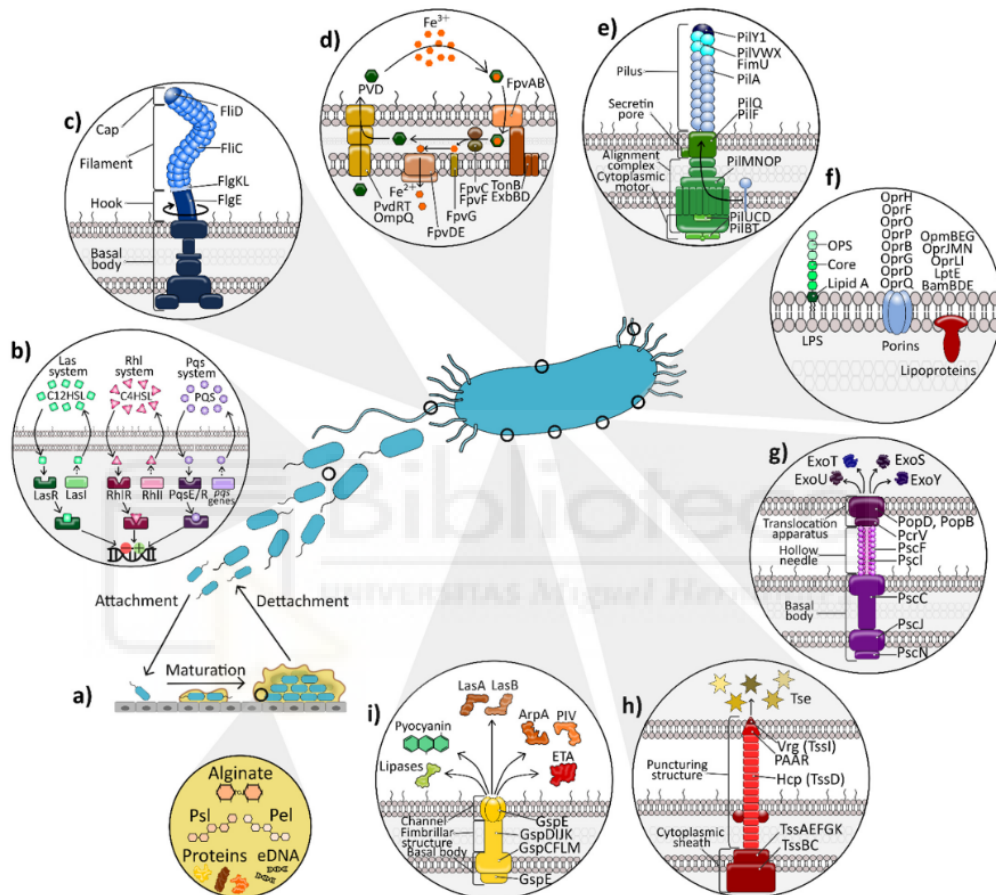


Figura 1. Principales factores de virulencia empleados en la infección por *P. aeruginosa* (3). a) Formación de biofilm y biopelículas, b) Quorum sensing, c) Flagelos, d) Sistemas de captación de hierro, e) Pili tipo IV, f) Membrana externa: lipopolisacárido y proteínas, g) Sistema de secreción tipo III (T3SS), h) Sistema de secreción tipo VI (T6SS), i) Sistema de secreción tipo II (T2SS).

a) Formación de Biofilm/Biopelículas

El biofilm es una comunidad bacteriana estructurada y embebida en una matriz autogenerada compuesta principalmente por sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Estas estructuras no solo permiten la adherencia de las bacterias a superficies biológicas o inertes, sino que también les brindan una protección significativa frente a

desinfectantes, antibióticos y respuestas inmunitarias del huésped. En el caso de *P. aeruginosa*, las biopelículas están constituidas mayoritariamente por tres exopolisacáridos principales: alginato, Psl y Pel, junto con ADN extracelular (eDNA) y proteínas. El alginato desempeña un papel crucial en la persistencia bacteriana, ya que protege a las células frente a la fagocitosis y neutraliza las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por las células inmunitarias. Su alta viscosidad contribuye a la retención de agua y nutrientes, estabilizando la biopelícula y favoreciendo su maduración y resistencia. Además, el alginato puede unirse a antibióticos aminoglucósidos, como la tobramicina, disminuyendo su penetración y aumentando la resistencia antimicrobiana. Estas propiedades hacen que las biopelículas de *P. aeruginosa* representen un desafío clínico significativo, especialmente en pacientes con FQ o dispositivos médicos implantados. Su alta resistencia dificulta la erradicación bacteriana, favoreciendo infecciones crónicas persistentes. Por ello, comprender los mecanismos que regulan su formación y persistencia es esencial para el desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas (4–6).

b) *Quorum sensing*

El quorum sensing (QS) es un mecanismo de comunicación celular en bacterias que coordina la expresión génica en función de la densidad celular (7). Este proceso se basa en la producción, liberación y detección de moléculas señalizadoras llamadas autoinductores. (8). Estas moléculas se sintetizan intracelularmente y son liberadas al medio, acumulándose a medida que aumenta el número de células. Cuando la concentración de autoinductores supera un umbral crítico, se unen a receptores específicos que activan cascadas de señalización, resultando en cambios coordinados en la expresión génica de toda la población. De este modo, el QS permite a las bacterias sincronizar su comportamiento y actuar como una comunidad organizada, lo que aumenta su capacidad de supervivencia (8). Entre las funciones reguladas por este mecanismo se encuentran la formación de biopelículas, la secreción de factores de virulencia, la producción de antibióticos, la bioluminiscencia y la captación de ADN. Este sistema les facilita alternar entre comportamientos individuales a baja densidad y sociales a alta densidad, maximizando su adaptabilidad y eficiencia. (8)

c) Flagelos

El flagelo es el principal orgánulo de motilidad que permite el movimiento y la quimiotaxis de la bacteria (9). Además de la movilidad, el flagelo puede tener otras funciones como por ejemplo, participar en la formación de biopelículas, la exportación de proteínas y la adhesión (9).

P. aeruginosa posee un único flagelo polar que está compuesto por: un filamento formado por flagelina polimerizada (FliC) dispuesta helicoidalmente, una proteína de tapa específica (FliD), el gancho en la base del filamento (FlgE), dos proteínas de unión entre el filamento y el gancho (FlgKL) y varios componentes del cuerpo basal localizados entre la membrana externa e interna (Figura 1C) (10). El flagelo genera movimientos rotatorios en forma de sacacorchos siendo el responsable de la motilidad de la bacteria en medios acuosos o de baja viscosidad (11). La quimiotaxis juega un papel fundamental en la adhesión inicial de *P. aeruginosa* al epitelio de las vías respiratorias en casos de fibrosis quística, al orientar el movimiento del flagelo hacia estas células. Por todo ello, el flagelo es considerado un factor clave de virulencia (12).

d) Sistemas de captación de hierro

El hierro es un elemento clave para el crecimiento bacteriano, sin embargo, en el ambiente, su disponibilidad es limitada. Por ello, para cubrir sus necesidades, *P. aeruginosa* emplea diversas estrategias. Entre ellas, la más destacada es la producción de sideróforos (13). El principal sideróforo es la Pioverdina (PVD). La PVD tiene naturaleza peptídica y su producción requiere un proceso en el que se gasta mucha energía. La PVD, que libera el hierro libre además de extraerlo de las proteínas del hospedador mediante un complejo sistema de bombas de eflujo y transportadores presentes en la membrana (figura 1D) (14,15). Además de su función principal, la PVD puede actuar como molécula señalizadora en la regulación de la expresión de ciertos factores de virulencia y de su propia síntesis (16). Participa en la producción de Exotoxina A (ETA); que inhibe la síntesis de proteínas en las células del hospedador y de Endoproteinasa PrpL; que degrada las proteínas del hospedador facilitando la invasión bacteriana. La PVD regula su propia producción para asegurar que los niveles de sideróforo sean adecuados para la captación del hierro (16).

e) Pili tipo IV

Los pili tipo IV son esenciales para diversas funciones biológicas que son clave para la patogenicidad bacteriana, tales como la motilidad, la adhesión a las células del hospedador y la captación de ADN (17). Estas estructuras filamentosas, largas y flexibles, se encuentran en la superficie celular de manera polar (18). Los pili están formados por miles de moléculas de pilina mayor (PilA), una proteína monomérica, y por pilinas menores (como FimU, PilV, PilW, PilX y PilY1) que se localizan en la punta del pili. A pesar de su variabilidad, los pili se agrupan en diferentes tipos según su estructura y el mecanismo mediante el cual se ensamblan (19). Además, los pili tipo IV, gracias a su capacidad para adherirse y moverse, juegan un papel fundamental en la formación de biopelículas (20).

f) Membrana externa: Lipopolisacárido y proteínas.

Lipopolisacárido. El Lipopolisacárido (LPS) constituye una barrera física que interviene en las interacciones con los receptores del huésped y causa daños tisulares debido a su actividad endotóxica. Se compone de tres dominios: el lípido A, la región central (core) y el antígeno O (21). El lípido A es la porción hidrofóbica del LPS que ancla esta molécula a la membrana externa (ME) de la bacteria gram negativa. Su estructura consiste en un disacárido de glucosamina acilado y fosforilado en las posiciones 1' y 4'. Forma una barrera que limita el paso de pequeños solutos hidrofóbicos. Sus síntesis y su estructura son generalmente conservadas pero el número de cadenas acilo, el grado de fosforilación y otras modificaciones pueden variar. Estas modificaciones tienen un impacto significativo en las interacciones de la bacteria con el entorno o el hospedador, afectando a su capacidad de adaptación y patogenicidad (22). El core es la región central del LPS que conecta el lípido A con el antígeno O. Está compuesto por dos secciones; el core interno, unido directamente al lípido A y está compuesto por azúcares cargados negativamente, como el ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulósico (Kdo) y el ácido L-glicero-D-mano-heptulónico (Hep). Son moléculas altamente conservadas y esenciales para la viabilidad celular. El core externo, es más variable y está compuesto por azúcares neutros (glucosa, galactosa, etc.) cuya composición puede variar entre especies o cepas bacterianas. El core participa en la estabilidad estructural de la membrana externa y en la interacción con el entorno (22). El antígeno O es una cadena polisacárida compuesta por unidades repetidas de azúcares, cuya composición y longitud pueden variar entre diferentes cepas. Este componente juega un papel crucial en la interacción de la bacteria

con el hospedador, contribuyendo a su capacidad de evasión del sistema inmunológico y favoreciendo su adaptación a diversas condiciones ambientales (22).

Porinas. *P. aeruginosa* expresa más de 20 porinas que desempeñan un papel fundamental en el transporte de diversas moléculas contribuyendo así a la virulencia. La porina OprF es la más abundante, siendo esencial para la integridad de la ME y la adhesión a células humanas. También participa en la formación de biofilms y modula la respuesta inmune del hospedador. Otras porinas como OprH y OprD, están implicadas en la resistencia a antibióticos, la captación de nutrientes y la adhesión celular. Todas ellas, descritas las más frecuentes en la tabla 1 (3), permiten que *P. aeruginosa* resista a las condiciones adversas y escape de la respuesta inmune del hospedador (23–25).

Lipoproteínas. Las podemos agrupar en distintas familias según su función (Tabla 1). Algunas participan en el mecanismo de ensamblaje para la síntesis de la ME como la BBamBDE o LptE. Otras intervienen en el mantenimiento de la integridad celular. Y Algunas de ellas también forman parte del flujo de moléculas nocivas, incluidos los antibióticos, confiriéndole resistencia a los mismos (26,27)

PORINAS	FUNCIÓN
ORF	Mantenimiento de la integridad celular Adquisición de iones y sacáridos Unión de peptidoglicano Canal de difusión Adhesión Regulación de otros factores de virulencia Sensor del sistema inmunológico
OPRH	Unión a proteínas Resistencia a aminoglucósidos Transporte de moléculas
OPRD	Unión a laminina Resistencia a carbapenems Transporte de moléculas
OPRG	Unión a laminina
OPRQ	Unión a fibronectina Adhesión

PORINAS	FUNCIÓN
OPRL	Mantenimiento de la integridad celular Protección frente al estrés oxidativo
OPRI	Mantenimiento de la integridad celular
BAMBDE	Biogénesis de la membrana externa
LPTE	Biogénesis de la membrana externa
OPRJMN	Resistencia antibiótica
OPMBEG	Resistencia antibiótica

Tabla 1. Resumen de las principales proteínas de la ME de *P. aeruginosa* y la función que desempeñan.(3)

Sistemas de secreción bacteriana g) h) i)

P. aeruginosa presenta cinco sistemas de secreción que liberan una amplia variedad de toxinas y enzimas para atacar al hospedador (Figura 2). Los sistemas de secreción tipo I (T1SS) y tipo 5 (T5SS) son los más simples (28). El T1SS presenta una proteína en la ME, un transportador ABC (ATP-binding cassette) insertado en la membrana interna (MI) que proporciona energía al proceso y una proteína adaptadora que conecta los dos componentes (29). Está involucrado en la secreción de la proteasa alcalina AprA, el hemóforo HasAp, la proteína AprX de función aún desconocida y TesG, la cual inhibe la infiltración de los neutrófilos en infecciones crónicas (28). El T5SS, permite la secreción a través de la envoltura bacteriana de grandes proteínas asociadas a la adhesión y la virulencia, en un proceso que se realiza en dos pasos. El T5SS secreta la esterasa EstA, la adhesina extracelular CdrA y la exoproteasa LepA (28). El sistema de secreción tipo II (T2SS), permite la liberación de una amplia variedad de exoproteínas. Es el sistema más versátil de *P. aeruginosa* (Figura 1I) .(28). El sistema de secreción tipo III (T3SS), se trata de un sistema en forma de jeringa que inyecta efectores tóxicos en el citosol de la célula huésped. Permite que *P. aeruginosa* pueda causar daños epiteliales, diseminarse en la circulación y contrarrestar la respuesta inmunitaria innata del huésped (Figura 1G) (30). El sistema de secreción tipo VI (T6SS), descubierto más recientemente, desempeña también un papel importante al generar toxinas bacterianas que destruyen la flora microbiana del hospedador (Figura 1H) (31). Los sistemas T2SS y T5SS utilizan un proceso de secreción en dos etapas, que implica un paso intermedio a través del periplasma, mientras que T3SS y T6SS realizan el proceso en un solo paso, inyectando las exoproteínas directamente en el citoplasma de la célula objetivo, lo que facilita su virulencia (32).

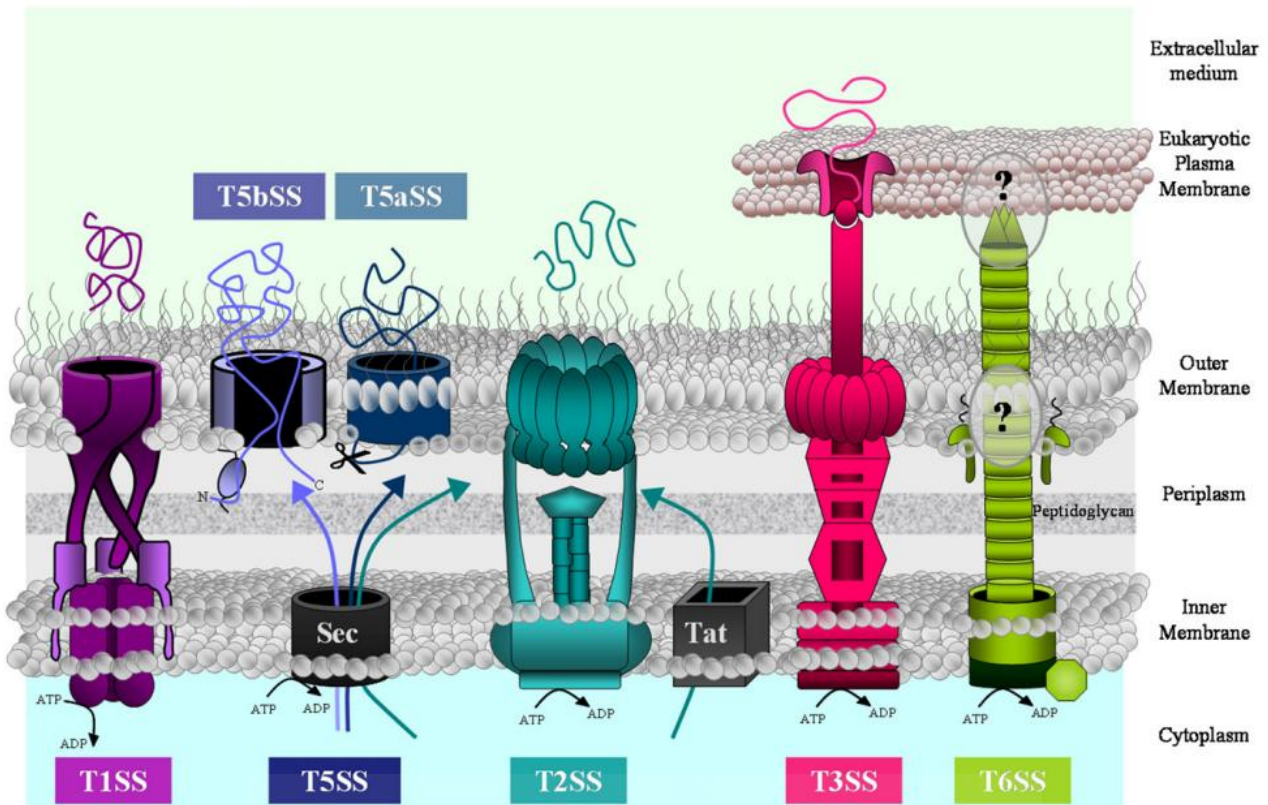


Figura 2. Sistemas de secreción bacterianos. (28).

1.1.3 Impacto clínico de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*

La resistencia antimicrobiana (RAM) se ha convertido en un problema de salud a nivel global exacerbado por el aumento de infecciones por bacterias multirresistentes y por la notable disminución del desarrollo de nuevos antibióticos (33). Debido a las limitaciones en los métodos de diagnóstico rápido para identificar patógenos y genes de resistencia antimicrobiana, en los entornos clínicos, se recurre a la administración empírica de antibióticos de amplio espectro (34). Esta práctica, puede contribuir al desarrollo de la RAM. En respuesta a esta problemática, la organización mundial de la salud (OMS), publicó una lista de patógenos que necesitan de manera urgente, el desarrollo de nuevos antibióticos (35). Dentro de esta lista, encontramos a un grupo de bacterias conocido como bacterias ESKAPE, que fueron clasificadas como de alta prioridad. Este grupo tiene como objetivo, enfocar la investigación y el desarrollo de nuevos agentes para combatir estas infecciones (36). Este grupo de patógenos ESKAPE, incluye a *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter* (37).

Dentro de las bacterias del grupo ESKAPE, *P. aeruginosa* es particularmente preocupante. Aunque en pocas ocasiones forma parte de la flora normal en humanos, la situación cambia de manera drástica en los ambientes hospitalarios, donde las tasas de colonización pueden superar el 50% en pacientes sometidos a procedimientos invasivos (38). Además, aquellos pacientes con sistemas inmunitarios debilitados o bajo tratamiento antibiótico, son especialmente susceptibles de ser colonizados por este patógeno (38). Por ello, es importante destacar la necesidad de medidas efectivas para controlar su propagación en dichos entornos (39).

P. aeruginosa es un patógeno muy común en infecciones nosocomiales, con una prevalencia del 7.1% al 7.3% en todas las infecciones asociadas a la atención sanitaria (40). Este patógeno, es el principal responsable de la neumonía nosocomial y su incidencia ha aumentado en las últimas décadas (41). En la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), *P. aeruginosa* es el responsable del 23% de las infecciones, siendo la vía respiratoria la entrada más común para el patógeno (42). Concretamente, la neumonía asociada a la ventilación mecánica representa el 22% de todas las infecciones en la atención sanitaria y está asociada con peores resultados en comparación con otros microorganismos (43,44).

En pacientes con FQ, *P. aeruginosa* es un patógeno que deteriora la función pulmonar (45). Esto se debe a su habilidad genética para formar biofilms y desarrollar un fenotipo mucoso que produce alginato (45). Estos cambios están asociados con una mayor mortalidad y un empeoramiento de la función pulmonar. Por esta razón, es crucial iniciar un tratamiento temprano en estos pacientes para ayudar a preservar su capacidad respiratoria (46,47).

Por otro lado, las infecciones del tracto urinario (ITU) son frecuentes sobre todo en pacientes que presentan catéter urinario produciendo una alta morbi-mortalidad (48). Asimismo, las infecciones quirúrgicas y las bacteriemias son complicaciones graves por este patógeno (40). Las bacteriemias por *P. aeruginosa* presenta elevadas tasas de mortalidad estimadas entre el 43.2% y 58.8% (49). Este tipo de bacteriemias son más propensas a ser adquiridas en el ambiente hospitalario que las causadas por otro tipo de bacterias (50,51). *P. aeruginosa* puede producir infecciones en pacientes con quemaduras, las cuales pueden complicarse y dar lugar a la sepsis o la muerte. La presencia de este microorganismo en quemaduras se asocia con un peor pronóstico de la enfermedad (52).

1.2 Mecanismos de resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa se caracteriza por su capacidad para desarrollar resistencia a múltiples antibióticos, lo que representa un desafío significativo para la elección de tratamientos efectivos (53). Este microorganismo presenta resistencia intrínseca, caracterizada por la baja permeabilidad de su membrana, la producción de enzimas que inactivan antibióticos y un sistema de bombas de eflujo que expulsan activamente los antibióticos, complicando su retención y penetración en la célula (54). La resistencia adquirida en *P. aeruginosa* puede lograrse a través de la transferencia horizontal de genes de resistencia y cambios mutacionales (55). Esto le permite al microorganismo evadir la acción de diferentes clases de antibióticos. Además, puede presentar una resistencia adaptativa cuando se ve expuesta a estímulos ambientales o antibióticos específicos (56) (Figura 3).

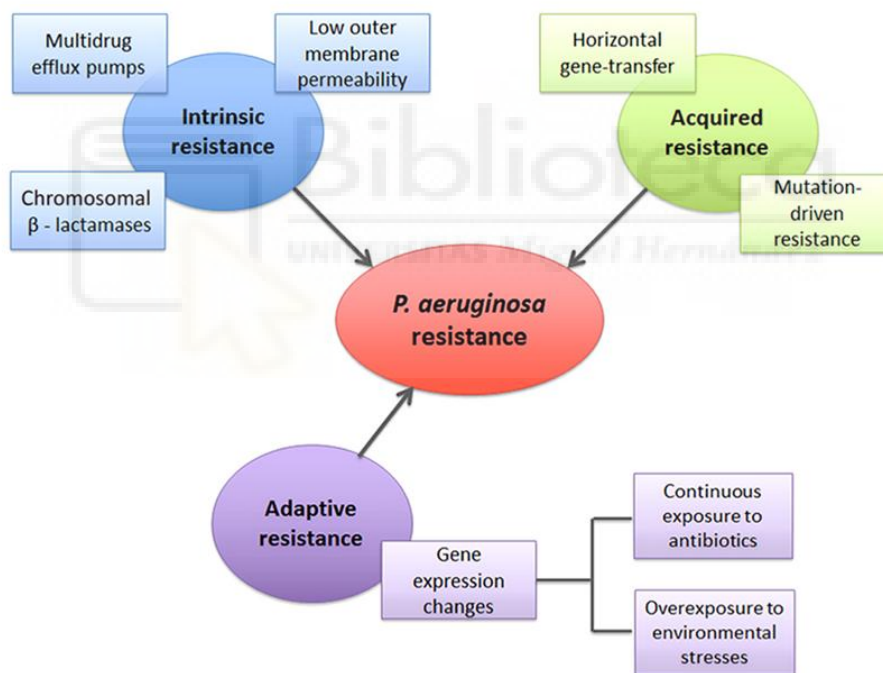


Figura 3. Mecanismos de resistencia de *P. aeruginosa* (57)

1.2.1 Resistencia intrínseca

Se ha demostrado que *P. aeruginosa* posee un alto nivel de resistencia intrínseca a la mayoría de los antibióticos. La resistencia intrínseca hace referencia a la capacidad innata para disminuir la eficacia del tratamiento antibiótico debido a sus características estructurales o funcionales (58).

a) *Baja permeabilidad de la membrana*

La ME de las bacterias gram-negativas actúa como una barrera selectiva, diseñada para impedir la penetración de antibióticos. Esta membrana está compuesta de fosfolípidos y LPS, con porinas que forman canales proteicos (59). *P. aeruginosa* utiliza principalmente la porina OprF, que muestra una eficiencia baja para la permeación de antibióticos (60). Este diseño restrictivo resulta en una permeabilidad disminuida en comparación con otro tipo de bacterias.

Además, la ME contiene porinas específicas que son críticas para la resistencia y captación de antibióticos. La porina OprD está involucrada en la absorción de carbapenems, y su ausencia aumenta la resistencia a estos antibióticos (60). La porina OprH, contribuye a la resistencia a antibióticos como la polimixina B y la gentamicina. La estructura predominante de los canales OprF cerrados y la presencia de porinas específicas con sitios de unión para ciertos antibióticos explican en parte por qué *P. aeruginosa* presenta una permeabilidad tan restringida y en consecuencia una resistencia elevada a numerosos antibióticos (61).

b) *Sistemas bombas de eflujo*

Las bombas de expulsión bacterianas son esenciales para eliminar compuestos tóxicos de la célula. En *P. aeruginosa*, las bombas de expulsión de la familia RND son cruciales para la resistencia a los antibióticos, y están compuestas por transportadores de membrana citoplasmática, proteínas enlazadoras periplásmicas y porinas en la membrana externa (62). Estas bombas se conocen como Mex, seguido de una letra, y las porinas asociadas como Opr. *P. aeruginosa* cuenta con doce bombas de expulsión RND, de las cuales cuatro (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, y MexXY-OprM) son significativas en la resistencia a los antibióticos, manejando el flujo de β -lactámicos, quinolonas y aminoglucósidos (63,64). La sobreexpresión de estas bombas ha ampliado la resistencia antibiótica y contribuido al desarrollo de resistencia a múltiples antibióticos.

c) *Enzimas inactivadoras de antibióticos*

Uno de los principales mecanismos de resistencia intrínseca en bacterias es la producción de enzimas que inactivan antibióticos al descomponer o modificar sus estructuras químicas. En *P. aeruginosa*, estas enzimas incluyen las β -lactamasas y las enzimas modificadoras de aminoglucósidos, que actúan sobre los enlaces amida y éster

susceptibles a la hidrólisis (65). Específicamente, la β -lactamasa de *P. aeruginosa* es capaz de romper el anillo β -lactámico de los antibióticos β -lactámicos, inactivándolos. Además, existen cuatro clases de β -lactamasas, basadas en sus secuencias de aminoácidos, donde las clases A, C y D utilizan un sitio activo de serina y la clase B requiere iones de zinc para su actividad. Algunas cepas de *P. aeruginosa* producen β -lactamasas de espectro extendido (ESBLs), que confieren resistencia a la mayoría de los antibióticos β -lactámicos (66).

En cuanto a los aminoglucósidos, *P. aeruginosa* desarrolla resistencia principalmente a través de la modificación enzimática de los grupos amino y glucósido en su estructura molecular (67). Se han identificado tres tipos de enzimas modificadoras de aminoglucósidos: fosfotransferasas, acetiltransferasas y nucleotidiltransferasas, que inactivan estos antibióticos al modificar grupos específicos, aumentando significativamente la resistencia a fármacos como gentamicina, tobramicina y amikacina (68–70).

1.2.2 Resistencia adquirida

Las bacterias pueden adquirir resistencia a los antibióticos tanto mediante cambios mutacionales como a través de la adquisición de genes de resistencia por transferencia horizontal de genes (71).

a) Resistencia por mutaciones

Las bacterias pueden aumentar su resistencia a los antibióticos mediante cambios mutacionales que afectan diversos aspectos del metabolismo y la estructura celular (71). Estos cambios pueden llevar a una menor absorción del antibiótico, modificaciones en los blancos del antibiótico y la sobreexpresión de bombas de expulsión y enzimas que inactivan antibióticos (71,72). Además, las alteraciones mutacionales en sitios diana específicos contribuyen significativamente a la resistencia. Por ejemplo, las mutaciones en los genes que codifican las girasas o las topoisomerasas alteran la afinidad de unión de estos antibióticos, disminuyendo la susceptibilidad a las quinolonas (73). Las mutaciones ribosomales pueden conferir resistencia a los aminoglucósidos, que actúan inhibiendo la síntesis proteica (74). Igualmente, las mutaciones pueden inducir la sobreproducción de enzimas como las β -lactamasas, intensificando la resistencia a los antibióticos β -lactámicos, especialmente a las cefalosporinas (75).

b) Adquisición de genes de resistencia

Los genes que confieren resistencia a los antibióticos en *P. aeruginosa* se encuentran a menudo en estructuras genéticas como plásmidos e integrones, que facilitan la transferencia horizontal de estos genes entre bacterias (55). Este proceso incluye mecanismos como la transformación, la transducción y la conjugación, permitiendo la diseminación rápida de la resistencia (76). Estos elementos pueden albergar múltiples genes de resistencia, incluidos los que codifican para metalo- β -lactamasas, enzimas que hidrolizan los antibióticos β -lactámicos y aumentan significativamente la resistencia bacteriana. Así, los integrones y plásmidos en *P. aeruginosa* juegan un papel crucial en el desarrollo de cepas resistentes a múltiples fármacos (77–79).

1.2.3 Resistencia adaptativa

En *P. aeruginosa*, la resistencia adaptativa aumenta la supervivencia bacteriana frente a los antibióticos mediante cambios transitorios en la expresión génica o proteica en respuesta a estímulos ambientales (80). Esta resistencia es reversible y se manifiesta claramente en la formación de biofilms y en la generación de células persistentes, que complican el tratamiento en pacientes con FQ (81–83). Los biofilms son estructuras complejas donde las bacterias están menos expuestas tanto a los agentes antimicrobianos como a la respuesta inmune del huésped, lo cual se debe a una barrera física creada por una matriz extracelular que incluye ADN, proteínas y polisacáridos (84). Además, las células persistentes dentro de los biofilms muestran una alta tolerancia a los antibióticos debido a su estado metabólicamente inactivo (85,86). Estas células pueden repoblar los biofilms una vez que se retira el tratamiento antibiótico, perpetuando así las infecciones crónicas (87).

1.3 Métodos de diagnóstico en infecciones por *Pseudomonas. aeruginosa*

Para el diagnóstico de laboratorio de infecciones causadas por *P. aeruginosa* es fundamental obtener una muestra adecuada y enviarla rápidamente al laboratorio en un medio de transporte apropiado. Además, debe procesarse de manera que se optimice la identificación del patógeno en cuestión (1).

1.3.1 Detección e identificación de bacterias

La detección de *P. aeruginosa* en muestras clínicas se lleva a cabo fundamentalmente mediante estos procedimientos: microscopía, cultivo o detección de ácidos nucleicos (1).

1) *Microscopía*: La microscopía sirve como una herramienta esencial para la detección inicial y la identificación preliminar de *P. aeruginosa* aprovechando las características morfológicas del patógeno (1). La tinción de gram, el método más utilizado para este fin, es crucial para la clasificación fenotípica de las bacterias, permitiendo distinguir entre bacterias gram-positivas y gram-negativas, lo cual es vital para guiar el tratamiento antibiótico inicial (1). Para realizar la tinción de gram (Figura 4), se aplica cristal violeta como colorante primario que penetra en todas las células. Posteriormente, se añade una solución de yodo que actúa como mordiente y forma un complejo con el cristal violeta dentro de la célula. El paso de decoloración sigue, utilizando alcohol o acetona-alcohol para remover el colorante de las células gram-negativas, mientras que las gram-positivas retienen el colorante yodo-cristal violeta y permanecen de color púrpura. Finalmente, se aplica safranina, la cual tiñe las bacterias gram-negativas de color rojo, proporcionando un contraste evidente con las bacterias gram-positivas que se mantienen púrpuras (1). Este proceso es esencial para distinguir entre diferentes tipos de bacterias y facilitar el diagnóstico adecuado de infecciones como las causadas por *P. aeruginosa*.

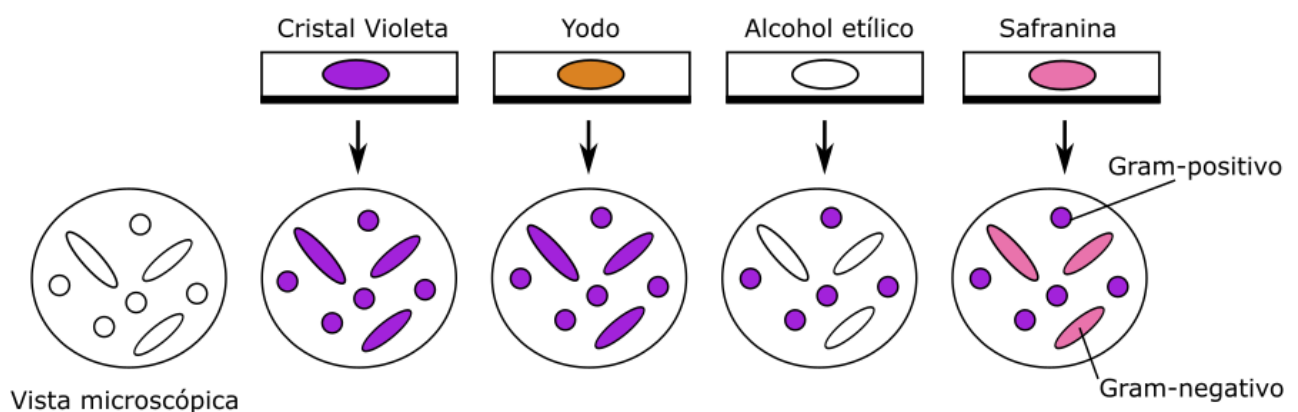


Figura 4. Procedimiento para la realización de la tinción de gram. Elaboración propia

- 2) *Cultivo bacteriológico*: el cultivo bacteriológico juega un papel esencial en la identificación de *P. aeruginosa*. Este método tradicional se basa en el aislamiento del microorganismo en medios de cultivo específicos (1). Sin embargo, una limitación de este método es que se necesita un período de crecimiento de 24 horas para lograr una identificación definitiva del patógeno (1). En estos casos, tras el periodo de cultivo, la espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz tiempo de vuelo (MALDI-TOF) puede utilizarse para la identificación del microorganismo (88). Además en situaciones de urgencia, MALDI-TOF, permite realizar el análisis directamente del hemocultivo positivo acelerando significativamente el proceso de identificación (88).
- 3) *Detección de ácidos nucleicos*: Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos se utilizan ampliamente en los laboratorios de microbiología clínica para la detección de patógenos en las muestras clínicas (1). Estas técnicas han demostrado ser cruciales para acelerar el diagnóstico y mejorar la administración de tratamientos adecuados, especialmente en casos de infecciones con altas tasas de morbilidad y mortalidad, como en el caso de bacteriemias por *P. aeruginosa* (89). En este contexto, el sistema BioFire FilmArray Blood Culture ID Panel 2 (BCID2) se presenta como una herramienta avanzada para el diagnóstico rápido de bacteriemias en la práctica clínica habitual (89). BCID2 permite una identificación rápida y eficiente de patógenos directamente de cultivos de sangre positivos, además de detectar mecanismos de resistencia a antibióticos, ofreciendo resultados rápidos que son esenciales para el manejo oportuno de pacientes críticos (89). Este sistema realiza pruebas automatizadas que pueden identificar una amplia gama de bacterias, levaduras y resistencias a antibióticos directamente desde los hemocultivos positivos, facilitando decisiones clínicas rápidas y precisas (89).

1.3.2 Pruebas de susceptibilidad antibiótica

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana son esenciales en la microbiología clínica y tienen múltiples aplicaciones que van desde el descubrimiento de fármacos hasta la epidemiología y la predicción de resultados terapéuticos (90). Estos análisis permiten determinar la eficacia de los antimicrobianos contra diferentes patógenos, lo cual es

fundamental para guiar el tratamiento adecuado de las infecciones (90). La continua emergencia de resistencias a los antibióticos hace que la adaptación y mejora de estas pruebas sean una prioridad para asegurar tratamientos efectivos y evitar la propagación de resistencias (91).

En el laboratorio de microbiología, existen diferentes métodos para realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (1). Desde métodos tradicionales como las pruebas de difusión en caldo y pruebas de difusión en agar, hasta técnicas más avanzadas como las pruebas automatizadas (1).

- 1) *Pruebas de difusión en caldo*: Este método consiste en preparar diluciones sucesivas de un antibiótico en un medio de cultivo líquido. Se inocula una concentración estandarizada de la bacteria que se está examinando en este medio. Tras 24 horas de incubación, se determina la menor concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano, conocida como Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (1).
- 2) *Pruebas de difusión en agar*: Este procedimiento comienza distribuyendo una cantidad estandarizada de la bacteria a estudio sobre la superficie de un medio sólido con agar (1). Luego, se colocan sobre el agar discos o tiras impregnados con antibiótico. Después de 24 horas de incubación, se mide la zona donde el crecimiento bacteriano ha sido inhibido alrededor de los discos o tiras. El tamaño de esta zona de inhibición indica la efectividad del antibiótico; a mayor sensibilidad del microorganismo al antibiótico, más amplia será esta zona (1).
- 3) *Métodos automatizados*: Este método utiliza sistemas automatizados para realizar las pruebas de susceptibilidad antibiótica de manera rápida y eficiente (92). Los sistemas automatizados evalúan simultáneamente múltiples antibióticos frente al patógeno utilizando paneles estandarizados que contiene antibióticos a diferentes concentraciones (93). Tras la inoculación del patógeno y 24 horas de incubación, el sistema automático determina la CMI mediante la detección del crecimiento bacteriano. Esta tecnología ofrece resultados precisos y fiables, facilitando el proceso diagnóstico (94).

Una vez obtenidos los resultados de CMI de las pruebas de susceptibilidad antibiótica, es fundamental realizar la interpretación de estos resultados. Para ello, se utilizan criterios

estandarizados para garantizar la precisión y la consistencia en el diagnóstico (1). Los criterios proporcionados por el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) y el Comité de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI) de Estados Unidos son ampliamente utilizados a nivel global (95). Ambos Comités ofrecen guías detalladas sobre como clasificar los puntos de CMI, diferenciando entre las categorías de “sensible”, “sensible aumento de dosis” y “resistente” (CLSI ofrece la categoría de “Intermedio” en vez de “sensible aumento de dosis”). Estas clasificaciones permiten seleccionar la mejor opción terapéutica basada en la eficacia potencial del antibiótico frente al patógeno en cuestión (96). La elección del antibiótico puede variar significativamente en función de la epidemiología local, las normativas de salud pública, la disponibilidad de medicamentos y las condiciones específicas del paciente, todos estos factores influyen en la decisión final para asegurar la máxima eficacia del tratamiento (97).

P. aeruginosa muestra resistencia intrínseca a varios antibióticos, principalmente debido a la impermeabilidad de su membrana, que bloquea el paso de estos medicamentos, y a genes que codifican bombas de expulsión de fármacos y enzimas que inactivan los antibióticos (72). Además, esta bacteria no solo presenta resistencias naturales o intrínsecas, sino que también puede desarrollar resistencias adicionales mediante la adquisición de nuevos genes (98). Esta habilidad, junto con su propensión a formar biofilms en situaciones clínicas críticas, como en pacientes con FQ o en dispositivos médicos implantados, complica significativamente el tratamiento de las infecciones que provoca (99).

La necesidad de una rápida administración de tratamientos antibióticos adecuados es crucial, ya que cualquier retraso puede derivar en resultados clínicos desfavorables. Esto subraya la importancia de contar con diagnósticos que ofrezcan resultados rápidos y fiables para la susceptibilidad antibiótica (100). Entre las nuevas herramientas desarrolladas para satisfacer esta demanda, destaca el sistema QuickMIC, una solución innovadora y prometedora (101). Este sistema de diagnóstico rápido, proporciona información fenotípica sobre la actividad de 12 antibióticos contra patógenos clave como *P. aeruginosa*, entre otros, en un tiempo de entre 2 y 4 horas (102).

Con los avances proporcionados por sistemas como el QuickMIC, los resultados demuestran que la integración de estas técnicas en equipos multidisciplinares facilita significativamente la identificación rápida de microorganismos y su susceptibilidad

antibiótica (103,104). Esta capacidad de reacción inmediata es esencial para proporcionar tratamientos tempranos y efectivos, lo que, a su vez, puede mejorar la supervivencia del paciente, acortar las estancias hospitalarias y reducir los costos asociados a la atención médica (105). Además, esta pronta identificación ayuda a disminuir el uso de medicamentos de amplio espectro, lo que es crucial para minimizar el desarrollo de resistencia a los antibióticos, beneficiando así la salud del paciente a largo plazo (106).

1.4 Opciones terapéuticas en el manejo de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*

La mayor parte de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* resultan especialmente complicadas de tratar con los tratamientos antibióticos habituales, ya que este microorganismo tiene una elevada resistencia natural a numerosos antibióticos, como los aminoglucósidos, las fluoroquinolonas y los β -lactámicos (55). Esto conlleva a tasas altas de morbilidad y mortalidad (107).

Los antibióticos utilizados en el tratamiento de *P. aeruginosa* incluyen: piperacilina-tazobactam (penicilinas con inhibidor de β -lactamasa); cefepima, ceftazidima, ceftolozano-tazobactam y ceftazidima-avibactam (cefalosporinas de amplio espectro con o sin un inhibidor de β -lactamasa); levofloxacino y ciprofloxacino (fluorquinolonas); imipenem, meropenem y doripenem (carbapenems); aztreonam (monobactam); tobramicina, gentamicina y amikacina (aminoglucósidos); fosfomicina; colistina (poliximinas) (108).

A pesar de la variedad de antibióticos disponibles para tratar infecciones por *P. aeruginosa*, la capacidad de esta bacteria para adquirir múltiples mecanismos de resistencia la convierte en un desafío significativo en el ámbito clínico (109). Se utilizan diversas definiciones consensuadas para los perfiles de resistencia, que se pueden clasificar en tres categorías (110):

- Multirresistencia (MDR): Hace referencia a las bacterias que son resistentes a al menos un agente de tres o más familias de antibióticos.
- Resistencia extendida (XDR): Se refiere a las bacterias que son resistentes a al menos un antibiótico de todas las familias excepto una o dos.

- Panresistencia (PDR): Hace referencia a las bacterias que presentan resistencia a todos los antibióticos de todas las familias utilizadas en su tratamiento.

La prevalencia de infecciones por *P. aeruginosa* MDR ha aumentado en los últimos años, encontrando unos datos en torno al 15 y 30% en múltiples áreas (111–113). Además, una parte de estas cepas, cumple también con los criterios para clasificarse como XDR, lo que limita de forma severa las opciones de tratamiento efectivo (114). De hecho, los perfiles sensibles solo a colistina o incluso la resistencia a todos los antibióticos ya se ha documentado en muchos hospitales de todo el mundo (115,116).

Estas cepas limitan de forma severa las opciones de tratamiento efectivo y subraya la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que puedan superar estas barreras (117). Por lo que la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos, se vuelven fundamentales para ofrecer situaciones efectivas contra estas situaciones tan graves (109).

Durante los últimos años, se han realizado muchos esfuerzos para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos y algunos de ellos ya tienen la aprobación para el uso clínico (118). Se han aprobado diferentes combinaciones de β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas como imipenem/relebactam, meropenem/varbobactam, ceftazidima/avibactam y ceftolozano/tazobactam (119,120). Nuevas fluorquinolonas con características mejoradas como el delafloxacino (121). Cefiderocol, una cefalosporina aprobada para las infecciones por bacterias gram negativas resistentes a carbapenems (122).

1.4.1 Nuevos agentes frente a *Pseudomonas aeruginosa*

a) Imipenem-relebactam

Relebactam es un inhibidor de las β -lactamasas de clase A y clase C, y en combinación con imipenem, puede restaurar la actividad del mismo en cepas resistentes (123). Estudios han demostrado una reducción de 8 veces la CMI del imipenem cuando se le añade relebactam (124). Sin embargo, la combinación no ofrece mejoras en la actividad contra aislados productores de metalo- β -lactamasas (MBL) tipo B (IMP, VIM, NDM) (124). Los datos del programa de vigilancia indican que el 67% de *Pseudomonas* eran sensibles a imipenem, que aumento al 90% con la adición del relebactam . Esta adición produjo una disminución en los valores de la CMI90, con un cambio de 8 veces en aislados no sensibles a imipenem. Relebactam es un potente inhibidor de β -lactamasas de tipo AmpC,

y restauró la sensibilidad al imipenem en casi el 90% de los aislados de *Pseudomonas* (125).

b) *Meropenem-varbobactam*

Varbobactam es un inhibidor potente de las serin- β -lactamasas de clase A (incluyendo a las CTX-M, SHV, TEM y carbapenemasas KPC, GES, BKC-1, SME y FRI-1) y clase C (P99, MIR, FOX, AmpC). No es activo frente a las β -lactamasas de clase B (metalo- β -lactamasas) ni las de clase D (126). Un estudio analizó 467 muestras de *P. aeruginosa* de las cuales el 79% eran sensibles a meropenem. La resistencia a meropenem mostró una leve mejora cuando se añadió varbobactam. Entre el 6-9% de las cepas experimento una reducción de cuatro veces o más el valor de CMI del meropenem. La falta de respuesta en *Pseudomonas*, se asoció con otros mecanismos de resistencia que no involucran β -lactamasas (127).

c) *Delafloxacino*

Es un antibiótico de la familia de las fluorquinolonas pero que presenta características fisicoquímicas diferenciales del resto de los antibióticos de la misma familia (121). A diferencia de las otras fluorquinolonas, que bloquean preferentemente la actividad de la topoisomerasa II (ADN-girada) de microorganismos gram-negativos o topoisomerasa IV de los gram-positivos, delafloxacino tiene la misma actividad frente ambas topoisomerasas (126). Estudios muestran una elevada actividad intrínseca del antibiótico con una CMI₅₀ inferior al resto de fluorquinolonas, posicionando al fármaco como una buena alternativa en el caso de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems sin producción de carbapenemasas (128).

d) *Cefiderocol*

Cefiderocol es una cefalosporina que actúa como un sideróforo, formando complejos con el hierro extracelular. El complejo se une a receptores presentes en bacterias gram-negativas, facilitando su entrada al espacio periplásmico, sin necesidad de entrar a través de las porinas. Presenta una actividad bactericida tiempo-dependiente (126,129). Además presenta una elevada estabilidad frente a β -lactamasas, incluidas las serin- β -lactamasas y las MBL (130). Este antibiótico surge como una opción terapéutica prometedora ante el desafío que presentan las cepas de *P. aeruginosa* carbapenem resistentes y productoras de MBL, especialmente las tipo VIM (131). Estas infecciones, constituyen una gran

preocupación en la salud pública debido a las escasas alternativas de tratamiento. Dado que cefiderocol se está posicionando como una opción terapéutica muy valiosa, es fundamental obtener información precisa sobre los métodos microbiológicos más efectivos para estudiar su perfil de susceptibilidad. Este enfoque puede ayudar a maximizar su eficacia clínica y minimizar la aparición de resistencias que ya se están reportando a pesar del uso limitado del antibiótico (132–134).

e) *Aztreonam-avibactam*

El aztreonam es un antibiótico perteneciente al grupo de los β -lactámicos que presenta actividad frente a las MBL. No obstante, cuando se utiliza en monoterapia, no resulta eficaz contra la mayoría de las bacterias productoras de ESBL y AmpC, enzimas comúnmente asociadas a bacilos Gram negativos con resistencia a carbapenémicos (135). En este escenario, la combinación con avibactam mejora la estabilidad del aztreonam frente a un amplio espectro de patógenos Gram negativos MDR, incluyendo aquellos que simultáneamente expresan β -lactamasas de clase A, C y D (136,137).

Diversos estudios *in vitro* han evidenciado que la combinación de aztreonam con avibactam (ATM-AVI), permite una reducción significativa en los valores de CMI, logrando una actividad antimicrobiana elevada frente a cerca del 80% de aislados productores de MBL, principalmente aquellos que expresan enzimas del tipo NDM (138–140). Esta combinación también ha demostrado eficacia frente a bacterias que presentan múltiples determinantes de resistencia adquirida, como la coexpresión de KPC y ESBL (141,142). No obstante, su efectividad frente a *P. aeruginosa* es limitada, lo que se atribuye a mecanismos de resistencia alternativos como la impermeabilidad por pérdida de porinas, la sobreexpresión de bombas de eflujo o la presencia de variantes enzimáticas específicas, como OXA y PDC (143–145)

1.5 Epidemiología y Evolución de la Resistencia en *Pseudomonas aeruginosa*

La RAM es ampliamente reconocida como una amenaza para la salud global, siendo una importante causa de morbilidad y mortalidad (38). El uso excesivo de antibióticos y la administración inapropiada ha llevado a una disminución de su eficacia y a la adaptación de los patógenos bacterianos al tratamiento (146). El resultado ha sido un aumento de las

muerres causadas por bacterias multirresistentes además de prolongar las estancias hospitalarias y la elevación de los costes sanitarios (147). Aproximadamente, la resistencia antimicrobiana puede causar alrededor de 1.27 millones de muertes anuales a nivel mundial (148).

Comprender los mecanismos de resistencia de estas bacterias es crucial para desarrollar nuevos agentes antimicrobianos u otras herramientas alternativas para combatir estos desafíos de la salud pública (35). Entre los patógenos antibióticos-resistentes prioritarios, la OMS ha catalogado a *P. aeruginosa* como un patógeno de atención urgente por su alta prevalencia y potencial de resistencia, siendo un agente potencialmente significativo (35). El estudio detallado de la epidemiología de *P. aeruginosa* es fundamental para el control y el manejo eficaz de este patógeno (149). La vigilancia epidemiológica permite identificar las tendencias de resistencia y diseñar protocolos de tratamiento adaptados, que puedan reducir significativamente las tasas de morbimortalidad asociadas a este microorganismo (149). Los estudios locales sobre la incidencia de infecciones por *P. aeruginosa* y su patrón de resistencia a antibióticos proporcionan una base sólida para las políticas de prevención y tratamiento (150). Además, la identificación de los factores de riesgo asociados con las infecciones graves y la resistencia permite a los equipos médicos anticipar complicaciones y ajustar los protocolos de manejo en poblaciones de alto riesgo (151).

Por otro lado, la RAM no solo se limita a los humanos o los entornos clínicos (152). *P. aeruginosa* es una bacteria que se encuentra en diferentes ambientes. Participa en la descomposición de materia orgánica y la desintegración de compuestos orgánicos complejos, en suelo y agua (153). Puede actuar como una bacteria promotora del crecimiento vegetal produciendo sustancias que inhiben patógenos en plantas (154). Participa activamente en la fijación del nitrógeno en ciertos ecosistemas, y a pesar de todo ello, existe una falta de conocimiento sobre la influencia de los aislados ambientales y su papel como reservorios de resistencia a los antibióticos (155).

La RAM es un problema que implica interacciones entre diversas poblaciones bacterianas que influyen en los humanos, animales, y el medio ambiente (152). Aunque algunas clases de antimicrobianos se reservan al uso humano, la mayoría también se emplean en la ganadería y agricultura (156). El resultado de estas interacciones es la persistencia de residuos de antibióticos en el ambiente lo que conlleva a la aparición continua de nuevos mecanismos de resistencia (156). Por lo tanto, es importante considerar el riesgo de la

RAM y sus mecanismos de transmisión de manera global en la interfaz animal-humano-ambiente para retrasar la aparición de nuevas resistencias y preservar la eficacia de los antibióticos (157). Este enfoque es conocido como “One Health”. El enfoque incluye la coordinación entre los sectores de salud pública, veterinaria y ambiental para implementar políticas que controlen y prevengan la diseminación de resistencias (158). La educación sobre el uso prudente de antimicrobianos, junto con una vigilancia mejorada y colaborativa de la resistencia, puede ayudar a limitar la aparición de cepas resistentes (157). Además, fomentar la investigación interdisciplinaria para desarrollar nuevas terapias y mejorar los métodos de diagnóstico puede acelerar la respuesta ante la amenaza de resistencia antimicrobiana (157).





2. OBJETIVOS

Objetivo principal

Contribuir a la mejora del manejo clínico y microbiológico de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* mediante la optimización del diagnóstico con herramientas microbiológicas avanzadas, la exploración de nuevas estrategias terapéuticas y el análisis genético de las cepas.

Objetivos específicos

1) Mejora del Diagnóstico Rápido de Infecciones.

-Evaluar la utilidad e implementar técnicas avanzadas de diagnóstico rápido para optimizar el manejo clínico de infecciones graves, mejorando la identificación precoz de los patógenos y sus mecanismos de resistencia, con el fin de facilitar decisiones terapéuticas más rápidas, eficaces y personalizadas.

2) Innovación en Técnicas de Sensibilidad Antimicrobiana.

-Evaluar la utilidad de técnicas innovadoras para la realización de antibiogramas rápidos, que permitan determinar la sensibilidad antimicrobiana en pocas horas, con el fin de optimizar el tratamiento de infecciones causadas por patógenos multirresistentes, en especial *Pseudomonas aeruginosa*.

3) Desarrollo de Nuevas Opciones Terapéuticas

- Evaluar y validar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de infecciones por cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa*, integrando métodos de diagnóstico avanzados para mejorar la selección y efectividad de los tratamientos.

4) Vigilancia genómica de *Pseudomonas aeruginosa* desde una perspectiva “One Health”.

- Analizar comparativamente cepas de *P. aeruginosa* procedentes de diferentes entornos ecológicos para estudiar su diversidad genética, la presencia de elementos móviles y su potencial implicación en la diseminación de resistencia antimicrobiana, bajo un enfoque integrado “One Health”



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Diseño del estudio

El estudio integró datos microbiológicos, clínicos y genómicos con el fin de optimizar el diagnóstico, tratamiento y vigilancia de infecciones graves causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Para ello, se analizaron cepas de distintas procedencias, incluyendo aislados clínicos obtenidos de diversas muestras y secuencias genómicas extraídas de bases de datos especializadas. La combinación de estos enfoques, junto con el análisis de datos experimentales y de fuentes de información complementarias, permitió obtener una visión más amplia y detallada sobre la dinámica de este patógeno y su impacto en el ámbito clínico.

Es estudio se estructuró en torno a cuatro ejes fundamentales:

- 1) Optimización del diagnóstico rápido de infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*.
- 2) Desarrollo e innovación en métodos de evaluación de susceptibilidad antibiótica
- 3) Exploración de nuevas estrategias terapéuticas.
- 4) Análisis genómico comparativo de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en distintos entornos

3.1.1 Optimización del diagnóstico rápido de infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*.

Se realizó un análisis retrospectivo en el Hospital General Universitario Dr. Balmis (Alicante), dónde se trabajó con muestras clínicas de hemocultivos positivos obtenidos durante un periodo de 5 meses. El objetivo consistía en evaluar la utilidad del nuevo sistema **BioFire FilmArray Blood Culture ID Panel 2 (BCID2)** para el diagnóstico rápido de bacteriemia en la práctica clínica, entre las que se incluyen la bacteriemia por *P. aeruginosa*, utilizando el cultivo bacteriológico como técnica de referencia.

El sistema evaluado permite identificar en menos de una hora la presencia del material genético de diversas bacterias y levaduras, lo que resulta crucial para el diagnóstico rápido y preciso de infecciones graves, como en el caso de infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Dentro de las bacterias gram-negativas, el sistema reconoce patógenos clínicamente relevantes como *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex, *Bacteroides fragilis*, *Enterobacter cloacae* complex, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* group, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*,

Stenotrophomonas maltophilia y *Pseudomonas aeruginosa*). Entre las bacterias gram-positivas detectadas se incluyen *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*. Respecto a las levaduras se incluyen *Candida albicans*, *Candida auris*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans/gattii*.

Además de identificar la presencia de *P. aeruginosa*, el sistema es capaz de detectar los principales genes de resistencia antimicrobiana. Entre los genes de resistencia en bacterias gram-negativas, destacan *CTX-M*, *IMP*, *KPC*, *NDM*, *OXA-48-like*, *VIM* y *MRC-1*. En cuanto a las gram-positivas, el sistema detecta genes como *MEC A/C SA*, *MEC A/C SCN* y *VanA/B*.

Para el diagnóstico de las bacteriemias, se empleó el sistema BD BACTEC, diseñado para identificar de manera rápida la presencia de bacterias y hongos en muestras de sangre. Este sistema se basa en la detección de cambios en la concentración de dióxido de carbono (CO₂), producido por el metabolismo microbiano. El sistema cuenta con sensores que detectan el aumento de CO₂ en la muestra y emiten una señal de alerta sonora y visual cuando el crecimiento microbiano alcanza unos niveles significativos, indicando que el hemocultivo es positivo. Cuando el hemocultivo es positivo, se procede a la activación del protocolo de trabajo establecido en el laboratorio.

La investigación sobre la sensibilidad antibiótica se llevó a cabo con el sistema Beckman Coulter MicroScan WalkAway 96 plus, confirmando los principales mecanismos de resistencia mediante métodos genotípicos (GeneXpert®, Cepheid).

3.1.2 Desarrollo e innovación en métodos de evaluación de susceptibilidad antibiótica

Se llevó a cabo un estudio observacional en el Hospital General Universitario Dr. Balmis (Alicante) para evaluar el rendimiento del sistema **QuickMIC** (Gradientech AB, Uppsala, Suecia) (102). Este innovador método de antibiograma ultrarrápido permite su aplicación directa a partir de hemocultivos positivos. Su tecnología combina microfluídica, microscopía en tiempo real y análisis del crecimiento bacteriano mediante dispersión de luz, proporcionando resultados de susceptibilidad bacteriana en un periodo de entre 2 y 4 horas.

El nuevo sistema genera un gradiente uniforme de antibiótico dentro de un gel tridimensional de agarosa, abarcando un rango de concentraciones que aumentan de manera progresiva. Mediante la captura de imágenes en tiempo real, supervisa el crecimiento bacteriano y cuantifica las colonias individuales, lo que permite una identificación rápida de la CMI

Se llevó a cabo la evaluación utilizando 86 muestras de hemocultivos positivos con bacteriemia por BGN, recolectadas durante un período de cinco meses. Se incluyeron únicamente los casos de bacteriemia monomicrobiana, mientras que se excluyeron aquellos provocados por otros patógenos distintos a los BGN, así como las bacteriemias de origen polimicrobiano.

En este estudio, los antibióticos evaluados mediante el cassette QuickMIC GN (cat. no: 43-001-10) incluyeron: amikacina, cefepima, ciprofloxacino, colistina, cefotaxima, ceftazidima/avibactam, ceftazidima, gentamicina, meropenem, piperacilina/tazobactam, tigeciclina y tobramicina.

El sistema QuickMIC está validado para *P. aeruginosa*, así como para otros BGN de relevancia clínica, incluyendo *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* y especies de *Klebsiella* (*K. pneumoniae*, *K. variicola*, *K. oxytoca* y *K. aerogenes*). También se encuentra validado para *Proteus spp.* (*P. mirabilis* y *P. vulgaris*), *Citrobacter spp.* (*C. koserii* y *C. freundii*), y *Serratia marcescens*.

a) *Protocolo de trabajo*

El sistema **QuickMIC** se integró en el protocolo de diagnóstico microbiológico para la detección de bacteriemia por BGN.

El procedimiento de trabajo incluyó los siguientes pasos:

- a) **Identificación del microorganismo** mediante MALDI-TOF, a partir de un hemocultivo positivo. Para ello, se realizaron una serie de centrifugaciones que permitieron obtener la identificación en aproximadamente 30 minutos.
- b) **Detección rápida de mecanismos de resistencia**, empleando PCR en tiempo real (GeneXpert, Cepheid) e inmunocromatografía (Biotech), con especial enfoque en ESBL y carbapenemasas.

- c) **Siembra en medios de cultivo** y realización del **antibiograma** utilizando el sistema MicroScan WalkAway plus (Beckman Coulter).
- d) **Confirmación de resultados borderline o anómalos** de susceptibilidad antibiótica mediante E-test (BioMerieux) o microdilución (Bruker), especialmente en el caso de colistina.
- e) **Obtención del perfil de susceptibilidad antibiótica** en un plazo de 24 horas tras la detección de un hemocultivo positivo.

El nuevo sistema fue incorporado al protocolo de trabajo de susceptibilidad antibiótica para su evaluación. QuickMIC permitió obtener los resultados del antibiograma en 2 a 4 horas, en contraste con las 24 horas necesarias con el sistema MicroScan WalkAway plus.

b) Patrón de resistencia antibiótica

Con los datos obtenidos sobre la susceptibilidad antibiótica de los microorganismos incluidos en el estudio, se calculó el patrón de resistencia antibiótica utilizando los criterios EUCAST 2023 para la clasificación en categoría de susceptible o resistente (159).

c) Análisis de datos

Se evaluaron los resultados obtenidos con QuickMIC y MicroScan, clasificando las discrepancias en tres categorías:

- Discrepancia muy grave: cuando el nuevo método identificó el antibiótico como susceptible, aunque en realidad era resistente.
- Discrepancia grave: cuando el antibiótico fue clasificado como resistente, aunque en realidad era susceptible.
- Discrepancia menor: cuando una categoría de susceptible o resistente fue reportada como exposición aumentada (I) en el sistema de prueba, o viceversa.

3.1.3 Exploración de nuevas estrategias terapéuticas

Para la exploración de nuevas estrategias terapéuticas se trabajó con 109 cepas de *P. aeruginosa* con resistencia a carbapenems, de las cuales 54 presentaban producción de carbapenemasas tipo VIM y las 55 restantes mostraban resistencia a carbapenems por otros mecanismos diferentes a la producción de carbapenemasas. Las cepas se

seleccionaron de manera consecutiva en el Hospital General Dr. Balmis (Alicante), durante un periodo de 6 meses.

Las cepas fueron almacenadas a -80°C en tubos Eppendorf de 1,5ml que contenían una mezcla de Caldo de Soja Tripticaseína (TSB-T) y glicerol. Antes de su análisis, los microorganismos se descongelaron a temperatura ambiente y fueron cultivados en agar sangre. Posteriormente, se incubaron a 37°C durante 24 horas para obtener colonias aisladas y viables para su estudio.

Para la identificación de las cepas, se empleó espectrometría de masas (MALDI-TOF). Para evaluar la resistencia a carbapenémicos, se utilizó el sistema Walk Away (Beckman Coulter), mientras que la detección de carbapenemasas se llevó a cabo mediante GeneXpert® (Cepheid) y la prueba de inmunocromatografía NG-TEST/CARBA-5® (Biotech Laboratorios).

a) *Delafloxacino*

La actividad de **delafloxacino** se comparó con la de ciprofloxacino y levofloxacino mediante E-test BD® (Biomérieux), empleando placas con medio Mueller Hinton E Agar (MHE). La interpretación de los resultados se realizó siguiendo los criterios de EUCAST 2023, utilizando los puntos de corte clínicos establecidos para ciprofloxacino ($\text{CMI} > 0,5$ mg/L) y levofloxacino ($\text{CMI} > 2$ mg/L) en *P. aeruginosa*, además del punto de corte epidemiológico para delafloxacino ($\text{CMI} > 2$ mg/L).

El análisis estadístico de la relación entre la sensibilidad al delafloxacino y la presencia de carbapenemasas se realizó mediante la prueba de Chi-cuadrado y el test de Fisher, utilizando el software RStudio.

b) *Cefiderocol*

Se analizó la sensibilidad de las 109 cepas estudiadas al **cefiderocol** y se comparó con la de otros antibióticos, incluyendo imipenem/relebactam, ceftolozano/tazobactam, colistina, amikacina, piperacilina/tazobactam, ceftazidima y cefepime. Para todos los antimicrobianos, excepto el cefiderocol, la determinación de la sensibilidad se llevó a cabo mediante tiras de gradiente E-test (Liofilchem®). Para la evaluación de la actividad in vitro del cefiderocol, se emplearon tres metodologías distintas:

- Microdilución en medio con bajo contenido de hierro (UMIC® Bruker): Se utilizaron tiras UMIC® Cefiderocol para determinar la concentración mínima

inhibitoria (CMI) en un rango de 0,03 a 32 mg/L para *Pseudomonas aeruginosa*, conforme a la norma ISO 20776-1:2019 (160).

- Tiras de gradiente de difusión E-test Liofilchem®: Se siguieron las instrucciones del fabricante y se utilizaron tres concentraciones de inóculo bacteriano: estándar ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL; 0,5 McFarland), reducido ($1,5 \times 10^7$ UFC/mL) y elevado (3×10^8 UFC/mL; 1 McFarland). En todos los casos, las pruebas se realizaron en placas con medio Mueller Hinton E Agar (Biomérieux).
- Discos de sensibilidad antimicrobiana Thermo Scientific™ Oxoid™: Se aplicó la metodología recomendada por el fabricante, empleando las mismas tres concentraciones bacterianas mencionadas y utilizando placas con Mueller Hinton E Agar (Biomérieux).

Para determinar si existían diferencias significativas entre los tres inóculos utilizados en la prueba con tiras E-test Liofilchem®, se utilizó el test de Kruskal-Wallis y, en caso necesario, se realizó una comparación por pares mediante la prueba de Dunn con la corrección de Benjamini-Hochberg.

La interpretación de los resultados se realizó según los criterios establecidos por EUCAST 2023 (159).

3.1.4 Análisis genómico comparativo de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en distintos entornos

El estudio analizó 749 cepas de *P. aeruginosa* obtenidas de *Pseudomonas* Genome Database (161), que procedían de diferentes ambientes; 591 de aislados humanos, 103 de entornos acuáticos (agua dulce y marina) y 55 del suelo. Las secuencias de ADN codificante fueron predichas con Prodigal v2.6 (162), y la anotación se realizó con DIAMOND v2.0.6 (163), comparando contra la base de datos NCBI NR. Además, las funciones proteicas se determinaron con las bases COG (164) y TIGFRAM (165) mediante HMMscan v3.1b2 (166). Para el análisis estadístico, los datos se expresaron como media \pm desviación estándar (DE) y se compararon con la prueba t de Student. Se utilizó SPSS v15.0, considerando significativo un $p < 0.05$.

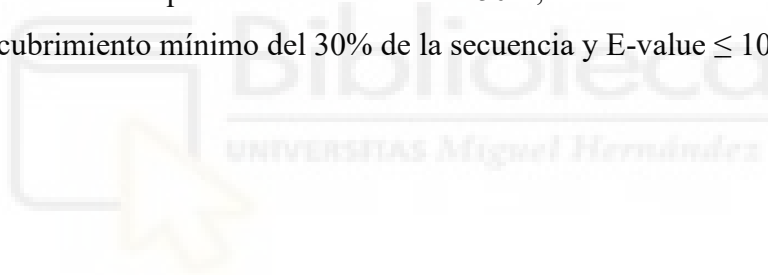
Para evaluar la relación entre los genomas, se calcularon los valores de ANI (Identidad Nucleotídica Promedio) con FastANI (167), y los genomas con ANI $> 99\%$ fueron dereplicados con dRep (168). La clasificación filogenómica se realizó con PhyloPhlan3

(169), ajustado para usar IQ-TREE (170) con el modelo LG+F+G4 y un bootstrap de 1000 réplicas (171). Posteriormente, el árbol resultante fue editado con iTOL (172).

Se usó PPanGGOLiN (173) para clasificar los genes en persistentes, shell y cloud. La anotación funcional de cada grupo se hizo contra la base SEED subsystems (174), usando DIAMOND v2.0.6 con criterios de identidad y alineamiento superiores al 50%. Los genes de resistencia y virulencia fueron identificados con las bases MEGARes (175) y Virulence Factor Database (176), respectivamente.

Los plásmidos y profagos en los genomas fueron detectados con Plasmer (177) y VIBRANT v1.2.1 (178). Tras una validación manual, se anotaron funcionalmente las proteínas codificadas en estos elementos con DIAMOND v2.0.6, comparando con la base NCBI NR.

Para identificar posibles endolisinas, se aplicó el método de Fernández-Ruiz et al. (179), comparando las proteínas predichas con una base de datos curada de endolisinas. Se consideraron relevantes aquellas con identidad >50%, alineamiento de al menos 50 aminoácidos, cubrimiento mínimo del 30% de la secuencia y E-value $\leq 10^{-3}$.





4. RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante esta tesis doctoral se encuentran recogidos en los artículos científicos incluidos en los capítulos siguientes. A continuación, se presentan un resumen de los principales hallazgos de cada publicación.

4.1 Optimización del diagnóstico rápido de infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*.

Se procesaron un total de 2042 hemocultivos positivos, de los cuales se seleccionaron 1336 para el análisis, excluyendo aquellos en los que se aislaron microorganismos considerados contaminantes en una única botella de hemocultivo. Para el estudio de estos hemocultivos, se llevaron a cabo 175 paneles BCID2, de los cuales 121 correspondieron a bacteriemias monomicrobianas y 54 a bacteriemias polimicrobianas.

La concordancia entre el panel BCID2 y el cultivo bacteriológico fue más elevada en los casos de bacteriemia monomicrobiana, alcanzando un 95%. Las discrepancias observadas en estos casos se debieron exclusivamente a la ausencia del patógeno en el panel BCID2. En contraste, en las bacteriemias polimicrobianas, la concordancia fue menor (72,2%), siendo la principal causa de discrepancia la identificación de microorganismos en el panel que no fueron recuperados en el cultivo. En menor proporción, también se observaron discrepancias debido a la falta de detección de ciertos microorganismos en el panel BCID2, como ocurrió en los casos monomicrobianos.

En cuanto a los mecanismos de resistencia bacteriana, el grado de concordancia fue muy alto, alcanzando el 100% en bacterias gram-positivas y el 98,12% en bacterias gram-negativas.

4.2 Desarrollo e innovación en métodos de evaluación de la susceptibilidad antibiótica.

Se trabajaron un total de 86 muestras de hemocultivos en el periodo del estudio. Del total, 18 (20.9%) fueron excluidas debido a que se trataba de BGN no incluidos en el panel y/o bacteriemias polimicrobianas. De las 68 muestras restantes, se distribuyeron de la siguiente manera: *E. coli* (n = 41, 60,3%), *Klebsiella* spp. (n = 14, 20,5%), *Enterobacter*

spp. (n = 5, 7,4%), *P. aeruginosa* (n = 4, 5,9%), *Citrobacter* spp. (n = 2, 2,9%), *Proteus* spp. (n = 1, 1,5%) y *Serratia marcescens* (n = 1, 1,5%).

En total, se analizaron 816 combinaciones de antibiótico y microorganismo (12 por muestra), detectándose ocho discrepancias. Esto resultó en una concordancia del 99,02% en la comparación entre antibióticos.

4.3 Exploración de nuevas estrategias terapéuticas

4.3.1 Delafloxacino

Se llevó a cabo una comparación del perfil de sensibilidad al delafloxacino en función de la presencia o ausencia de carbapenemasas. De las 109 cepas analizadas, 39 (35,8%) fueron sensibles al delafloxacino, mientras que 24 (22,0%) mostraron sensibilidad a otras fluoroquinolonas como ciprofloxacino y levofloxacino. Se observó que todas las cepas sensibles a las fluoroquinolonas convencionales también fueron sensibles al delafloxacino. Sin embargo, algunas cepas resistentes a estas fluoroquinolonas presentaron sensibilidad al delafloxacino. En total, se identificaron 70 cepas resistentes a todas las fluoroquinolonas evaluadas.

La actividad del delafloxacino varió según la presencia de carbapenemasa tipo VIM. En las cepas productoras de esta enzima, el fármaco mostró actividad en solo el 13% de los casos, mientras que en las cepas no productoras, la eficacia fue significativamente mayor, alcanzando el 58,2% ($p < 0.001$).

Asimismo, al analizar las cepas sensibles al delafloxacino pero resistentes a las otras fluoroquinolonas, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos productores y no productores de carbapenemasas. Solo el 6% de las cepas resistentes a fluoroquinolonas convencionales que producían carbapenemasas fueron sensibles al delafloxacino, en comparación con el 34,3% de las cepas no productoras de estas enzimas, que sí respondieron al fármaco ($p < 0.01$).

Por otro lado, también se identificaron diferencias en la actividad intrínseca de los tres antibióticos evaluados. En particular, la CMI90 fue inferior para el delafloxacino en comparación con las otras fluoroquinolonas.

4.3.1 Cefiderocol

Se evaluó la actividad in vitro de cefiderocol frente a 109 cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, aisladas en el Hospital Universitario Dr. Balmis (Alicante). De estas, 54 eran productoras de carbapenemasas tipo VIM y 55 no presentaban carbapenemasas. El 98.2% de las cepas resultaron sensibles a cefiderocol, con solo dos cepas resistentes, ambas productoras de carbapenemasas, y sensibles únicamente a colistina.

En comparación con otros antibióticos, cefiderocol demostró una actividad superior. La sensibilidad a cefiderocol fue alta incluso en cepas resistentes a otros tratamientos habituales. Cefiderocol presentó los valores más bajos de CMI50 (0.11 mg/L) y CMI90 (0.38 mg/L), frente a los valores notablemente más altos de las otras opciones de antibióticos.

Se evaluaron además tres métodos para la determinación de susceptibilidad a cefiderocol: microdilución en medio con depleción de hierro (UMIC® Bruker, método de referencia), tiras de gradiente E-test (Liofilchem®) y discos de difusión (Thermo Scientific™ Oxoid™). Ambas técnicas alternativas a la de referencia mostraron una concordancia categórica del 100% con el método de referencia al clasificar las cepas como sensibles o resistentes. Sin embargo, en el método de disco difusión, las dos cepas resistentes mostraron halos de inhibición dentro de la zona de incertidumbre técnica, lo que sugiere limitaciones en su utilidad clínica. La técnica de E-test se consideró más práctica para uso rutinario en laboratorio, sobre todo en ausencia de medios especiales con bajo contenido en hierro.

También se examinó el efecto del inóculo bacteriano en la actividad del antibiótico. Se probaron tres concentraciones distintas de inóculo (1.5×10^7 , 1.5×10^8 y 3×10^8 UFC/mL). Se observó una disminución de la actividad in vitro de cefiderocol (aumento de los valores de CMI) a medida que aumentaba la concentración del inóculo, aunque sin modificar la categorización como sensible o resistente. Este efecto fue estadísticamente significativo según el test de Kruskal–Wallis y las comparaciones múltiples de Dunn.

Además, en la técnica de disco difusión, el incremento del inóculo provocó halos de inhibición dentro de zonas de incertidumbre técnica (15 y 17 mm). Estos resultados subrayan la necesidad de un control estricto del inóculo en ensayos de sensibilidad y

sugieren que una alta densidad bacteriana podría favorecer la aparición de mutantes resistentes durante el tratamiento.

4.4 Análisis genómico comparativo de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en distintos entornos

Se analizaron 749 genomas de *Pseudomonas aeruginosa* (591 clínicos, 103 acuáticos y 55 del suelo), encontrándose diferencias significativas en el tamaño genómico entre ellos, siendo mayor en cepas acuáticas. El análisis filogenético de 332 genomas no redundantes reveló baja diversidad intraespecie y ausencia de agrupación filogenética por origen.

El estudio del pangenoma reveló una estructura abierta, compuesta por 26,590 familias génicas en total. El genoma persistente (presente en al menos el 95% de los genomas) incluyó 5112 familias, mientras que el conjunto compartido entre entornos descendió a 4891. El genoma flexible se dividió en dos componentes: el shell genome (genes presentes entre el 15% y el 95%) y el cloud genome (menos del 15%). En este compartimento flexible se identificaron 3035 familias comunes, siendo las cepas clínicas las que albergaron el mayor número de familias exclusivas (8569), seguidas de las acuáticas (3461) y del suelo (1496). Además, los entornos no clínicos compartieron una mayor proporción de familias entre sí, aunque todos presentaron familias exclusivas.

Desde un punto de vista funcional, el genoma persistente mostró una alta proporción de genes asignados a categorías metabólicas esenciales (aminoácidos, pared celular, metabolismo de proteínas y ácidos nucleicos). Por el contrario, el genoma flexible presentó menor porcentaje de anotación funcional (19–23%) y una mayor diversidad, con funciones relacionadas con elementos móviles, virulencia, metabolismo secundario, mecanismos de defensa y adaptación al entorno. Se observaron diferencias ambientales específicas: las cepas del suelo poseían funciones únicas en metabolismo del azufre; las acuáticas mostraron mayor presencia de genes de transporte de membrana; y las clínicas, un metabolismo lipídico más eficiente y mayor densidad de genes de regulación y señalización.

En cuanto a resistencia antimicrobiana, se identificaron 67 genes (1.3%) en el genoma persistente, correspondientes a resistencia multicompuesto (41.8%), fármacos específicos (34.3%), biocidas (14.9%) y metales (9%), indicando una resistencia intrínseca común.

En el genoma flexible, se encontraron 19 genes de resistencia a antimicrobianos (ARGs) en cepas clínicas y del suelo, y solo uno en las acuáticas, principalmente asociados a metales. El cloud genome mostró mayor diversidad: 83 ARGs en cepas clínicas, incluyendo resistencia a fluoroquinolonas, β -lactámicos, tetraciclinas y sulfonamidas, algunos exclusivos del entorno clínico. Las cepas acuáticas y del suelo mostraron resistencia principalmente a metales, sin nuevos ARGs frente a antibióticos.

Respecto a factores de virulencia, el genoma persistente albergaba 339 genes distribuidos en funciones clave como adhesión, secreción de efectores, modulación inmune, nutrición, exotoxinas, biopelículas y regulación. En el genoma flexible, se detectaron 128 genes de virulencia en cepas clínicas, 80 en acuáticas y 62 en del suelo. Las cepas clínicas presentaron mayor complejidad y abundancia, con genes exclusivos relacionados con enzimas extracelulares y actividad antimicrobiana. En el cloud genome predominaban genes asociados a biopelículas, exotoxinas y supervivencia frente a estrés, especialmente en cepas clínicas.

Se identificaron 85 plásmidos: 58 en cepas clínicas, 19 en acuáticas y 8 en del suelo. Solo el 26% portaban genes de resistencia, con un promedio de 4 ARGs por plásmido, llegando a 9 en algunos plásmidos clínicos. No se detectaron ARGs en plásmidos de cepas del suelo. Destaca un plásmido clínico de gran tamaño (436 Kb) que albergaba un integrón con múltiples genes de resistencia (incluyendo transportadores de eflujo para tetraciclinas y fenicoles), también identificado en otras *Gammaproteobacteria* a nivel global. Además, se hallaron 10 proteínas de virulencia ($\geq 70\%$ identidad) en plásmidos clínicos, principalmente relacionadas con sistemas de secreción y metabolismo.

Finalmente se detectaron 2479 profagos, con un promedio de tres por genoma clínico y uno por genoma acuático o del suelo. El 91% eran lisogénicos y se agruparon en 709 clústeres, aunque 454 fueron únicos. Se identificaron 56 genes de resistencia en profagos (0.06% del total de proteínas), principalmente asociados a fluoroquinolonas y bombas de eflujo, además de genes de resistencia a β -lactámicos clase D en cepas acuáticas. También se hallaron 76 proteínas de virulencia, principalmente en cepas clínicas y acuáticas, vinculadas a secreción de efectores, metabolismo, modulación inmune y regulación. La toxina zonular (zonula occludens toxin) fue detectada en 18 profagos (12 clínicos, 5 acuáticos y 1 del suelo). Asimismo, se identificaron 1820 endolisinas, agrupadas en 51 clústeres funcionales, incluyendo familias GH19, lisozimas, enzimas de lisis y proteínas de degradación de quitina, siendo estas últimas más frecuentes en profagos clínicos.



6. DISCUSIÓN

La presente discusión reúne los principales hallazgos de los estudios incluidos en esta tesis doctoral, que abordan los retos actuales que plantea *Pseudomonas aeruginosa* como patógeno prioritario desde tres enfoques clave: la implementación de tecnologías de diagnóstico microbiológico rápido, la evaluación de nuevas alternativas terapéuticas frente a cepas multirresistentes y el análisis genómico de aislados clínicos y ambientales para profundizar en los mecanismos de resistencia y su diseminación. Esta visión integrada permite reflexionar de forma crítica sobre la utilidad clínica de las herramientas disponibles y subraya la necesidad de estrategias combinadas que mejoren el tratamiento, optimicen el uso de antimicrobianos y contribuyan al control de la resistencia desde un enfoque global.

En primer lugar, la implementación de tecnologías de diagnóstico rápido ha supuesto un punto de inflexión en la gestión de las bacteriemias causadas por bacilos gramnegativos multirresistentes, como *Pseudomonas aeruginosa*. En particular, las herramientas FilmArray BCID2 y QuickMIC han demostrado un notable impacto clínico al reducir significativamente los tiempos de respuesta frente a los métodos tradicionales.

La herramienta FilmArray BCID2 permite identificar los principales patógenos asociados a bacteriemia (180), así como los mecanismos de resistencia más relevantes, en menos de una hora y con un requerimiento técnico mínimo (181,182). Su aplicación complementa eficazmente técnicas como el MALDI-TOF o los antibiogramas rápidos, y su valor clínico radica en la posibilidad de aplicar terapias dirigidas de forma precoz, reduciendo el uso de antibióticos de amplio espectro (183–185). Además, esta tecnología tiene un coste reducido frente al impacto económico de cada episodio de bacteriemia y destaca por su automatización y facilidad de uso, lo que permite implantar un servicio diagnóstico continuo (24/7) incluso en centros con recursos limitados (186). Esto facilita una respuesta microbiológica rápida, la integración automática de resultados en los sistemas informáticos del centro y una menor tasa de errores postanalíticos (187). No obstante, conviene tener presente algunas limitaciones, como su incapacidad para detectar ciertos mecanismos de resistencia en *P. aeruginosa* que no impliquen producción de carbapenemasas, o en enterobacterias con resistencia a cefalosporinas de tercera generación mediada por mecanismos distintos al CTX-M (188–190).

En esta línea, el sistema QuickMIC proporciona resultados de sensibilidad antibiótica en un plazo de 2 a 4 horas, con alta precisión y concordancia frente a métodos de referencia (191–193). Esta rapidez lo convierte en una herramienta valiosa en el manejo de

infecciones graves por bacilos gramnegativos multirresistentes, especialmente aquellas incluidas en la categoría de “resistencia de difícil tratamiento”, que presentan resistencia simultánea a múltiples clases de antibióticos. A diferencia de los métodos genotípicos, QuickMIC ofrece una evaluación fenotípica directa, lo que permite detectar mecanismos de resistencia no identificables mediante pruebas moleculares, como la hiperproducción de AmpC, alteraciones en porinas o β -lactamasas no CTX-M (194–197). Esta capacidad resulta clave para ajustar precozmente el tratamiento empírico y seleccionar antimicrobianos de espectro reducido, minimizando el impacto ecológico y favoreciendo un uso más racional de los antibióticos (198,199). No obstante, conviene señalar que, al igual que otros sistemas automatizados, QuickMIC no está validado para todos los microorganismos y puede tener limitaciones en el análisis de infecciones polimicrobianas, por lo que su aplicación debe ir acompañada de una correcta evaluación del contexto clínico y microbiológico (200).

Ambos sistemas, por tanto, presentan ventajas complementarias: FilmArray BCID2 destaca por la identificación rápida del patógeno y genes de resistencia, mientras que QuickMIC permite seleccionar antibióticos de espectro más estrecho a partir de datos fenotípicos. Este enfoque combinado no solo mejora el pronóstico del paciente, sino que contribuye a un uso racional de los antibióticos y a la contención de la resistencia antimicrobiana (201–203). No obstante, para maximizar su impacto clínico, estas herramientas deben incorporarse en protocolos diagnósticos estandarizados que incluyan la participación de los equipos PROA (Programa de Optimización del Uso de Antimicrobianos). Su aplicación debe adaptarse a la epidemiología local y estar disponible en régimen 24/7, lo que permite interpretar los resultados de forma inmediata, optimizar el tratamiento antimicrobiano y reducir el coste asistencial (204–206).

En cuanto al tratamiento, las infecciones por *P. aeruginosa* constituyen uno de los principales retos terapéuticos en microbiología. Es por ello, que la evaluación de nuevas terapias resulta de especial interés, tanto por su potencial eficacia como por su relevancia en escenarios clínicos donde las opciones terapéuticas son limitadas.

Delafloxacino, es una fluorquinolona de nueva generación, que ha mostrado una actividad in vitro superior a otras fluorquinolonas clásicas frente a cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenems no productoras de carbapenemasas (207). La eficacia observada se atribuye, en parte, a su estructura química, que limita su expulsión al exterior una vez dentro de la célula. Sin embargo, su actividad disminuye considerablemente en

cepas con mecanismos de resistencia mediados por la producción de carbapenemasas, lo que subraya la necesidad de realizar pruebas rápidas de caracterización genética antes de considerar su uso terapéutico (208).

Por otro lado, cefiderocol se ha posicionado como una de las opciones más prometedoras frente a cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes, incluyendo aquellas que producen MBL. El estudio confirmó su elevada actividad in vitro en los aislados clínicos obtenidos antes del uso generalizado del fármaco, proporcionando una línea base para el seguimiento de la evolución de resistencias (209,210). La eficacia del antibiótico varía en función del tipo de carbapenemasa presente en la cepa, mostrando buena actividad frente a enzimas VIM, pero una menor efectividad en presencia de carbapenemasas del tipo NDM (83,4 %) (211). Por ello, resulta fundamental disponer de pruebas rápidas que permitan detectar no solo la presencia de estas enzimas, sino también su tipificación, para orientar adecuadamente la decisión terapéutica (191,193). Los resultados respaldan el papel de cefiderocol como una alternativa terapéutica eficaz frente a infecciones por *P. aeruginosa* de difícil tratamiento, debido a su destacada actividad in vitro en comparación con otros antibióticos disponibles (213,214). Además, se evaluó la fiabilidad de distintos métodos de sensibilidad y la influencia del inóculo bacteriano, con resultados destacables. Respecto a los métodos de sensibilidad, el E-test y la técnica de difusión en disco, frente al método de microdilución en medio con depleción de hierro de referencia. El E-test mostró una buena correlación con el método de referencia, mientras que la técnica de disco presentó limitaciones, especialmente en cepas cercanas al punto de corte clínico (214–216). Respecto al inóculo, se observó que una disminución de la actividad intrínseca del fármaco al aumentar el inóculo bacteriano lo que resalta la necesidad de implementar controles de este parámetro. No obstante, todas las cepas analizadas siguieron clasificándose como sensibles o resistentes, en contraste con estudios previos realizados en *Enterobacterales*, donde se reportaron cambios de categoría (217–219). Estos datos sugieren que, aunque el efecto inóculo puede no modificar la categorización clínica, podría estar implicado en la aparición de mutantes resistentes durante el tratamiento, fenómeno ya descrito a pesar del bajo uso del fármaco (220,221).

Aunque los resultados obtenidos con ambos fármacos son prometedores, su uso debe ser siempre prudente y supervisado por los equipos PROA, con el objetivo de evitar la aparición de resistencias asociadas a un empleo inadecuado (222). La detección precoz mediante técnicas fenotípicas rápidas, junto con políticas estrictas de uso racional, resulta

clave para preservar la eficacia de estas nuevas opciones terapéuticas y limitar la expansión de cepas multirresistentes, especialmente en escenarios clínicos donde el riesgo de selección de mutantes es elevado (134). En conjunto, estos hallazgos refuerzan la importancia de contar con terapias dirigidas frente a *P. aeruginosa* multirresistente, en un contexto donde las opciones orales son limitadas y los tratamientos intravenosos prolongados representan una carga asistencial considerable. La incorporación de nuevas moléculas debe ir necesariamente acompañada de estrategias de diagnóstico rápido y control antimicrobiano, para maximizar su impacto clínico y contener el desarrollo de resistencias emergentes (222).

Finalmente, comprender la epidemiología local de *Pseudomonas aeruginosa* es esencial para seleccionar una terapia empírica adecuada, especialmente en infecciones graves causadas por cepas multirresistentes. Sin embargo, más allá del entorno clínico inmediato, es necesario adoptar una visión amplia que considere la circulación de mecanismos de resistencia a través de distintos ecosistemas (223,224). La transmisión de estos determinantes genéticos puede producirse entre cepas humanas, animales y ambientales, lo que justifica la necesidad de integrar el análisis genómico y la vigilancia microbiológica dentro del enfoque “One Health” (225). En este contexto, el estudio genómico profundo permite no solo caracterizar las cepas implicadas en cada entorno, sino también anticipar la aparición de resistencias emergentes, facilitando así una toma de decisiones más precisa y sostenible en salud pública (226).

En este sentido, y desde la perspectiva del enfoque “One Health”, el análisis genómico comparativo de 749 cepas de *P. aeruginosa* procedentes de entornos clínicos, acuáticos y del suelo ha permitido profundizar en su diversidad genética y capacidad adaptativa. La falta de relación entre el origen de las cepas y su agrupamiento filogenético, junto con un pangenoma abierto, refleja una notable plasticidad genética que favorece su adaptación ecológica y el intercambio de genes de resistencia y virulencia (227). El genoma persistente conserva funciones metabólicas esenciales, mientras que el flexible muestra una gran heterogeneidad, con una mayor especialización en entornos clínicos debido a la presión antimicrobiana (228,229). *P. aeruginosa* presenta una elevada resistencia intrínseca en su genoma persistente, a diferencia de otros patógenos en los que predomina en el genoma flexible (230). Esta integración podría estar favorecida por la exposición prolongada a antibióticos en el medio ambiente, marcando un posible paso evolutivo en la resistencia (231). El genoma flexible contribuye con resistencias específicas según el

entorno: fármacos en cepas clínicas y metales en las ambientales (232), reflejando distintas presiones selectivas. La exposición a metales pesados en ambientes naturales ha impulsado mecanismos de resistencia que se diseminan por co-selección, con implicaciones relevantes para el enfoque “One Health” (233, 234). La transferencia horizontal de genes se ve favorecida por integrones multirresistentes en plásmidos, similares a los presentes en otras especies patógenas globales (236). Asimismo, los profagos de cepas clínicas actúan como reservorios de resistencia y virulencia, reforzando su papel en la patogenicidad y en la complejidad del mobiloma. En ellos se detectaron también endolisinas, enzimas líticas con potencial terapéutico frente a bacterias multirresistentes, lo que refleja la sofisticada adaptación de esta especie a múltiples entornos (237).

Los resultados obtenidos en esta tesis ofrecen una visión amplia y actualizada sobre las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* desde una perspectiva diagnóstica, terapéutica y genómica. No obstante, es importante señalar algunas limitaciones inherentes al diseño global del trabajo. Si bien se han empleado herramientas avanzadas y enfoques innovadores, su aplicación se ha realizado principalmente en un entorno hospitalario concreto, por lo que sería recomendable validar estos hallazgos en otros contextos clínicos y epidemiológicos. A pesar de ello, la coherencia entre los distintos enfoques abordados refuerza la solidez de las conclusiones y aporta una base sólida para futuras líneas de investigación.

Los hallazgos de esta tesis sientan las bases para futuras líneas de investigación centradas en la mejora del diagnóstico, el control epidemiológico y la optimización terapéutica frente a *Pseudomonas aeruginosa*. En el ámbito del diagnóstico, se están desarrollando nuevas tecnologías como el sistema IR Biotyper (238), que permite discriminar cepas mediante espectros infrarrojos y que, combinado con MALDI-TOF y métodos moleculares, podría facilitar una tipificación rápida en situaciones de brote o vigilancia hospitalaria. Paralelamente, el avance de la secuenciación masiva seguirá potenciando el estudio de resistencias emergentes, la vigilancia genómica en tiempo real y la detección precoz de mecanismos de transmisión horizontal de genes (239). En este contexto de integración tecnológica, también el uso de herramientas de inteligencia artificial representa una oportunidad creciente para desarrollar modelos predictivos que analicen grandes volúmenes de datos clínicos, microbiológicos y genómicos, permitiendo anticipar patrones de diseminación, evolución de resistencias y riesgos de brote con

mayor precisión (240,241). Esta aproximación multidisciplinar, será clave para avanzar hacia una gestión más eficaz de las infecciones por *P. aeruginosa*.





7. CONCLUSIONES

1. La incorporación de sistemas moleculares como FilmArray BCID2 en el diagnóstico de bacteriemias permite una identificación rápida y fiable de patógenos y genes de resistencia directamente a partir del hemocultivo positivo, lo que optimiza la selección empírica de tratamiento antibiótico y mejora la respuesta clínica
2. FilmArray BCID2 es un sistema fácil de usar y automatizado que permite mantener un diagnóstico microbiológico de forma continua (24/7), algo especialmente útil en situaciones de urgencia. Gracias a su rapidez y simplicidad, puede implantarse incluso en centros con menos recursos, ayudando a iniciar tratamientos más adecuados desde el principio, reducir el uso de antibióticos de amplio espectro y frenar la aparición de resistencias.
3. QuickMIC es una herramienta de diagnóstico rápido que permite conocer el perfil de sensibilidad antibiótica en pocas horas, lo que resulta clave para ajustar precozmente el tratamiento en infecciones graves por bacterias multirresistentes. Su enfoque fenotípico ayuda a detectar mecanismos de resistencia que no se identifican con técnicas moleculares, mejorando así, la precisión terapéutica.
4. La incorporación de QuickMIC en los protocolos de manejo de bacteriemias permite tomar decisiones terapéuticas más rápidas y ajustadas, lo que puede mejorar el pronóstico del paciente y reducir el uso innecesario de antibióticos de amplio espectro. Su capacidad para detectar de forma precoz la resistencia a carbapenémicos, incluso en cepas que no producen carbapenemasas, lo convierte en una herramienta clave frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes.
5. Delafloxacino es una fluoroquinolona de nueva generación con buena actividad frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, especialmente en ausencia de carbapenemasas, mostrando eficacia incluso en cepas con resistencia a otras fluoroquinolonas, lo que lo convierte en una opción prometedora en contextos clínicos con opciones terapéuticas limitadas.
6. Cefiderocol ha demostrado una elevada actividad in vitro frente a *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes, lo que lo posiciona como una opción terapéutica

eficaz en escenarios clínicos con pocas alternativas, especialmente frente a cepas productoras de metalo- β -lactamasas.

7. Cefiderocol, como antibiótico de reciente introducción con gran potencial frente a infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, requiere una evaluación microbiológica precisa para preservar su eficacia. La elección del método de sensibilidad y el control del inóculo son fundamentales para evitar errores de interpretación y minimizar el riesgo de selección de resistencias, especialmente en un contexto donde su uso aún es limitado y las tasas de resistencia siguen siendo bajas.
8. La capacidad de *Pseudomonas aeruginosa* para mantener un alto potencial patogénico y de resistencia en distintos entornos, independientemente de su origen, evidencia la necesidad de abordar su estudio desde un enfoque “One Health”. Su alto genoma persistente, su resistencia intrínseca y la falta de relación entre filogenia y reservorio dificultan su control y tratamiento, lo que requiere nuevas estrategias terapéuticas y una vigilancia integrada.
9. La detección de integrones móviles, plásmidos y profagos portadores de genes de resistencia en distintos entornos demuestra la capacidad de *Pseudomonas aeruginosa* para diseminar resistencias más allá del ámbito clínico. La co-selección con genes de resistencia a metales en cepas ambientales y la presencia de elementos genéticos idénticos en cepas filogenéticamente distantes refuerzan el riesgo de transferencia cruzada entre reservorios, lo que podría favorecer la aparición de nuevas cepas resistentes en humanos y dificultar aún más su tratamiento a nivel global.
10. La lucha contra la resistencia antimicrobiana requiere una respuesta global y coordinada que combine medidas en todos los ámbitos implicados: hospitalario, comunitario, veterinario y ambiental. En el contexto clínico, el diagnóstico microbiológico rápido disponible 24/7 y la participación activa de los equipos PROA son fundamentales para mejorar el abordaje de las infecciones graves y promover un uso más racional de los antimicrobianos. Esta estrategia debe completarse con una investigación genómica sólida en cepas patógenas y

ambientales, con el objetivo de anticipar riesgos, frenar la diseminación de resistencias y preservar la eficacia de los tratamientos presentes y futuros.





8. REFERENCIAS

1. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. Ninth edition. Edinburg London New York Oxford Philadelphia St. Louis Sydney: Elsevier; 2021. 855 p.
2. Fauci AS. Harrison, principios de medicina interna enfermedades infecciosas. México, D.F: McGraw Hill; 2008.
3. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. Int J Mol Sci. 18 de marzo de 2021;22(6):3128.
4. Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Int J Mol Sci. 17 de noviembre de 2020;21(22):8671.
5. Oluyombo O, Penfold CN, Diggle SP. Competition in Biofilms between Cystic Fibrosis Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Is Shaped by R-Pyocins. Dunny GM, editor. mBio. 26 de febrero de 2019;10(1):e01828-18.
6. Rollet C, Gal L, Guzzo J. Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*: Physiology of biofilm-detached cells and recolonization. FEMS Microbiol Lett. 8 de diciembre de 2008;290(2):135-42.
7. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. Protein Cell. enero de 2015;6(1):26-41.
8. Ng WL, Bassler BL. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. Annu Rev Genet. 1 de diciembre de 2009;43(1):197-222.
9. Haiko J, Westerlund-Wikström B. The Role of the Bacterial Flagellum in Adhesion and Virulence. Biology. 25 de octubre de 2013;2(4):1242-67.
10. Song WS, Yoon S il. Crystal structure of FliC flagellin from *Pseudomonas aeruginosa* and its implication in TLR5 binding and formation of the flagellar filament. Biochem Biophys Res Commun. febrero de 2014;444(2):109-15.
11. Sampedro I, Parales RE, Krell T, Hill JE. *Pseudomonas* chemotaxis. FEMS Microbiol Rev. octubre de 2014;n/a-n/a.
12. Schwarzer C, Fischer H, Machen TE. Chemotaxis and Binding of *Pseudomonas aeruginosa* to Scratch-Wounded Human Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. Ahmad S, editor. PLOS ONE. 31 de marzo de 2016;11(3):e0150109.
13. Dauner M, Skerra A. Scavenging Bacterial Siderophores with Engineered Lipocalin Proteins as an Alternative Antimicrobial Strategy. ChemBioChem. 2 de marzo de 2020;21(5):601-6.
14. Bonneau A, Roche B, Schalk IJ. Iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa* by the siderophore pyoverdine: an intricate interacting network including periplasmic and membrane proteins. Sci Rep. 10 de enero de 2020;10(1):120.
15. Cornelis P, Dingemans J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2013 [citado

6 de diciembre de 2024];3. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2013.00075/abstract>

16. Nadal Jimenez P, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ. The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev.* marzo de 2012;76(1):46-65.
17. Hospenthal MK, Costa TRD, Waksman G. A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* junio de 2017;15(6):365-79.
18. Craig L, Pique ME, Tainer JA. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* mayo de 2004;2(5):363-78.
19. Jacobsen T, Bardiaux B, Francetic O, Izadi-Pruneyre N, Nilges M. Structure and function of minor pilins of type IV pili. *Med Microbiol Immunol (Berl).* junio de 2020;209(3):301-8.
20. Tolker-Nielsen T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: From molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *APMIS.* diciembre de 2014;122(s138):1-51.
21. King JD, Kocíncová D, Westman EL, Lam JS. Review: Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immun.* octubre de 2009;15(5):261-312.
22. Huszczyński SM, Lam JS, Khursigara CM. The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. *Pathogens.* 19 de diciembre de 2019;9(1):6.
23. Cassin EK, Tseng BS. Pushing beyond the Envelope: the Potential Roles of OprF in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Pathogenicity. O'Toole G, editor. *J Bacteriol* [Internet]. 15 de septiembre de 2019 [citado 25 de noviembre de 2024];201(18). Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JB.00050-19>
24. Chevalier S, Bouffartigues E, Bodilis J, Maillot O, Lesouhaitier O, Feuilloley MGJ, et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol Rev.* 1 de septiembre de 2017;41(5):698-722.
25. Navare AT, Chavez JD, Zheng C, Weisbrod CR, Eng JK, Siehnel R, et al. Probing the Protein Interaction Network of *Pseudomonas aeruginosa* Cells by Chemical Cross-Linking Mass Spectrometry. *Structure.* abril de 2015;23(4):762-73.
26. Remans K, Vercammen K, Bodilis J, Cornelis P. Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* 1 de septiembre de 2010;156(9):2597-607.
27. Auda IG, Ali Salman IM, Odah JGh. Efflux pumps of Gram-negative bacteria in brief. *Gene Rep.* septiembre de 2020;20:100666.
28. Bleves S, Viarre V, Salacha R, Michel GPF, Filloux A, Voulhoux R. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int J Med Microbiol.* diciembre de 2010;300(8):534-43.

29. Delepelaire P. Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* noviembre de 2004;1694(1-3):149-61.
30. Anantharajah A, Mingeot-Leclercq MP, Van Bambeke F. Targeting the Type Three Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends Pharmacol Sci.* septiembre de 2016;37(9):734-49.
31. Sana TG, Berni B, Bleves S. The T6SSs of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1 and Their Effectors: Beyond Bacterial-Cell Targeting. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 9 de junio de 2016 [citado 6 de diciembre de 2024];6. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fcimb.2016.00061/abstract>
32. Pena RT, Blasco L, Ambroa A, González-Pedrajo B, Fernández-García L, López M, et al. Relationship Between Quorum Sensing and Secretion Systems. *Front Microbiol.* 7 de junio de 2019;10:1100.
33. Sommer MOA, Munck C, Toft-Kehler RV, Andersson DI. Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? *Nat Rev Microbiol.* noviembre de 2017;15(11):689-96.
34. Akova M. Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. *Virulence.* 2 de abril de 2016;7(3):252-66.
35. Rice LB. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis.* 15 de abril de 2008;197(8):1079-81.
36. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 17 de junio de 2020;33(3):e00181-19.
37. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front Microbiol.* 2019;10:539.
38. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* octubre de 2009;22(4):582-610.
39. Morrison AJ, Wenzel RP. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis.* 1984;6 Suppl 3:S627-642.
40. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infect Control Hosp Epidemiol.* noviembre de 2016;37(11):1288-301.
41. Williams BJ, Dehnbostel J, Blackwell TS. *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirol Carlton Vic.* octubre de 2010;15(7):1037-56.
42. Baillie AJ, Anderson W, Harthill JE. Proceedings: Inhibition of tryptic activity by a gastric peptide. *J Pharm Pharmacol.* diciembre de 1975;27 Suppl?-2:43P.

43. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis*. 1 de septiembre de 2016;63(5):e61-111.
44. Parker CM, Kutsogiannis J, Muscedere J, Cook D, Dodek P, Day AG, et al. Ventilator-associated pneumonia caused by multidrug-resistant organisms or *Pseudomonas aeruginosa*: Prevalence, incidence, risk factors, and outcomes. *J Crit Care*. marzo de 2008;23(1):18-26.
45. Mogayzel PJ, Naureckas ET, Robinson KA, Brady C, Guill M, Lahiri T, et al. Cystic Fibrosis Foundation pulmonary guideline. pharmacologic approaches to prevention and eradication of initial *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Ann Am Thorac Soc*. diciembre de 2014;11(10):1640-50.
46. Jacques I, Derelle J, Weber M, Vidailhet M. Pulmonary evolution of cystic fibrosis patients colonized by *Pseudomonas aeruginosa* and/or *Burkholderia cepacia*. *Eur J Pediatr*. mayo de 1998;157(5):427-31.
47. Sanders DB, Bittner RCL, Rosenfeld M, Hoffman LR, Redding GJ, Goss CH. Failure to recover to baseline pulmonary function after cystic fibrosis pulmonary exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 de septiembre de 2010;182(5):627-32.
48. Mittal R, Aggarwal S, Sharma S, Chhibber S, Harjai K. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview. *J Infect Public Health*. 2009;2(3):101-11.
49. Micek ST, Welch EC, Khan J, Pervez M, Doherty JA, Reichley RM, et al. Resistance to empiric antimicrobial treatment predicts outcome in severe sepsis associated with Gram-negative bacteremia. *J Hosp Med*. septiembre de 2011;6(7):405-10.
50. Thaden JT, Park LP, Maskarinec SA, Ruffin F, Fowler VG, van Duin D. Results from a 13-Year Prospective Cohort Study Show Increased Mortality Associated with Bloodstream Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Compared to Other Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. junio de 2017;61(6):e02671-16.
51. Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, et al. Bloodstream Infections Caused by Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacilli: Risk Factors for Mortality and Impact of Inappropriate Initial Antimicrobial Therapy on Outcome. *Antimicrob Agents Chemother*. febrero de 2005;49(2):760-6.
52. Norbury W, Herndon DN, Tanksley J, Jeschke MG, Finnerty CC, on Behalf of the Scientific Study Committee of the Surgical Infection Society. Infection in Burns. *Surg Infect*. abril de 2016;17(2):250-5.
53. Bisbe J, Gatell JM, Puig J, Mallolas J, Martinez JA, Jimenez de Anta MT, et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: univariate and multivariate analyses of factors influencing the prognosis in 133 episodes. *Rev Infect Dis*. 1988;10(3):629-35.
54. Lorusso AB, Carrara JA, Barroso CDN, Tuon FF, Faoro H. Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci*. 13 de diciembre de 2022;23(24):15779.

55. Breidenstein EBM, De La Fuente-Núñez C, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. Trends Microbiol. agosto de 2011;19(8):419-26.
56. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Microbes Infect. noviembre de 2003;5(13):1213-9.
57. Pires DP, Vilas Boas D, Sillankorva S, Azeredo J. Phage Therapy: a Step Forward in the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. J Virol. agosto de 2015;89(15):7449-56.
58. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol. enero de 2015;13(1):42-51.
59. Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics. mayo de 2009;1794(5):808-16.
60. Hancock REW, Brinkman FSL. Function of *Pseudomonas* Porins in Uptake and Efflux. Annu Rev Microbiol. octubre de 2002;56(1):17-38.
61. Bell A, Bains M, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH: expression from the cloned gene and function in EDTA and gentamicin resistance. J Bacteriol. noviembre de 1991;173(21):6657-64.
62. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. Drugs. 20 de agosto de 2009;69(12):1555-623.
63. Dreier J, Ruggerone P. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol. 2015;6:660.
64. Hocquet D, Vogne C, El Garch F, Vejux A, Gotoh N, Lee A, et al. MexXY-OprM efflux pump is necessary for a adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. Antimicrob Agents Chemother. abril de 2003;47(4):1371-5.
65. Wright G. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. Adv Drug Deliv Rev. 29 de julio de 2005;57(10):1451-70.
66. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. marzo de 2010;54(3):969-76.
67. Ratjen F, Brockhaus F, Angyalosi G. Aminoglycoside therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: A review. J Cyst Fibros. diciembre de 2009;8(6):361-9.
68. Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. febrero de 2005;49(2):479-87.
69. Hächler H, Santanam P, Kayser FH. Sequence and characterization of a novel chromosomal aminoglycoside phosphotransferase gene, aph (3')-IIb, in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. mayo de 1996;40(5):1254-6.
70. Jacoby GA, Blaser MJ, Santanam P, Hächler H, Kayser FH, Hare RS, et al. Appearance of amikacin and tobramycin resistance due to 4'-aminoglycoside

- nucleotidyltransferase [ANT(4')-II] in gram-negative pathogens. *Antimicrob Agents Chemother.* diciembre de 1990;34(12):2381-6.
71. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. En: Kudva IT, Cornick NA, Plummer PJ, Zhang Q, Nicholson TL, Bannantine JP, et al., editores. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens* [Internet]. Washington, DC, USA: ASM Press; 2016 [citado 13 de marzo de 2025]. p. 481-511. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1128/9781555819286.ch17>
 72. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.* enero de 2019;37(1):177-92.
 73. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry.* 18 de marzo de 2014;53(10):1565-74.
 74. El'Garch F, Jeannot K, Hocquet D, Llanes-Barakat C, Plésiat P. Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* marzo de 2007;51(3):1016-21.
 75. Moyá B, Beceiro A, Cabot G, Juan C, Zamorano L, Alberti S, et al. Pan- β -lactam resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: molecular mechanisms, penicillin-binding protein profiles, and binding affinities. *Antimicrob Agents Chemother.* septiembre de 2012;56(9):4771-8.
 76. Arber W. Horizontal Gene Transfer among Bacteria and Its Role in Biological Evolution. *Life.* 16 de mayo de 2014;4(2):217-24.
 77. Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis.* 1 de septiembre de 2006;43(Supplement_2):S49-56.
 78. Hong DJ, Bae IK, Jang IH, Jeong SH, Kang HK, Lee K. Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother.* 2015;47(2):81.
 79. Yan JJ. Characterization of acquired β -lactamases and their genetic support in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan: the prevalence of unusual integrons. *J Antimicrob Chemother.* 1 de julio de 2006;58(3):530-6.
 80. Sandoval-Motta S, Aldana M. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *WIREs Syst Biol Med.* mayo de 2016;8(3):253-67.
 81. Das T, Sehar S, Manefield M. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environ Microbiol Rep.* diciembre de 2013;5(6):778-86.
 82. Donlan RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis.* septiembre de 2002;8(9):881-90.
 83. Balaban NQ, Gerdes K, Lewis K, McKinney JD. A problem of persistence: still more questions than answers? *Nat Rev Microbiol.* agosto de 2013;11(8):587-91.

84. Goodman AL, Kulasekara B, Rietsch A, Boyd D, Smith RS, Lory S. A Signaling Network Reciprocally Regulates Genes Associated with Acute Infection and Chronic Persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev Cell*. noviembre de 2004;7(5):745-54.
85. Lewis K. Persister Cells. *Annu Rev Microbiol*. 13 de octubre de 2010;64(1):357-72.
86. Van Den Bergh B, Fauvart M, Michiels J. Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. *FEMS Microbiol Rev*. 1 de mayo de 2017;41(3):219-51.
87. Maisonneuve E, Gerdes K. Molecular Mechanisms Underlying Bacterial Persisters. *Cell*. abril de 2014;157(3):539-48.
88. Dingle TC, Butler-Wu SM. MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification. *Clin Lab Med*. septiembre de 2013;33(3):589-609.
89. García-Rivera C, Parra-Grande M, Merino E, Boix V, Rodríguez JC. Concordance of the filmarray blood culture identification panel 2 and classical microbiological methods in a bacteremia diagnostic unit. *Diagn Microbiol Infect Dis*. diciembre de 2022;104(4):115787.
90. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. abril de 2016;6(2):71-9.
91. Laborda P, Hernando-Amado S, Martínez JL, Sanz-García F. Antibiotic Resistance in *Pseudomonas*. En: Filloux A, Ramos JL, editores. *Pseudomonas aeruginosa* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2022 [citado 11 de marzo de 2025]. p. 117-43. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 1386). Disponible en: https://link.springer.com/10.1007/978-3-031-08491-1_5
92. Ombelet S, Natale A, Ronat JB, Vandenberg O, Hardy L, Jacobs J. Evaluation of MicroScan Bacterial Identification Panels for Low-Resource Settings. *Diagnostics*. 19 de febrero de 2021;11(2):349.
93. Khan A, Arias CA, Abbott A, Dien Bard J, Bhatti MM, Humphries RM. Evaluation of the Vitek 2, Phoenix, and MicroScan for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Stenotrophomonas maltophilia*. Simner PJ, editor. *J Clin Microbiol*. 18 de agosto de 2021;59(9):e00654-21.
94. Ito CAS, Bail L, Arend LNVS, Silva KO, Michelotto SS, Nogueira KDS, et al. Evaluation of MicroScan WalkAway for Determination of Ceftazidime-Avibactam and Ceftolozane-Tazobactam Susceptibility in Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacilli. Ledeboer NA, editor. *J Clin Microbiol*. 18 de noviembre de 2021;59(12):e01536-21.
95. Larrosa MN, Benito N, Cantón R, Canut A, Cercenado E, Fernández-Cuenca F, et al. Del CLSI al EUCAST, una transición necesaria en los laboratorios españoles. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. febrero de 2020;38(2):79-83.
96. Sánchez-Bautista A, Coy J, García-Shimizu P, Rodríguez JC. Cambio de CLSI a EUCAST en la interpretación de la sensibilidad a antimicrobianos: ¿cómo influye en nuestro medio? *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. abril de 2018;36(4):229-32.

97. Carrara E, Grossi PA, Gori A, Lambertenghi L, Antonelli M, Lombardi A, et al. How to tailor recommendations on the treatment of multi-drug resistant Gram-negative infections at country level integrating antibiotic stewardship principles within the GRADE-ADOLOPMENT framework. *Lancet Infect Dis.* febrero de 2024;24(2):e113-26.
98. Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat.* mayo de 2019;44:100640.
99. Waters V, Ratjen F. Combination antimicrobial susceptibility testing for acute exacerbations in chronic infection of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Cochrane Cystic Fibrosis and Genetic Disorders Group, editor. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 19 de junio de 2017 [citado 11 de marzo de 2025]; Disponible en: <https://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD006961.pub4>
100. Ruiz Ramos J, Suárez-Lledó Grande A, Santolaya Perrín MR, Caballero Requejo C, Hijazi Vega M, López Vinardell M, et al. [Antibiotic stewardship programs in the Spanish emergency services: PROA-URG Study]. *Rev Espanola Quimioter Publicacion Of Soc Espanola Quimioter.* abril de 2024;37(2):163-9.
101. García-Rivera C, Ricart-Silvestre A, Parra Grande M, Ventero MP, Tyshkovska-Germak I, Sánchez-Bautista A, et al. Evaluation of the quickmic system in the rapid diagnosis of Gram-negative bacilli bacteremia. *Microbiol Spectr.* 3 de octubre de 2024;12(10):e0401123.
102. Malmberg C, Torpner J, Fernberg J, Öhrn H, Ångström J, Johansson C, et al. Evaluation of the Speed, Accuracy and Precision of the QuickMIC Rapid Antibiotic Susceptibility Testing Assay With Gram-Negative Bacteria in a Clinical Setting. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:758262.
103. Namikawa H, Imoto W, Yamada K, Tochino Y, Kaneko Y, Kakeya H, et al. Predictors for onset of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*-induced bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J Hosp Infect.* diciembre de 2023;142:88-95.
104. Ince D, Fiawoo S, Choudhury R, Cosgrove SE, Dobrzynski D, Gold H, et al. Epidemiology of Gram-Negative Bloodstream Infections in the United States: Results From a Cohort of 24 Hospitals. *Open Forum Infect Dis.* julio de 2023;10(7):ofad265.
105. Namikawa H, Imoto W, Yamada K, Tochino Y, Kaneko Y, Kakeya H, et al. Predictors of mortality from extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae bacteremia. *Emerg Microbes Infect.* 31 de diciembre de 2023;12(1):2217951.
106. Eisinger RW, Williams MP, Choe SH, Krofah E. A call to action—stopping antimicrobial resistance. *JAC-Antimicrob Resist.* 29 de diciembre de 2022;5(1):dlac142.
107. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 25 de junio de 2022;7(1):199.

108. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editores. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Ninth edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2020. 1 p.
109. Schwartz B, Klamer K, Zimmerman J, Kale-Pradhan PB, Bhargava A. Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Clinical Settings: A Review of Resistance Mechanisms and Treatment Strategies. Pathog Basel Switz. 7 de noviembre de 2024;13(11):975.
110. Jiménez Pearson MA, Galas M, Corso A, Hormazábal JC, Duarte Valderrama C, Salgado Marcano N, et al. [Latin American consensus to define, categorize, and report multidrug-resistant, extensively drug-resistant, or pandrug-resistant pathogens Consenso latino-americano para definición, categorización e notificação de patógenos multirresistentes, com resistência ampliada ou panresistentes]. Rev Panam Salud Publica Pan Am J Public Health. 2019;43:e65.
111. Peña C, Cabot G, Gómez-Zorrilla S, Zamorano L, Ocampo-Sosa A, Murillas J, et al. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 15 de febrero de 2015;60(4):539-48.
112. Walkty A, Lagace-Wiens P, Adam H, Baxter M, Karlowsky J, Mulvey MR, et al. Antimicrobial susceptibility of 2906 *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates obtained from patients in Canadian hospitals over a period of 8 years: Results of the Canadian Ward surveillance study (CANWARD), 2008-2015. Diagn Microbiol Infect Dis. enero de 2017;87(1):60-3.
113. Sader HS, Castanheira M, Duncan LR, Flamm RK. Antimicrobial Susceptibility of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from United States Medical Centers Stratified by Infection Type: Results from the International Network for Optimal Resistance Monitoring (INFORM) Surveillance Program, 2015-2016. Diagn Microbiol Infect Dis. septiembre de 2018;92(1):69-74.
114. Del Barrio-Tofiño E, Zamorano L, Cortes-Lara S, López-Causapé C, Sánchez-Diener I, Cabot G, et al. Spanish nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance mechanisms and epidemiology. J Antimicrob Chemother. 1 de julio de 2019;74(7):1825-35.
115. Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 20 de noviembre de 2008;13(47):19045.
116. Viedma E, Juan C, Acosta J, Zamorano L, Otero JR, Sanz F, et al. Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. Antimicrob Agents Chemother. noviembre de 2009;53(11):4930-3.
117. Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, et al. Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. Clin Microbiol Rev. 18 de septiembre de 2019;32(4):e00031-19.

118. Butler MS, Paterson DL. Antibiotics in the clinical pipeline in October 2019. *J Antibiot (Tokyo)*. junio de 2020;73(6):329-64.
119. Bush K, Bradford PA. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nat Rev Microbiol*. mayo de 2019;17(5):295-306.
120. Petty LA, Henig O, Patel TS, Pogue JM, Kaye KS. Overview of meropenem-vaborbactam and newer antimicrobial agents for the treatment of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Infect Drug Resist*. 2018;11:1461-72.
121. Kocsis B, Gulyás D, Szabó D. Delafloxacin, Finafloxacin, and Zabofloxacin: Novel Fluoroquinolones in the Antibiotic Pipeline. *Antibiot Basel Switz*. 8 de diciembre de 2021;10(12):1506.
122. Sato T, Yamawaki K. Cefiderocol: Discovery, Chemistry, and In Vivo Profiles of a Novel Siderophore Cephalosporin. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 13 de noviembre de 2019;69(Suppl 7):S538-43.
123. Olsen I. New promising β -lactamase inhibitors for clinical use. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol*. julio de 2015;34(7):1303-8.
124. Zhanel GG, Lawrence CK, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, Zhanel M, et al. Imipenem-Relebactam and Meropenem-Vaborbactam: Two Novel Carbapenem- β -Lactamase Inhibitor Combinations. *Drugs*. enero de 2018;78(1):65-98.
125. Young K, Painter RE, Raghoobar SL, Hairston NN, Racine F, Wisniewski D, et al. In vitro studies evaluating the activity of imipenem in combination with relebactam against *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol*. 4 de julio de 2019;19(1):150.
126. Infectious Diseases Society of America. MENSEA Guidelines for the Management of Infectious Diseases. Infectious Diseases Society of America;
127. Titov I, Wunderink RG, Roquilly A, Rodríguez Gonzalez D, David-Wang A, Boucher HW, et al. A Randomized, Double-blind, Multicenter Trial Comparing Efficacy and Safety of Imipenem/Cilastatin/Relebactam Versus Piperacillin/Tazobactam in Adults With Hospital-acquired or Ventilator-associated Bacterial Pneumonia (RESTORE-IMI 2 Study). *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 6 de diciembre de 2021;73(11):e4539-48.
128. García-Rivera C, Navarro M, Parra M, Sánchez Bautista A, Gómez I, Ventero MP, et al. In vitro activity of delafloxacin against clinical isolates of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a stage prior to the clinical use of this drug. *Rev Esp Quimioter*. 26 de enero de 2024;37(1):104-5.
129. Bassetti M, Echols R, Matsunaga Y, Ariyasu M, Doi Y, Ferrer R, et al. Efficacy and safety of cefiderocol or best available therapy for the treatment of serious infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria (CREDIBLE-CR): a randomised, open-label, multicentre, pathogen-focused, descriptive, phase 3 trial. *Lancet Infect Dis*. febrero de 2021;21(2):226-40.
130. Ito A, Nishikawa T, Ota M, Ito-Horiyama T, Ishibashi N, Sato T, et al. Stability and low induction propensity of cefiderocol against chromosomal AmpC β -lactamases of

- Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother.* 1 de noviembre de 2018;73(11):3049-52.
131. Kaye KS, Naas T, Pogue JM, Rossolini GM. Cefiderocol, a Siderophore Cephalosporin, as a Treatment Option for Infections Caused by Carbapenem-Resistant Enterobacterales. *Infect Dis Ther.* marzo de 2023;12(3):777-806.
 132. García-Rivera C, Sánchez-Bautista A, Parra-Grande M, Ricart-Silvestre A, Ventero MP, Tyshkovska I, et al. Comparison of Different Methods for Assaying the In Vitro Activity of Cefiderocol against Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains: Influence of Bacterial Inoculum. *Antibiotics.* 18 de julio de 2024;13(7):663.
 133. Tenover FC, Nicolau DP, Gill CM. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* -an emerging challenge. *Emerg Microbes Infect.* diciembre de 2022;11(1):811-4.
 134. Bianco G, Gaibani P, Comini S, Boattini M, Banche G, Costa C, et al. Synergistic Effect of Clinically Available Beta-Lactamase Inhibitors Combined with Cefiderocol against Carbapenemase-Producing Gram-Negative Organisms. *Antibiot Basel Switz.* 22 de noviembre de 2022;11(12):1681.
 135. Brogden RN, Heel RC. Aztreonam. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs.* febrero de 1986;31(2):96-130.
 136. Shields RK, Doi Y. Aztreonam Combination Therapy: An Answer to Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria? *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 14 de agosto de 2020;71(4):1099-101.
 137. Sader HS, Mendes RE, Pfaller MA, Shortridge D, Flamm RK, Castanheira M. Antimicrobial Activities of Aztreonam-Avibactam and Comparator Agents against Contemporary (2016) Clinical Enterobacteriaceae Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* enero de 2018;62(1):e01856-17.
 138. Karlowsky JA, Kazmierczak KM, De Jonge BLM, Hackel MA, Sahn DF, Bradford PA. *In Vitro* Activity of Aztreonam-Avibactam against Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* Isolated by Clinical Laboratories in 40 Countries from 2012 to 2015. *Antimicrob Agents Chemother.* septiembre de 2017;61(9):e00472-17.
 139. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clin Microbiol Rev.* abril de 2005;18(2):306-25.
 140. Bassetti M, Pilato VD, Giani T, Vena A, Rossolini GM, Marchese A, et al. Treatment of Severe Infections Due to Metallo- β -Lactamases-Producing Gram-Negative Bacteria. *Future Microbiol.* octubre de 2020;15(15):1489-505.
 141. Tsivkovski R, Totrov M, Lomovskaya O. Biochemical Characterization of QPX7728, a New Ultrabroad-Spectrum Beta-Lactamase Inhibitor of Serine and Metallo-Beta-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 21 de mayo de 2020;64(6):e00130-20.
 142. Barnes MD, Taracila MA, Rutter JD, Bethel CR, Galdadas I, Hujer AM, et al. Deciphering the Evolution of Cephalosporin Resistance to Ceftolozane-Tazobactam in

- Pseudomonas aeruginosa*. Jacoby GA, editor. mBio. 21 de diciembre de 2018;9(6):e02085-18.
143. Vázquez-Ucha JC, Arca-Suárez J, Bou G, Beceiro A. New Carbapenemase Inhibitors: Clearing the Way for the β -Lactams. *Int J Mol Sci*. 6 de diciembre de 2020;21(23):9308.
144. Fraile-Ribot PA, Mulet X, Cabot G, Del Barrio-Tofiño E, Juan C, Pérez JL, et al. *In Vivo* Emergence of Resistance to Novel Cephalosporin- β -Lactamase Inhibitor Combinations through the Duplication of Amino Acid D149 from OXA-2 β -Lactamase (OXA-539) in Sequence Type 235 *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. septiembre de 2017;61(9):e01117-17.
145. Hao M, Ma W, Dong X, Li X, Cheng F, Wang Y. Comparative genome analysis of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* JNQH-PA57, a clinically isolated mucoid strain with comprehensive carbapenem resistance mechanisms. *BMC Microbiol*. diciembre de 2021;21(1):133.
146. Salam MdA, Al-Amin MdY, Salam MT, Pawar JS, Akhter N, Rabaan AA, et al. Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare*. 5 de julio de 2023;11(13):1946.
147. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. febrero de 2022;399(10325):629-55.
148. Global Health Security Agenda (GHSA). 2019 [Internet]. Global Health Security Agenda (GHSA). [citado 16 de marzo de 2025]. Disponible en: <http://www.ghsagenda.org/about>
149. Ruiz-Garbajosa P, Cantón R. Epidemiology of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Implications for empiric and definitive therapy. *Rev Espanola Quimioter Publicacion Of Soc Espanola Quimioter*. septiembre de 2017;30 Suppl 1:8-12.
150. Xiao S, Liang X, Han L, Zhao S. Incidence, antimicrobial resistance and mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections among hospitalized patients in China: a retrospective observational multicenter cohort study from 2017 to 2021. *Front Public Health*. 5 de enero de 2024;11:1294141.
151. Cabrera R, Fernández-Barat L, Vázquez N, Alcaraz-Serrano V, Bueno-Freire L, Amaro R, et al. Resistance mechanisms and molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with bronchiectasis. *J Antimicrob Chemother*. 29 de mayo de 2022;77(6):1600-10.
152. McEwen SA, Collignon PJ. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. Aarestrup FM, Schwarz S, Shen J, Cavaco L, editores. *Microbiol Spectr*. 6 de abril de 2018;6(2):6.2.10.
153. Wood SJ, Kuzel TM, Shafikhani SH. *Pseudomonas aeruginosa*: Infections, Animal Modeling, and Therapeutics. *Cells*. 3 de enero de 2023;12(1):199.

154. Glick BR. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*. 2012;2012:963401.
155. Timofeeva AM, Galyamova MR, Sedykh SE. Plant Growth-Promoting Soil Bacteria: Nitrogen Fixation, Phosphate Solubilization, Siderophore Production, and Other Biological Activities. *Plants Basel Switz*. 5 de diciembre de 2023;12(24):4074.
156. Aslam B, Khurshid M, Arshad MI, Muzammil S, Rasool M, Yasmeeen N, et al. Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:771510.
157. García-Rivera C, Molina-Pardines C, Haro-Moreno JM, Parra Grande M, Rodríguez JC, López-Pérez M. Genomic Analysis of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from a «One Health» Perspective. *Microorganisms*. 27 de agosto de 2024;12(9):1770.
158. What Is One Health? [Internet]. OneHealth Commission. [citado 16 de marzo de 2025]. Disponible en: https://www.onehealthcommission.org/en/why_one_health/what_is_one_health/
159. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 14.0. 2024. [Internet]. [citado 25 de marzo de 2025]. Disponible en: <http://www.eucast.org>
160. Bianco G, Boattini M, Comini S, Gaibani P, Cavallo R, Costa C. Performance evaluation of Bruker UMIC® microdilution panel and disc diffusion to determine cefiderocol susceptibility in Enterobacterales, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* and *Burkholderia species*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. marzo de 2024;43(3):559-66.
161. Winsor GL, Lam DKW, Fleming L, Lo R, Whiteside MD, Yu NY, et al. Pseudomonas Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for Pseudomonas genomes. *Nucleic Acids Res*. 1 de enero de 2011;39(Database):D596-600.
162. Hyatt D, Chen GL, LoCascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*. diciembre de 2010;11(1):119.
163. Buchfink B, Xie C, Huson DH. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat Methods*. enero de 2015;12(1):59-60.
164. Tatusov RL. The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res*. 1 de enero de 2001;29(1):22-8.
165. Haft DH. TIGRFAMs: a protein family resource for the functional identification of proteins. *Nucleic Acids Res*. 1 de enero de 2001;29(1):41-3.
166. Eddy SR. Accelerated Profile HMM Searches. Pearson WR, editor. *PLoS Comput Biol*. 20 de octubre de 2011;7(10):e1002195.

167. Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat Commun.* 30 de noviembre de 2018;9(1):5114.
168. Olm MR, Brown CT, Brooks B, Banfield JF. dRep: a tool for fast and accurate genomic comparisons that enables improved genome recovery from metagenomes through de-replication. *ISME J.* 1 de diciembre de 2017;11(12):2864-8.
169. Segata N, Börnigen D, Morgan XC, Huttenhower C. PhyloPhlAn is a new method for improved phylogenetic and taxonomic placement of microbes. *Nat Commun.* 14 de agosto de 2013;4(1):2304.
170. Nguyen LT, Schmidt HA, Von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol Biol Evol.* enero de 2015;32(1):268-74.
171. Hoang DT, Chernomor O, Von Haeseler A, Minh BQ, Vinh LS. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Mol Biol Evol.* 1 de febrero de 2018;35(2):518-22.
172. Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* 8 de julio de 2016;44(W1):W242-5.
173. Gautreau G, Bazin A, Gachet M, Planel R, Burlot L, Dubois M, et al. PPanGGOLiN: Depicting microbial diversity via a partitioned pangenome graph. Ouzounis CA, editor. *PLOS Comput Biol.* 19 de marzo de 2020;16(3):e1007732.
174. Overbeek R. The Subsystems Approach to Genome Annotation and its Use in the Project to Annotate 1000 Genomes. *Nucleic Acids Res.* 25 de septiembre de 2005;33(17):5691-702.
175. Doster E, Lakin SM, Dean CJ, Wolfe C, Young JG, Boucher C, et al. MEGARes 2.0: a database for classification of antimicrobial drug, biocide and metal resistance determinants in metagenomic sequence data. *Nucleic Acids Res.* 8 de enero de 2020;48(D1):D561-9.
176. Liu B, Zheng D, Zhou S, Chen L, Yang J. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res.* 7 de enero de 2022;50(D1):D912-7.
177. Zhu Q, Gao S, Xiao B, He Z, Hu S. Plasmer: an Accurate and Sensitive Bacterial Plasmid Prediction Tool Based on Machine Learning of Shared k-mers and Genomic Features. Yin Y, editor. *Microbiol Spectr.* 15 de junio de 2023;11(3):e04645-22.
178. Kieft K, Zhou Z, Anantharaman K. VIBRANT: automated recovery, annotation and curation of microbial viruses, and evaluation of viral community function from genomic sequences. *Microbiome.* diciembre de 2020;8(1):90.
179. Fernández-Ruiz I, Coutinho FH, Rodríguez-Valera F. Thousands of Novel Endolysins Discovered in Uncultured Phage Genomes. *Front Microbiol.* 18 de mayo de 2018;9:1033.

180. Ruiz-Azcona L, Santibañez M, Gimeno A, Roig FJ, Vanaclocha H, Ventero MP, et al. Etiology of bloodstream infections at a population level during 2013-2017 in the Autonomous Community of Valencia, Spain. *Rev Esp Quimioter.* 29 de abril de 2020;33(3):200-6.
181. Stokes W, Pitout J, Campbell L, Church D, Gregson D. Rapid detection of carbapenemase-producing organisms directly from blood cultures positive for Gram-negative bacilli. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* febrero de 2021;40(2):381-4.
182. Fabre V, Carroll KC, Cosgrove SE. Blood Culture Utilization in the Hospital Setting: a Call for Diagnostic Stewardship. *J Clin Microbiol.* 16 de marzo de 2022;60(3):e0100521.
183. MacGowan A, Grier S, Stoddart M, Reynolds R, Rogers C, Pike K, et al. Impact of rapid microbial identification on clinical outcomes in bloodstream infection: the RAPIDO randomized trial. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* octubre de 2020;26(10):1347-54.
184. Rello J, Alonso-Tarrés C. Emerging Technologies for Microbiologic Diagnosis of Sepsis: The Rapid Determination of Resistance to Antimicrobial Agents Should Be the Key. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 5 de octubre de 2021;73(7):1173-5.
185. Merino E, Gimeno A, Alcalde M, Coy J, Boix V, Molina-Pardines C, et al. Impact of Sepsis Flow Chip, a novelty fast microbiology method, in the treatment of bacteremia caused by Gram-negative bacilli. *Rev Espanola Quimioter Publicacion Of Soc Espanola Quimioter.* junio de 2021;34(3):193-9.
186. Ingram PR, Barrett L, Raby E, Boan P, Weaire-Buchanan GA, Darragh H, et al. Laboratory and clinical impacts of an overnight laboratory service. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* febrero de 2021;40(2):353-9.
187. Giacobbe DR, Giani T, Bassetti M, Marchese A, Viscoli C, Rossolini GM. Rapid microbiological tests for bloodstream infections due to multidrug resistant Gram-negative bacteria: therapeutic implications. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* junio de 2020;26(6):713-22.
188. Kang CM, Chen XJ, Chih CC, Hsu CC, Chen PH, Lee TF, et al. Rapid identification of bloodstream bacterial and fungal pathogens and their antibiotic resistance determinants from positively flagged blood cultures using the BioFire FilmArray blood culture identification panel. *J Microbiol Immunol Infect Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi.* diciembre de 2020;53(6):882-91.
189. De Angelis G, Grossi A, Menchinelli G, Boccia S, Sanguinetti M, Posteraro B. Rapid molecular tests for detection of antimicrobial resistance determinants in Gram-negative organisms from positive blood cultures: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* marzo de 2020;26(3):271-80.
190. Berinson B, Both A, Berneking L, Christner M, Lütgehetmann M, Aepfelbacher M, et al. Usefulness of BioFire FilmArray BCID2 for Blood Culture Processing in Clinical Practice. *J Clin Microbiol.* 19 de julio de 2021;59(8):e0054321.

191. Cosentino F, Viale P, Giannella M. MDR/XDR/PDR or DTR? Which definition best fits the resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa*? *Curr Opin Infect Dis*. 1 de diciembre de 2023;36(6):564-71.
192. Karakonstantis S, Rousaki M, Vassilopoulou L, Kritsotakis EI. Global prevalence of cefiderocol non-susceptibility in Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, and *Stenotrophomonas maltophilia*: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. febrero de 2024;30(2):178-88.
193. Mancuso G, De Gaetano S, Midiri A, Zummo S, Biondo C. The Challenge of Overcoming Antibiotic Resistance in Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria: «Attack on Titan». *Microorganisms*. 27 de julio de 2023;11(8):1912.
194. Tibbetts R, George S, Burwell R, Rajeev L, Rhodes PA, Singh P, et al. Performance of the Reveal Rapid Antibiotic Susceptibility Testing System on Gram-Negative Blood Cultures at a Large Urban Hospital. *J Clin Microbiol*. 15 de junio de 2022;60(6):e0009822.
195. Andrews SR, Timbrook TT, Fisher MA, Tritle BJ. Comparative analysis of a rapid diagnostic test and scoring tools for ESBL detection in Enterobacterales bloodstream infections for optimizing antimicrobial therapy. *Microbiol Spectr*. 11 de enero de 2024;12(1):e0313123.
196. Chang KM, Haghamaad A, Saunders-Hao P, Shaffer A, Mirsaidi N, Zimilover A, et al. The clinical impact of early detection of ESBL-producing Enterobacterales with PCR-based blood culture assays. *Am J Infect Control*. enero de 2024;52(1):73-80.
197. Choi SJ, Kim ES. Optimizing Treatment for Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Complex Infections: A Review of Current Evidence. *Infect Chemother*. junio de 2024;56(2):171-87.
198. Caméléna F, Péan de Ponfilly G, Pailhoriès H, Bonzon L, Alanio A, Poncin T, et al. Multicenter Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification 2 Panel for Pathogen Detection in Bloodstream Infections. *Microbiol Spectr*. 14 de febrero de 2023;11(1):e0254722.
199. Paluch M, Lleres-Vadeboin M, Poupet H, Chanard E, Wilhelm N, Nadji S, et al. Multicenter evaluation of rapid antimicrobial susceptibility testing by VITEK®2 directly from positive blood culture. *Diagn Microbiol Infect Dis*. julio de 2023;106(3):115950.
200. Maillard A, Delory T, Bernier J, Villa A, Chaibi K, Escaut L, et al. Effectiveness of third-generation cephalosporins or piperacillin compared with cefepime or carbapenems for severe infections caused by wild-type AmpC β -lactamase-producing Enterobacterales: A multi-centre retrospective propensity-weighted study. *Int J Antimicrob Agents*. julio de 2023;62(1):106809.
201. Mohayya SM, Arsalan M, Narayanan N, Patel P, Hong CG, Kirn TJ, et al. Impact of phenotypic rapid diagnostic assay on duration of empiric antibiotics for gram-negative bacteremia. *Antimicrob Steward Healthc Epidemiol ASHE*. 2023;3(1):e22.

202. Karruli A, Catalini C, D'Amore C, Foglia F, Mari F, Harxhi A, et al. Evidence-Based Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: A Critical Reappraisal. *Antibiot Basel Switz.* 16 de febrero de 2023;12(2):399.
203. Kahlmeter G, Howe R, Wootton M. External quality assessment-bringing difficulty, complexity and severity of errors to bear on the assessment of performance in antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* 1 de febrero de 2023;78(2):321-2.
204. Lee CH, Yang CY, Hsieh CC, Hong MY, Lee CC. Differential impacts of inappropriate empirical therapy on ED patients with *Staphylococcus aureus* and streptococci bacteremia. *Am J Emerg Med.* mayo de 2020;38(5):940-6.
205. Briggs N, Campbell S, Gupta S. Advances in rapid diagnostics for bloodstream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* enero de 2021;99(1):115219.
206. Pardo J, Klinker KP, Borgert SJ, Butler BM, Giglio PG, Rand KH. Clinical and economic impact of antimicrobial stewardship interventions with the FilmArray blood culture identification panel. *Diagn Microbiol Infect Dis.* febrero de 2016;84(2):159-64.
207. Avery LM, Nicolau DP. Investigational drugs for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Expert Opin Investig Drugs.* abril de 2018;27(4):325-38.
208. Cho JC, Crotty MP, White BP, Worley MV. What Is Old Is New Again: Delafloxacin, a Modern Fluoroquinolone. *Pharmacotherapy.* enero de 2018;38(1):108-21.
209. Poku E, Cooper K, Cantrell A, Harnan S, Sin MA, Zanzudana A, et al. Systematic review of time lag between antibiotic use and rise of resistant pathogens among hospitalized adults in Europe. *JAC-Antimicrob Resist.* febrero de 2023;5(1):dlad001.
210. Laffont-Lozes P, Larcher R, Salipante F, Leguelinel-Blache G, Dunyach-Remy C, Lavigne JP, et al. Usefulness of dynamic regression time series models for studying the relationship between antimicrobial consumption and bacterial antimicrobial resistance in hospitals: a systematic review. *Antimicrob Resist Infect Control.* 12 de septiembre de 2023;12(1):100.
211. Wang C, Yang D, Wang Y, Ni W. Cefiderocol for the Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria: A Systematic Review of Currently Available Evidence. *Front Pharmacol.* 2022;13:896971.
212. Domingues S, Lima T, Saavedra MJ, Da Silva GJ. An Overview of Cefiderocol's Therapeutic Potential and Underlying Resistance Mechanisms. *Life Basel Switz.* 21 de junio de 2023;13(7):1427.
213. Wicky PH, Poiraud J, Alves M, Patrier J, d'Humières C, Lê M, et al. Cefiderocol Treatment for Severe Infections due to Difficult-to-Treat-Resistant Non-Fermentative Gram-Negative Bacilli in ICU Patients: A Case Series and Narrative Literature Review. *Antibiot Basel Switz.* 1 de junio de 2023;12(6):991.

214. Dortet L, Niccolai C, Pfennigwerth N, Frisch S, Gonzalez C, Antonelli A, et al. Performance evaluation of the UMIC® Cefiderocol to determine MIC in Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 5 de julio de 2023;78(7):1672-6.
215. Devoos L, Biguenet A, Rousselot J, Bour M, Plésiat P, Fournier D, et al. Performance of discs, sensititre EUMDROXF microplates and MTS gradient strips for the determination of the susceptibility of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* to cefiderocol. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* mayo de 2023;29(5):652.e1-652.e8.
216. Matuschek E, Longshaw C, Takemura M, Yamano Y, Kahlmeter G. Cefiderocol: EUCAST criteria for disc diffusion and broth microdilution for antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother.* 29 de mayo de 2022;77(6):1662-9.
217. Danjean M, Hobson CA, Gits-Muselli M, Courroux C, Monjault A, Bonacorsi S, et al. Evaluation of the inoculum effect of new antibiotics against carbapenem-resistant enterobacterales. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* noviembre de 2022;28(11):1503.e1-1503.e3.
218. Hobson CA, Cointe A, Jacquier H, Choudhury A, Magnan M, Courroux C, et al. Cross-resistance to cefiderocol and ceftazidime-avibactam in KPC β -lactamase mutants and the inoculum effect. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* agosto de 2021;27(8):1172.e7-1172.e10.
219. Mimoz O, Elhelali N, Léotard S, Jacolot A, Laurent F, Samii K, et al. Treatment of experimental pneumonia in rats caused by a PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* julio de 1999;44(1):91-7.
220. Karakonstantis S, Rousaki M, Kritsotakis EI. Cefiderocol: Systematic Review of Mechanisms of Resistance, Heteroresistance and In Vivo Emergence of Resistance. *Antibiot Basel Switz.* 27 de mayo de 2022;11(6):723.
221. Fendian ÁM, Albanell-Fernández M, Tuset M, Pitart C, Castro P, Soy D, et al. Real-Life Data on the Effectiveness and Safety of Cefiderocol in Severely Infected Patients: A Case Series. *Infect Dis Ther.* abril de 2023;12(4):1205-16.
222. Jean SS, Gould IM, Lee WS, Hsueh PR, International Society of Antimicrobial Chemotherapy (ISAC). New Drugs for Multidrug-Resistant Gram-Negative Organisms: Time for Stewardship. *Drugs.* mayo de 2019;79(7):705-14.
223. van Veen A, Shahab SN, Rijfkogel A, Voor In 't Holt AF, Klaassen CHW, Vos MC, et al. Sources and Transmission Routes of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Study Design and Methodology of the SAMPAN Study. *Antibiot Basel Switz.* 15 de enero de 2025;14(1):94.
224. Elfadadny A, Ragab RF, AlHarbi M, Badshah F, Ibáñez-Arancibia E, Farag A, et al. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: navigating clinical impacts, current resistance trends, and innovations in breaking therapies. *Front Microbiol.* 2024;15:1374466.

225. de Sousa T, Machado S, Caniça M, Ramos MJN, Santos D, Ribeiro M, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: One Health approach to deciphering hidden relationships in Northern Portugal. *J Appl Microbiol*. 3 de febrero de 2025;136(2):lxaf037.
226. Koujalagi T, Ruhali R. Mitigating Health Risks Through Environmental Tracking of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Microbiol*. 24 de diciembre de 2024;82(1):57.
227. Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, Davenport CF, Tümmler B. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front Microbiol*. 2011;2:150.
228. Ozer EA, Allen JP, Hauser AR. Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools Spine and AGEnt. *BMC Genomics*. 29 de agosto de 2014;15(1):737.
229. Mathee K, Narasimhan G, Valdes C, Qiu X, Matewish JM, Koehrsen M, et al. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 de febrero de 2008;105(8):3100-5.
230. Petit RA, Read TD. *Staphylococcus aureus* viewed from the perspective of 40,000+ genomes. *PeerJ*. 2018;6:e5261.
231. Tobin LA, Jarocki VM, Kenyon J, Drigo B, Donner E, Djordjevic SP, et al. Genomic analysis of diverse environmental Acinetobacter isolates identifies plasmids, antibiotic resistance genes, and capsular polysaccharides shared with clinical strains. *Appl Environ Microbiol*. 21 de febrero de 2024;90(2):e0165423.
232. Pal C, Bengtsson-Palme J, Rensing C, Kristiansson E, Larsson DGJ. BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. *Nucleic Acids Res*. enero de 2014;42(Database issue):D737-743.
233. Valls M, de Lorenzo V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol Rev*. noviembre de 2002;26(4):327-38.
234. Seiler C, Berendonk TU. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front Microbiol*. 2012;3:399.
235. Kos VN, Déraspe M, McLaughlin RE, Whiteaker JD, Roy PH, Alm RA, et al. The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. enero de 2015;59(1):427-36.
236. Loot C, Nivina A, Cury J, Escudero JA, Ducos-Galand M, Bikard D, et al. Differences in Integron Cassette Excision Dynamics Shape a Trade-Off between Evolvability and Genetic Capacitance. *mBio*. 28 de marzo de 2017;8(2):e02296-16.
237. Murray E, Draper LA, Ross RP, Hill C. The Advantages and Challenges of Using Endolysins in a Clinical Setting. *Viruses*. 15 de abril de 2021;13(4):680.
238. Muchaamba F, Stephan R. A Comprehensive Methodology for Microbial Strain Typing Using Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Methods Protoc*. 11 de junio de 2024;7(3):48.

239. Cao L, Yang H, Huang Z, Lu C, Chen F, Zhang J, et al. Direct prediction of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by metagenomic next-generation sequencing. *Front Microbiol.* 2024;15:1413434.
240. Arnold A, McLellan S, Stokes JM. How AI can help us beat AMR. *Npj Antimicrob Resist.* 13 de marzo de 2025;3(1):18.
241. Olatunji I, Bardaji DKR, Miranda RR, Savka MA, Hudson AO. Artificial intelligence tools for the identification of antibiotic resistance genes. *Front Microbiol.* 2024;15:1437602.





9. ANEXOS



Original Article

Concordance of the filmarray blood culture identification panel 2 and classical microbiological methods in a bacteremia diagnostic unit

Celia García-Rivera^{a,*,#}, Mónica Parra-Grande^{a,#}, Esperanza Merino^b, Vicente Boix^b, Juan C. Rodríguez^a^a Microbiology Department, Hospital General Universitario Dr. Balmis, Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL), Alicante, Spain^b Infectious Diseases Department, Hospital General Universitario Dr. Balmis, Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL), Alicante, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 April 2022

Revised in revised form 20 July 2022

Accepted 6 August 2022

Available online 10 August 2022

Keywords:

Bacteremia

Blood culture

Rapid diagnostic

Resistance mechanisms

Fungemia

ABSTRACT

Our study evaluates the effectiveness of the FilmArray Blood Culture Identification Panel 2 in a rapid bacteremia diagnostic system, using bacteriological culture as a reference. A total of 2042 positive blood cultures were analyzed, the FilmArray was performed for 175. Concordance was higher in monomicrobial bacteremia (95%) than in polymicrobial bacteremia's (72.2%). For detecting bacterial resistance mechanisms, concordance was very high (100% for Gram-positive bacteria and 98.12% for Gram-negative). This methodology provides significant improvements in response time and is especially useful for the detection of monomicrobial bacteremia.

© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Rapid diagnostic of bacteremia and fungemia is one of the priorities in clinical microbiology given their high morbidity/mortality and poor prognostic due to the delay in optimal therapy. In recent years, intensive efforts have been made to reduce the response time by introducing rapid techniques, optimizing the pre-analytical and post-analytical processes and the constitution of Antibiotic Stewardship Programs [1].

On the other hand, the increase in multi-resistant bacteria makes empirical treatment difficult and can lead antibiotic overuse, which, in addition to the consequences for the patient, has negative repercussions for the community, contributing to the selection of resistant bacteria; this phenomenon is particularly serious in critical care units [2].

Despite major advances in recent years, rapid microbiological techniques still have limitations in the diagnostic of bacteremia. Microbial proteome study by MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry) is a fast process, but it is unable to identify mixed infections and has limitations if the process is associated with Gram-positive bacteria or yeasts [3]. In contrast, other systems that provide microorganism antibiotic sensitivity data

show results after several hours of processing (Alfred Health/Accelerate Pheno™ system) [4].

In this study, we evaluated the effectiveness of the BioFire FilmArray Blood Culture ID Panel 2 (BCID2) system for rapid diagnostic of bacteremia in routine clinical practice in a tertiary hospital using bacteriological culture as the reference technique.

2. Material and methods

Former research conducted at the Hospital General Universitario de Alicante Dr Balmis. Results of positive blood cultures from September 8, 2020 to June 6, 2021 were analyzed.

For the diagnostic of bacteremia, we used the BD BACTEC system, designed for the rapid detection of bacteria and fungi in blood according to the protocols established by the manufacturer. In case of a positive blood culture, our work protocol was initiated (Table 1). Research of antibiotic sensitivity was performed using the Beckman Coulter MicroScan WalAway 96 plus system, confirming the main resistance mechanisms by genotypic methods (GeneXpert®, cepheid).

Within 1 hour, the tested system detects the genome of Gram-positive bacteria (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*), Gram-negative bacteria (*Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex, *Bacteroides fragilis*, *Enterobacter cloacae*

* Corresponding author. Tel.: 651969310

E-mail address: garcia_celriv@gva.es (C. García-Rivera).

These authors equally contributed to the manuscript and share the first authorship.

Table 1
Working protocol for positive blood cultures in our hospital.

WORKING TIME PROTOCOL	
STAPHYLOCOCCUS	1/2 INTAKES Identification → by MALDI-TOF. Antibiogram and GeneXpert <i>Staphylococcus aureus</i> on request of the clinician. 2/2 INTAKES (Before 24h) GeneXpert → <i>Staphylococcus aureus</i> . Yes: -Positive: Add antibiogram -Negative: Proceed to identification by MALDI-TOF and antibiogram if applicable to both extractions. 2/2 INTAKES (After 24h) Identification → by MALDI-TOF and antibiogram if applicable in both extractions.
STREPTOCOCCUS BGN	FILMARRAY MALDI-TOF Bottle <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Proteus spp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
BGP	1/2 INTAKES Identification → by MALDI-TOF. Assessment of clinical significance 2/2 INTAKES Identification → by MALDI-TOF and antibiogram. In case of suspicion of <i>Listeria spp.</i> FILMARRAY →
YEAST MIXED	FILMARRAY FILMARRAY
WORKING PROTOCOL FOR ON-CALL DUTY	
STAPHYLOCOCCUS	1/2 INTAKES SUBCULTURES ARE → WORKED ON THE FOLLOWING DAY GeneXpert <i>Staphylococcus aureus</i> on request of the clinician. 2/2 INTAKES (Before 24h) GeneXpert → <i>Staphylococcus aureus</i> 2/2 INTAKES (After 24h) Perform → antibiograms on both extractions. GeneXpert <i>Staphylococcus aureus</i> on request of the clinician.
STREPTOCOCCUS BGN BGP	FILMARRAY FILMARRAY SUBCULTURES ARE WORKED ON THE FOLLOWING DAY. In case of suspicion of <i>Listeria spp.</i> FILMARRAY →
YEAST MIXED	FILMARRAY FILMARRAY

complex, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* group, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Serratia marcescens*, *Hemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and yeasts (*Candida albicans*, *Candida auris*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida para psilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans/gatti*). It also detects the main resistance genes of both gram-negative bacteria (*CTX-M*, *IMP*, *KPC*, *NDM*, *OXA-48-like*, *VIM*, *MRC-1*) and gram-positive bacteria (*MEC A/C SA*, *MEC A/C SCN*, *VanA/B*). This technique was incorporated into our work protocol to improve the rapid diagnostic of polymicrobial bacteremia's, due to Gram-positive *Streptococcus-type* bacteria, fungemia's and the diagnostic of bacteremia's during on-call hours when MALDI-TOF MS is not available.

3. Results

The total number of positive blood cultures processed during the studied period was 2042. All blood cultures in which microorganisms from normal skin or mucosal flora (coagulase-negative *Staphylococcus*, *Streptococcus viridans*, *Lactobacillus spp.*, *Bacillus spp.*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium spp.* and *Propionibacterium spp.*), isolated in a single blood culture, were discarded. A total of 1336 possible significant bacteremia's were analyzed. For which 175 BCID2 panels were performed, 121 were monomicrobial bacteremia's and 54 were polymicrobial.

Concordance with bacteriological culture was higher in monomicrobial bacteremia (95%), with all discrepancies explained by the pathogen not being detectable by the BCID2 panel. Concordance in polymicrobial bacteremia's (72.2%) was lower; the main cause of discrepancies was the detection of microorganisms that were not isolated in the culture and to a lesser extent, as in the case of monomicrobial, the absence of the isolated microorganism in the BCID2 panel (Table 2).

Concordance percentage for bacterial resistance mechanisms was very high, being 100% for Gram-positive bacteria and 98.12% for Gram-negative bacteria (Table 3).

4. Discussion

The evaluated technique is very useful for the rapid diagnostic of bacteremia as a complement to common methods (MALDI-TOF, genetic methods for detecting resistance mechanisms and rapid antibiogram systems), since very reliable results can be obtained within 1 hour and using a minimal technical and personnel infrastructure, and thus very useful for clinical purposes; even rapid and correct results are obtained in the identification of aetiologies that have classically presented diagnostic difficulties, such as streptococcal infections, yeast infections and polymicrobial infections. It should be highlighted its excellent use in detecting carbapenems, which are enzymes of a great clinical and epidemiological interest [5,6].

This system includes a panel of microorganisms that covers most of the bacteremia-associated pathogens; thus, Gram-negative bacilli are the most frequently implicated group, with *Escherichia coli* being the most frequent micro-organism, followed by *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas spp.* [7]. Although there may be geographical differences or differences associated to the particular traits of each center, the information provided by the system will be sufficient for diagnostic in most situations [8], in addition, this system is capable of detecting most clinically important antibiotic resistance mechanisms, which enhances its usefulness, since it has been reported that early identification of the bacterial species by itself does not reduce mortality [9,10], antibiotic susceptibility testing is required. MALDI-TOF identification allows to reduce combined antibiotic treatment, but only a rapid system that reports the main mechanisms of bacterial resistance allows to optimize antibiotic treatment and reduce the carbapenems use [11].

The cost of the technique is negligible compared to the health care cost of each bacteremia, a process that is the second leading cause of hospital mortality and the most expensive condition to manage in U. S. hospitals. However, to achieve the efficiency of the process, it is essential to standardize its use and ensure that the diagnosis process includes the participation of the stewardship groups so that the results provided by the system can be applied immediately and so that a rational use of antimicrobials and a rapid and correct treatment

Table 2

Concordance of the Filmarray™BCID2 panel with bacteriological culture in the diagnostic of the aetiology of bacteraemias.

MONOMICROBIAL BACTERIEMIA'S (N = 121)		
Concordance	95 % (N = 115)	
Of the total % of matches belong to the group:		
<i>Enterobacteriaceae</i>	N = 44	
<i>Streptococcus/Enterococcus</i>	N = 42	
Yeast	N = 14	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	N = 8	
<i>Staphylococcus</i>	N = 4	
Negative	N = 3	
DISCREPANCY	5% (N = 6)	
OF TOTAL DISCREPANCIES		
1)	Micro-organism not included	100%
	<i>Moraxella spp</i>	33.3% (N = 2)
	<i>Gemella spp</i>	16.6% (N = 1)
	<i>Enterococcus avium</i>	16.6% (N = 1)
	<i>Acinetobacter spp</i>	16.6% (N = 1)
	<i>Prevotella spp</i>	16.6% (N = 1)
2)	FILMARRAY + / DOES NOT GROW IN CULTURE	0 %
3)	FILMARRAY - / GROWING IN CULTIVATION	0 %
POLYMICROBIAL BACTERIEMIAS (N = 97)		
CONCORDANCE	72.2 % (N = 82)	
OF THE TOTAL % OF MATCHES BELONG TO THE GROUP:		
<i>Streptococcus/Enterococcus</i>	N = 28	
<i>Staphylococcus</i>	N = 23	
<i>Enterobacteriaceae</i>	N = 20	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	N = 7	
<i>Bacteroides fragilis</i>	N = 3	
Yeast	N = 1	
DISCREPANCY	27.8 % (N = 15)	
OF TOTAL DISCREPANCIES		
1)	Micro-organism not included	13.33%
	<i>Cytrobacter freundii</i>	50% (N = 1)
	<i>Enterococcus durans</i>	50% (N = 1)
2)	FILMARRAY + / DOES NOT GROW IN CULTURE	73.33%
	<i>Enterobacter cloacae</i>	9.1% (N = 1)
	<i>Staphylococcus spp</i>	45.4% (N = 5)
	<i>Streptococcus spp</i>	9.1% (N = 1)
	<i>Candida glabrata</i>	9.1% (N = 1)
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	9.1% (N = 1)
	<i>Bacteroides fragilis</i>	18.2% (N = 2)
3)	FILMARRAY - / GROWING IN CULTIVATION	13.33%

Table 3

Agreement of the Filmarray™BCID2 panel with the usual phenotypic and genotypic methods in the research of antibiotic activity.

Resistance mechanisms		
BGN (N = 94)		
CONCORDANCE	98.12%	
DISCREPANCY	1.88%	
OF TOTAL DISCREPANCIES		
1)	DOES NOT DETECT FILMARRAY / DETECTS CULTIVATION	100%
	<i>Pseudomonas carbapenem resistant</i>	50%
	<i>Escherichia coli resistant to 3rd generation cephalosporins.</i>	50%
CGP (N = 105)		
CONCORDANCE	100 %	
DISCREPANCY	0 % (N = 0)	

BGN = gram-negative bacillus; CGP = gram-positive cocci.

of the patient can be achieved at the lowest cost for the health care system [12,13].

This technology, as a complement to the usual methods, allows the implementation of a 24/7 laboratory service with minimal infrastructure as it is an automated technique and very easy to perform with the ability to export the data to the center's computer system, which minimizes post-analytical errors. This continuous timetable of the Microbiology Laboratory has demonstrated its usefulness in reducing the rates of ineffective empirical therapies. However, each center should evaluate the techniques to be developed according to its characteristics, highlighting the importance of assessing the local epidemiology of bacterial resistance [14-16].

The good concordance of the technique with the classical methods of our research corroborates the previously published data, both at the level of etiology of the process and detection of resistance mechanisms. Despite its advantages, the technique has its limitations, mainly the inability to detect resistance to carbapenems in *Pseudomonas aeruginosa* by systems other than carbapenems production and in enterobacteria the inability to detect resistance to third generation cephalosporins by genetic systems other than CTX-M production; both deficiencies should be well known among clinicians responsible for managing treatment [17-19].

Declaration of competing interests

The authors declare that they have no conflict of interest in relation to this article.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.diagmicrobio.2022.115787.

References

- [1] Lamy B, Sundqvist M, Iidelevich EA. Bloodstream infections - Standard and progress in pathogen diagnostics. *Clin Microbiol Infect* 2020;26(2):142-50.
- [2] Timsit JF, Ruppé E, Barbier F, Tabah A, Bassetti M. Bloodstream infections in critically ill patients: an expert statement. *Intensive Care Med* 2020;46(2):266-84.
- [3] Rodríguez JC, Bratos MA, Merino E, Ezeleta C. Use of MALDI-TOF in the rapid diagnosis of sepsis. *Infectious Diseases Microbiol Clin* 2016;34 (Suppl 2):19-25.
- [4] Marschal M, Bachmaier J, Autenrieth I, Oberhettinger P, Willmann M, Peter S. Evaluation of the accelerate pheno system for fast identification and antimicrobial susceptibility testing from positive blood cultures in bloodstream infections caused by gram-negative pathogens. *J Clin Microbiol* 2017;55(7):2116-26. Epub 2017 Apr 26. PMID: 28446572; PMCID: PMC5483913. doi: 10.1128/JCM.00181-17.
- [5] Stokes W, Pitout J, Campbell L, Church D, Gregson D. Rapid detection of carbapenemase-producing organisms directly from blood cultures positive for Gram-negative bacilli. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2021;40(2):381-4.
- [6] Fabre V, Carroll KC, Cosgrove SE. Blood culture utilization in the hospital setting: a call for diagnostic stewardship. *J Clin Microbiol* 2022(3):e0100521. doi: 10.1128/JCM.01005-21.
- [7] Ruiz-Azcona L, Santibañez M, Gimeno A, Roig FJ, Vanaclocha H, Ventero MP, et al. Etiology of bloodstream infections at a population level during 2013-2017 in the Autonomous Community of Valencia, Spain. *Rev Esp Quimioter.* 2020;33(3):200-6.
- [8] Kern WV, Rieg S. Burden of bacterial bloodstream infection—a brief update on epidemiology and significance of multidrug-resistant pathogens. *Clin Microbiol Infect* 2020;26(2):151-7.
- [9] MacGowan A, Grier S, Stoddart M, Reynolds R, Rogers C, Pike K, et al. Impact of rapid microbial identification on clinical outcomes in bloodstream infection: the RAPIDO randomized trial. *Clin Microbiol Infect* 2020;26(10):1347-54.
- [10] Rello J, Alonso-Tarrés C. Emerging technologies for microbiologic diagnosis of sepsis: the rapid determination of resistance to antimicrobial agents should be the key. *Clin Infect Dis* 2021;73(7):1173-5.
- [11] Merino E, Gimeno A, Alcalde M, Coy J, Boix V, Molina-Pardines C, et al. Impact of sepsis flow chip, a novelty fast microbiology method, in the treatment of bacteremia caused by Gram-negative bacilli. *Rev Esp Quimioter* 2021;34(3):193-9.
- [12] Lee CH, Yang CY, Hsieh CC, Hong MY, Lee CC. Differential impacts of inappropriate empirical therapy on ED patients with *Staphylococcus aureus* and streptococci bacteremia. *Am J Emerg Med* 2020;38(5):940-6.
- [13] Briggs N, Campbell S, Gupta S. Advances in rapid diagnostics for bloodstream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2021;99(1):115219.
- [14] Ingram PR, Barrett L, Raby E, Boan P, Weaire-Buchanan GA, Darragh H, et al. Laboratory and clinical impacts of an overnight laboratory service. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2021;40(2):353-9.
- [15] Giacobbe DR, Giani T, Bassetti M, Marchese A, Viscoli C, Rossolini GM. Rapid microbiological tests for bloodstream infections due to multidrug resistant Gram-negative bacteria: therapeutic implications. *Clin Microbiol Infect* 2020;26(6):713-22.
- [16] Pardo J, Klinker KP, Borgert SJ, Butler BM, Giglio PG, Rand KH. Clinical and economic impact of antimicrobial stewardship interventions with the FilmArray blood culture identification panel. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016;84(2):159-64.
- [17] Kang CM, Chen XJ, Chih CC, Hsu CC, Chen PH, Lee TF, et al. Rapid identification of bloodstream bacterial and fungal pathogens and their antibiotic resistance determinants from positively flagged blood cultures using the BioFire FilmArray blood culture identification panel. *J Microbiol Immunol Infect* 2020;53(6):882-91.
- [18] De Angelis G, Grossi A, Menchinelli G, Boccia S, Sanguinetti M, Posteraro B. Rapid molecular tests for detection of antimicrobial resistance determinants in Gram-negative organisms from positive blood cultures: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 2020;26(3):271-80.
- [19] Berinson B, Both A, Berneking L, Christner M, Lütgehetmann M, Aepfelbacher M, et al. Usefulness of BioFire FilmArray BCID2 for blood culture processing in clinical practice. *J Clin Microbiol* 2021;59(8):e0054321. doi: 10.1128/JCM.00543-21.

Evaluation of the quickmic system in the rapid diagnosis of Gram-negative bacilli bacteremia

Celia García-Rivera,¹ Andrea Ricart-Silvestre,¹ Mónica Parra Grande,¹ María Paz Ventero,¹ Iryna Tyshkovska-Germak,¹ Antonia Sánchez-Bautista,¹ Esperanza Merino,^{2,3} Juan Carlos Rodríguez^{1,3}

AUTHOR AFFILIATIONS See affiliation list on p. 6.

ABSTRACT Rapid microbiological diagnosis of the antibiotic susceptibility of Gram-negative bacilli is a priority in clinical microbiology, especially in cases of bacteremia. The rapid advancement of antimicrobial resistance proposes a challenge for empirical antibiotic therapy and shows the need for fast antibiotic susceptibility diagnostics to guide treatments. The QuickMIC System (Gradientech AB, Uppsala, Sweden) is a recently developed rapid diagnostic tool for antibiotic susceptibility testing. Our study evaluates a rapid phenotypic system (QuickMIC) that provides information on the susceptibility of 12 antibiotics against *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus spp.*, *Citrobacter spp.*, and *Serratia marcescens*. A total of 816 antibiotic/microorganism combinations were tested, resulting in eight discrepancies. The concordance between the antibiotics offered by QuickMIC and reference methods (MicroScan WalkAway plus system, Beckman Coulter; Etest (BioMerieux microdilution system (Bruker); Real-time PCR (GeneXpert, Cepheid); and immunochromatography (Biotech) was 99.02%. Time elapsed to obtain a valid minimal inhibitory concentration (MIC) was between 2 and 4 h. The QuickMIC system allows for the early adjustment of antibiotic treatment in these infections. Given the existing limitations of currently available rapid methods, its clinical utility is particularly relevant in the management of *P. aeruginosa* infections and AmpC-producing Enterobacterales. The use of rapid methods can help diversify antibiotic use and reduce carbapenem consumption.

IMPORTANCE The rapid diagnosis of antibiotic sensitivity in Gram-negative bacilli is of paramount importance in clinical microbiology, particularly in cases of bacteremia. The escalating challenge of antimicrobial resistance underscores the need for expeditious antibiotic susceptibility diagnostics to guide empirical antibiotic therapy effectively. In light of this, we present our study that evaluates the QuickMIC System, a recently developed rapid diagnostic antibiogram. QuickMIC System, offers a novel approach to phenotypic testing, providing information on the activity of 12 antibiotics against key pathogens, including *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus spp.*, *Citrobacter spp.*, and *Serratia marcescens*. Our investigation involved testing a total of 816 antibiotic/microorganism combinations. The study demonstrated an impressive 99.02% concordance between the QuickMIC System and the reference methods, with only eight discrepancies observed. The time to actionable minimum inhibitory concentration (MIC) ranged between 2 and 4 h, highlighting the system's efficiency in providing rapid results.

KEYWORDS QuickMIC, rapid phenotypic system, antibiogram, Gram-negative bacilli, bacteremia

Editor Ana Cabrera, London Health Sciences Centre, London, Ontario, Canada

Address correspondence to Andrea Ricart-Silvestre, ricart_and@gva.es.

Celia García-Rivera and Andrea Ricart-Silvestre contributed equally to this article. Author order was determined on the basis of seniority.

The authors declare no conflict of interest.

Received 22 November 2023

Accepted 19 June 2024

Published 28 August 2024

Copyright © 2024 García-Rivera et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

The rapid diagnosis of bacteremia caused by Gram-negative bacilli (GNR) is one of the priorities in clinical microbiology due to its significant clinical impact on patients and the frequency of these infections. An overall mortality rate of 11% has been reported, with inadequate treatment being a significant risk factor (1, 2). When the condition is associated with multidrug-resistant microorganisms, mortality rates can reach up to 50% (3).

Delayed administration of appropriate antibiotic treatment in bacteremia is associated with more unfavorable clinical outcomes, making it crucial to act quickly and efficiently in these situations (4). Early identification of the antibiotic susceptibility of microorganisms can significantly influence clinical outcomes, underscoring the need for rapid phenotypic assays to guide appropriate treatment (5–7). For this reason, various methods are being developed to provide information on the antibiotic susceptibility of microorganisms, analyzing both genotypic and phenotypic traits. In general, results show that the application of these techniques within multidisciplinary teams allows for the rapid identification of microorganisms and their antibiotic susceptibility, facilitating early treatment (8, 9). This can improve patient survival, reduce hospital stays, and decrease healthcare costs. Additionally, it reduces the use of broad-spectrum drugs, minimizing the increase in antibiotic resistance for the benefit of the patient (10).

Escherichia coli is the most frequent etiological agent of bacteremia (11), particularly when associated with extended-spectrum beta-lactamase-producing strains. Although less common, bacteremias associated with *Pseudomonas aeruginosa* are notable for their severity and the challenges they present for treatment due to increasing resistance. Even when following international guidelines, selecting the appropriate treatment can be difficult (12). Bacteremias associated with *Klebsiella pneumoniae* have also been shown to cause a mortality rate of 34% within 90 days (13).

A pilot study was previously conducted by the developers of the QuickMIC System (Gradientech AB, Uppsala, Sweden), a new system for the phenotypic study of the resistance patterns of the main Gram-negative bacilli associated with bacteremia, using samples from a geographic area with a low incidence of multidrug resistance (14). This study demonstrated that the QuickMIC system can provide antibiotic susceptibility testing (AST) data very rapidly for up to 12 antibiotics and at least 10 different species of Gram-negative bacteria, with an average time of approximately 3 h. Therefore, in this work, we continue the evaluation of this new system for phenotypic study within the routine clinical practice of a hospital with a high incidence of multidrug-resistant bacteria and a multidisciplinary management team.

MATERIALS AND METHODS

Design

An observational study was designed to evaluate the performance of the QuickMIC System (Gradientech AB, Uppsala, Sweden) in clinical practice at the General University Hospital, Dr Balmis (Alicante, Spain); Inclusion criteria: Monomicrobial bacteremia caused by Gram-negative bacilli, for which the new system was validated. Exclusion criteria: Bacteremia caused by other pathogens and poly-microbial/bacteremia.

Samples

Eighty-six consecutive positive blood culture samples with Gram-negative bacilli bacteremia were collected from November 2022 to March 2023.

Evaluation system

This is the first evaluation of the QuickMIC System in real clinical practice, following a pilot study conducted at Gradientech AB, Uppsala, Sweden (14). QuickMIC is an ultra-fast antibiogram system that directly utilizes positive blood culture samples. QuickMIC uses microfluidics, real-time microscopy, and light-scatter growth quantification, to provide

bacterial susceptibility results within 2–4 h. The technology consists on the formation of a stable antibiotic gradient (in a three-dimensional agarose gel) covering a range of concentrations that increase linearly. Real-time imaging allows for monitorization of the bacterial growth rate and quantification of individual bacterial colonies, enabling a quick identification of the minimum inhibitory concentration (MIC).

The antibiotics analyzed in the current study using the QuickMIC GN cassette (cat. no: 43-001-10) included: amikacin, cefepime, ciprofloxacin, colistin, cefotaxime, ceftazidime/avibactam, ceftazidime, gentamicin, meropenem, piperacillin/tazobactam, tigecycline, and tobramycin.

The QuickMIC system is validated for the following microorganisms: *E. coli*, *Klebsiella* spp. (*K. pneumoniae*, *K. variicola*, *K. Oxytoca*, and *K. aerogenes*), *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus* spp. (*P. mirabilis* and *P. vulgaris*), *Citrobacter* spp. (*C. koserii* and *C. freundii*), and *Serratia marcescens*.

Working protocol: The system was integrated into our protocol for the microbiological diagnosis of Gram-negative bacilli bacteremia (Fig. 1A). The routine protocol consisted first on the identification of the microorganism using Maldi-Tof from a positive blood culture by performing a series of centrifugations to obtain the identification in approximately 30 min. Later, real-time PCR (GeneXpert, Cepheid) and immunochromatography (Biotech) systems were used for the rapid detection of the main resistance mechanisms (extended-spectrum beta-lactamases and carbapenemases). Finally, culture media were seeded and an antibiogram was performed using the MicroScan WalkAway plus system (Beckman Coulter). Borderline or anomalous susceptibility results were confirmed using the E-test (BioMerieux) or a microdilution system (Bruker), especially for colistin susceptibility. The antibiotic susceptibility profile was obtained 24 h after the blood culture tested positive.

The new method was incorporated into the routine antibiotic susceptibility study protocol for evaluation. The new system provided antibiogram results within 2–4 h, compared to 24 h for the MicroScan WalkAway plus system. Figure 1B illustrates protocol modifications based on the type of microorganism obtained in the blood culture and situations where the new system can be utilized.

Antibiotic resistance pattern: With the data obtained on the antibiotic susceptibility of the microorganisms included in the study, the antibiotic resistance pattern was calculated using the EUCAST 2023 criteria for the susceptible or resistant category.

Data analysis

A categorical agreement between QuickMIC and Microscan is presented. Results are classified based on the type of discrepancy, categorized as very major, major, or minor discrepancy. A very major discrepancy was defined as the new method reporting susceptible when the antibiotic was resistant. Conversely, a major discrepancy was identified when the new method classified the antibiotic as resistant despite it being susceptible. Minor discrepancies were considered when susceptible or resistant categories were reported as increased exposure (I) in the test system, or vice versa.

RESULTS

Out of 86 samples, 18 corresponded to bacteremias caused by Gram-negative bacilli not included in the panel and/or polymicrobial bacteremias. These samples, accounting for 20.9%, were excluded from the study. Among the remaining 68 samples, the distribution was as follows: *E. coli* ($n = 41$, 60.3%), *Klebsiella* spp. ($n = 14$, 20.5%), *Enterobacter* spp. ($n = 5$, 7.4%), *P. aeruginosa* ($n = 4$, 5.9%), *Citrobacter* spp. ($n = 2$, 2.9%), *Proteus* spp. ($n = 1$, 1.5%), and *Serratia marcescens* ($n = 1$, 1.5%). The detailed antibiotic resistance pattern found is presented in Table 1. A total of 816 antibiotic/microorganism combinations were tested (12 for each sample), revealing eight discrepancies. This yielded a concordance rate of 99.02% between antibiotics. Detailed results are provided in Table 2.

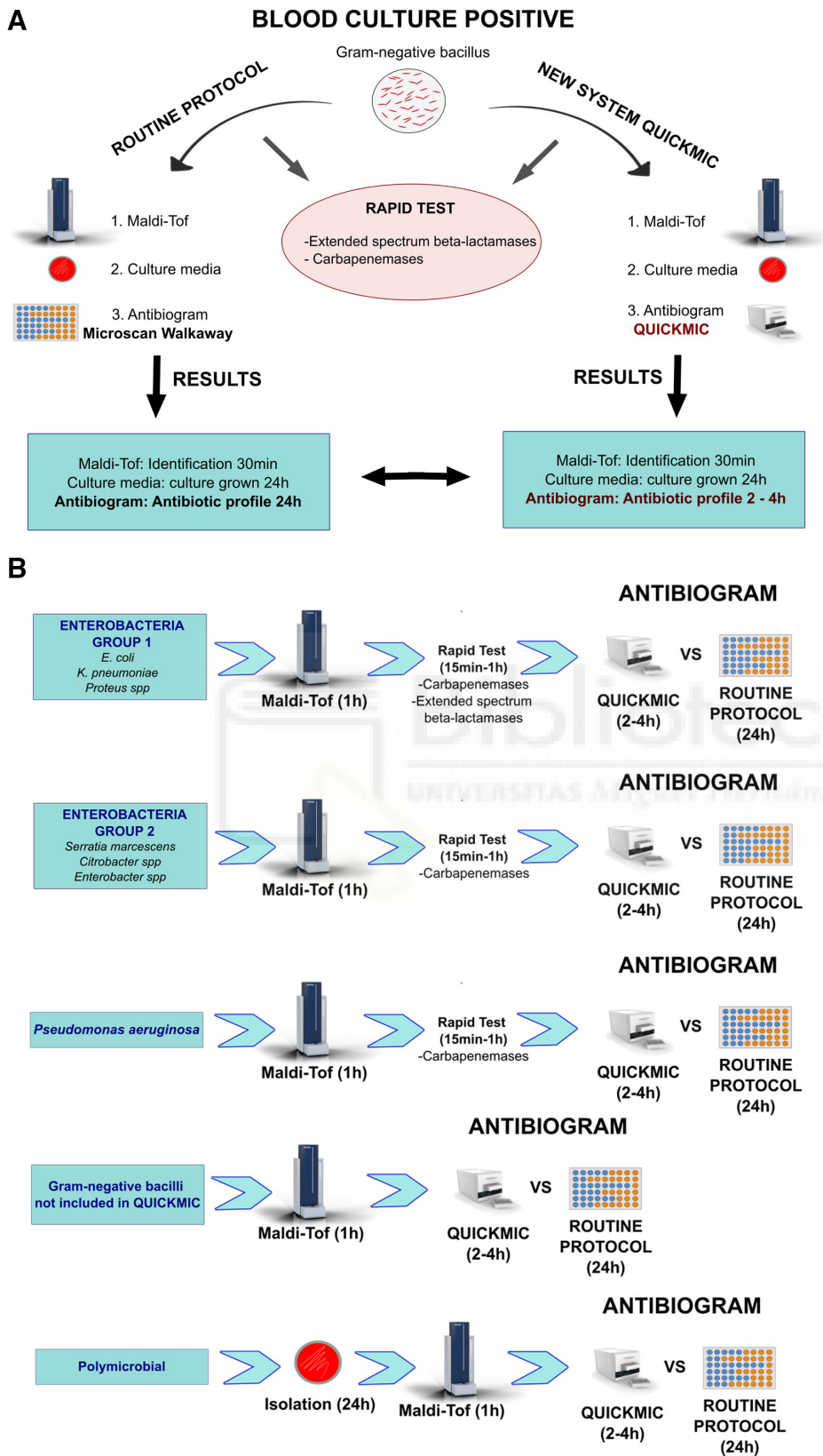


FIG 1 (A) Comparative scheme of the usual work protocol versus the new diagnostic method. (B) Comparative scheme of the time of each procedure according to the type of microorganism (both methods).

TABLE 1 Resistance rates of isolates against the antibiotics tested^a

Isolates, N = 61	Resistance rate (%)											
	AK	CE	CPF	CL	CFT	CFA	CTZ	GEN	ME	P/T	TIG	TO
<i>Escherichia coli</i> (41)	0	12.2	26.8	2,4	12.2	0	9.8	4.9	0	0	0	7.3
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (13)	0	7.7	7.7	7.7	15.4	0	15.4	7.1	0	15.4	-	7.7
<i>S. marcescens</i> (1)	100	0	100	100	0	0	0	0	0	0	-	0
<i>P. aeruginosa</i> (4)	0	75	25	0	-	0	50	-	25	50	-	25
<i>Proteus spp.</i> (1)	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	-	0
Isolates with inducible AmpC genes, N = 7	Resistance rate (%)											
	AK	CE	CPF	CL	CFT	CFA	CTZ	GEN	ME	P/T	TIG	TO
<i>Enterobacter cloacae complex</i> (5)	0	25	25	0	50	0	50	25	0	25	-	25
<i>Citrobacter spp.</i> (2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella aerogenes</i> (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^aAK: Amikacin, CE: cefepime, CPF: ciprofloxacin, CL: colistin, CFT: cefotaxime, CFA: ceftazidime/avibactam, CTZ: ceftazidime, GEN: gentamicin, ME: meropenem, P/T: piperacillin/tazobactam, TIG: tigecycline, TO: tobramycin. The EUCAST 2023 cutoff points were used to classify the microorganisms in the susceptible or resistant category to the different antibiotics.

DISCUSSION

The evaluated system excels in rapidly providing susceptibility data for multiple antibiotics against the primary pathogens associated with Gram-negative bacilli bacteremia. Compared to traditional systems, it demonstrates higher sensitivity and specificity, with a significantly shorter turnaround time (4–6 h vs 17–24 h). It is especially useful for the early detection of microorganisms included in the recently constituted “difficult-to-treat resistance” category, as they are not susceptible to all first-line antibiotics (carbapenems, β-lactam-β-lactamase inhibitor combinations, and fluoroquinolones). The phenotypic results of the antibiogram obtained by QuickMIC facilitate the rapid implementation of appropriate measures to control the spread of these strains in the hospital environment (15–17).

The new system is particularly relevant for analyzing antibiotic susceptibility in Gram-negative bacilli against first-line medications, where rapid protein or gene-based tests are lacking. Thus, the rapid detection of resistance mechanisms in *P. aeruginosa* is notably limited by these methods, both against piperacillin/tazobactam, ceftazidime, or cefepime and against carbapenems or the new cephalosporins (ceftazidime/avibactam or ceftolozane/tazobactam). There is no rapid method available to detect resistance to any of the drugs mentioned, except in the case of strains producing carbapenemase. Therefore, the newly evaluated system provides valuable clinical information that is not typically provided by systems commonly distributed to clinical microbiology laboratories. This fact is very relevant; as rapid microbiological diagnosis has been seen to improve the management of patients with carbapenem-resistant *P. aeruginosa* (18–20).

Weaknesses include the inability to analyze polymicrobial infections or infections caused by microorganisms not validated for the system, typical of genotypic systems. Overall, it has been reported that 49.3% (N = 102) of polymicrobial cultures were incompletely identified by the FilmArray result (21). As market trends shift toward rapid microbiological diagnostics, evaluating these systems becomes imperative, considering local resistance epidemiology, stewardship team presence, and laboratory capabilities.

TABLE 2 Discrepancies between the usual method and the new QuickMIC system^a

Isolates	Discrepancy											
	AK	CE	CPF	CL	CFT	CFA	CTZ	GEN	ME	P/T	TIG	TO
<i>Escherichia coli</i>	VMD (1)	VMD (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	VMD (1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	M (1)	-	VMD (1)	-	-	VMD (1)	-	-
<i>S. marcescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M (1)	-	-

^aVMD = Very major discrepancy, the isolate is resistant to the usual method and susceptible to the new method. M: major discrepancy, the isolate is susceptible to the usual method and resistant to the new method. AK: Amikacin, CE: cefepime, CPF: ciprofloxacin, CL: colistin, CFT: cefotaxime, CFA: ceftazidime/avibactam, CTZ: ceftazidime, GEN: gentamicin, ME: meropenem, P/T: piperacillin/tazobactam, TIG: tigecycline, TO: tobramycin.

These systems are especially beneficial in settings with high multidrug-resistant Gram-negative bacilli prevalence or serious infections in vulnerable patients (22–27).

In contrast, phenotypic studies of multiple antibiotics offer more comprehensive information compared to systems based on genotypic detection. This is due to the multitude of possible genetic variants, which increases the challenge of detecting less prevalent ones. For example, bacteria may produce extended-spectrum beta-lactamases other than CTX-M, or exhibit mechanisms of resistance to carbapenems unrelated to the production of the most prevalent carbapenemases. Additionally, some bacteria may be associated with hyperproduction of AmpC, affecting the analysis of beta-lactam drugs (28, 29). It is very difficult to detect the genetic mechanisms of resistance to other families of drugs, so phenotypic studies are much more important in this case (30, 31). In addition to the correct treatment of multidrug-resistant bacteria, information on antibiotics from multiple families allows to choose the antibiotic with the narrowest spectrum within a few hours (32). In fact, EUCAST has proposed a rapid phenotypic system for the analysis of positive blood cultures using antibiotic discs, but it is validated for a limited number of microorganisms and antibiotics; the Vitek system (Biomerieux) is also being evaluated, to shorten the response time in case of positive blood cultures, with good results (12, 33, 34).

It is imperative to emphasize the necessity for rapid and precise management of *P. aeruginosa* infections, given the limitations of current rapid diagnostic methods and the questioning of traditional treatment protocols for highly vulnerable patients, owing to the prevalence of multi-resistant strains (12). Furthermore, the introduction of the new system holds promise in reducing carbapenem usage by providing information on the activity of multiple antibiotics. This enables the selection of treatment tailored to the clinical situation, with a narrower spectrum and reduced ecological and microbiome impact (35).

In relation to the discrepancies found between the two systems, they are very few despite the use of different technologies, which demonstrates their high clinical concordance; it is known that the phenotypic analysis of antibiotic activity is greatly influenced by the genetic characteristics of microorganisms, variations in the inoculum preparation, and in the incubation time (36).

The system's ability to rapidly provide reliable information on 12 antibiotics will curb broad-spectrum antibiotic use, controlling antibiotic resistance while facilitating personalized patient treatment. However, this must be included in a protocol for the diagnosis of Gram-negative bacilli bacteremia, so that, following the criteria established by the diagnostic stewardship, the use of this technique is performed at the right time and on the right patient (37, 38, 39).

Conclusions

The system evaluated provides rapid information on the antibiotic activity of 12 antibiotics in the main Gram-negative bacilli associated with bacteremia, and can therefore, provide very useful information for the early adjustment of antibiotic treatment, for these processes. It is particularly useful in the management of *P. aeruginosa* infections, because in these processes, the available rapid methods present significant limitations.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded in part by Gradientech AB on a cost-per-sample basis. Reagents, instruments, and consumables were kindly provided by Gradientech AB.

AUTHOR AFFILIATIONS

¹Department of Microbiology, Dr. Balmis University General Hospital, Alicante Institute for Health and Biomedical Research (ISABIAL), Alicante, Spain

²Infectious Diseases Unit, Dr. Balmis University General Hospital, Alicante Institute for Health and Biomedical Research (ISABIAL), Alicante, Spain

³Miguel Hernandez University, Alicante, Spain

AUTHOR ORCIDs

Celia García-Rivera  <http://orcid.org/0000-0003-1701-2916>

Andrea Ricart-Silvestre  <http://orcid.org/0000-0002-1332-9505>




AUTHOR CONTRIBUTIONS

Celia García-Rivera, Formal analysis, Writing – original draft | Andrea Ricart-Silvestre, Formal analysis | Mónica Parra Grande, Supervision | María Paz Ventero, Methodology | Iryna Tyshkovska-Germak, Methodology | Antonia Sánchez-Bautista, Writing – review and editing | Esperanza Merino, Writing – review and editing | Juan Carlos Rodríguez, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review and editing

REFERENCES

- Alonso-Menchén D, Muñoz P, Sánchez-Carrillo C, Pérez-Latorre L, Bouza E. 2022. Unresolved issues in the epidemiology and diagnosis of bacteremia: an opinion paper. *Rev Esp Quimioter* 35:519–537. <https://doi.org/10.37201/req/066.2022>
- Van Heuverswyn J, Valik JK, Desirée van der Werff S, Hedberg P, Giske C, Nauclic P. 2023. Association between time to appropriate antimicrobial treatment and 30-day mortality in patients with bloodstream infections: a retrospective cohort study. *Clin Infect Dis* 76:469–478. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac727>
- Tsachouridou O, Pilalas D, Nanoudis S, Antoniou A, Bakaimi I, Chrysanthidis T, Markakis K, Kassomenaki A, Mantzana P, Protonotariou E, Skoura L, Metallidis S. 2023. Mortality due to multidrug-resistant Gram-negative bacteremia in an endemic region: no better than a toss of a coin. *Microorganisms* 11:1711. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071711>
- Ince D, Fiawoo S, Choudhury R, Cosgrove SE, Dobrzynski D, Gold H, Lee JH, Percival KM, Shulder S, Sony D, Spivak ES, Tamma PD, Nori P. 2023. Epidemiology of Gram-negative bloodstream infections in the United States: results from a cohort of 24 hospitals. *Open Forum Infect Dis* 10:ofad265. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofad265>
- Namikawa H, Imoto W, Yamada K, Tochino Y, Kaneko Y, Kakeya H, Shuto T. 2023. Predictors for onset of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*-induced bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J Hosp Infect* 142:88–95. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2023.09.017>
- Chumbita M, Puerta-Alcalde P, Yáñez L, Angeles Cuesta M, China A, Español-Morales I, Fernandez-Abellán P, Gudiol C, González-Sierra P, Rojas R, Sánchez-Pina JM, Vadillo IS, Sánchez M, Varela R, Vázquez L, Guerreiro M, Monzo P, Lopera C, Aiello TF, Peyrony O, Soriano A, Garcia-Vidal C. 2023. High rate of inappropriate antibiotics in patients with hematologic malignancies and *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia following international guideline recommendations. *Microbiol Spectr* 11:e0067423. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00674-23>
- Li D, Huang X, Rao H, Yu H, Long S, Li Y, Zhang J. 2023. *Klebsiella pneumoniae* bacteremia mortality: a systematic review and meta-analysis. *Front Cell Infect Microbiol* 13:1157010. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1157010>
- Peri AM, Harris PNA, Paterson DL. 2022. Culture-independent detection systems for bloodstream infection. *Clin Microbiol Infect* 28:195–201. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.09.039>
- Namikawa H, Imoto W, Yamada K, Tochino Y, Kaneko Y, Kakeya H, Shuto T. 2023. Predictors of mortality from extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae bacteremia. *Emerg Microbes Infect* 12:2217951. <https://doi.org/10.1080/22221751.2023.2217951>
- Fidalgo B, Morata L, Cardozo C, Del Río A, Morales J, Fernández-Pittol M, Martínez JA, Mensa J, Vila J, Soriano A, Casals-Pascual C. 2023. Information delay of significant bloodstream isolates and patient mortality: a retrospective analysis of 6225 adult patients with bloodstream infections. *Clin Infect Dis* 77:680–686. <https://doi.org/10.1093/cid/ciad243>
- Dunbar SA, Gardner C, Das S. 2022. Diagnosis and management of bloodstream infections with rapid, multiplexed molecular assays. *Front Cell Infect Microbiol* 12:859935. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.859935>
- Eisinger RW, Williams MP, Choe SH, Krofah E. 2023. A call to action—stopping antimicrobial resistance. *JAC Antimicrob Resist* 5:dlacl42. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlac142>
- Avershina E, Khezri A, Ahmad R. 2023. Clinical diagnostics of bacterial infections and their resistance to antibiotics—current state and whole genome sequencing implementation perspectives. *Antibiotics (Basel)* 12:781. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040781>
- Malmberg C, Torpner J, Fernberg J, Öhrn H, Ångström J, Johansson C, Tängdén T, Kreuger J. 2022. Evaluation of the speed, accuracy and precision of the QuickMIC rapid antibiotic susceptibility testing assay with Gram-negative bacteria in a clinical setting. *Front Cell Infect Microbiol* 12:758262. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.758262>
- Cosentino F, Viale P, Giannella M. 2023. MDR/XDR/PDR or DTR? Which definition best fits the resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa*? *Curr Opin Infect Dis* 36:564–571. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000966>
- Karakonstantis S, Rousaki M, Vassilopoulou L, Kritsotakis EI. 2024. Global prevalence of cefiderocol non-susceptibility in *Enterobacteriales*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, and *Stenotrophomonas maltophilia*: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 30:178–188. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.08.029>
- Mancuso G, De Gaetano S, Midiri A, Zummo S, Biondo C. 2023. The challenge of overcoming antibiotic resistance in carbapenem-resistant Gram-negative bacteria: “Attack on Titan.” *Microorganisms* 11:1912. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11081912>
- Büchler AC, Shahab SN, Severin JA, Vos MC, Voor In 't Holt AF. 2023. Outbreak investigations after identifying carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review. *Antimicrob Resist Infect Control* 12:28. <https://doi.org/10.1186/s13756-023-01223-1>
- Dettoni S, Fortunato F, Vena A, Giacobbe DR, Bassetti M. 2023. Severe infections caused by difficult-to-treat Gram-negative bacteria. *Curr Opin Crit Care* 29:438–445. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000001074>
- De La Villa S, Sánchez-Carrillo C, Sánchez-Martínez C, Cercenado E, Padilla B, Álvarez-Uría A, Aguilera-Alonso D, Bermejo E, Ramos R, Alcalá L, Marín M, Valerio M, Urbina L, Muñoz P. 2023. Clinical impact of TIME to results from the microbiology laboratory in bloodstream infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriales (TIME-CPE STUDY). *J Antimicrob Chemother* 78:1948–1954. <https://doi.org/10.1093/jac/dkad188>
- Maillard A, Delory T, Bernier J, Villa A, Chaibi K, Escout L, Contejean A, Bercot B, Robert J, El Alaoui F, Tankovic J, Poupet H, Cuzon G, Lafaurie M, Surgers L, Joseph A, Paccoud O, Molina J-M, Bleibtreu A, Treatment of

- AmpC-producing Enterobacterales Study Group. 2023. Effectiveness of third-generation cephalosporins or piperacillin compared with cefepime or carbapenems for severe infections caused by wild-type AmpC β -lactamase-producing Enterobacterales: a multi-centre retrospective propensity-weighted study. *Int J Antimicrob Agents* 62:106809. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2023.106809>
22. Herrmann J, Burgener-Gasser A-V, Goldenberger D, Roth J, Weisser M, Tamma PD, Tschudin-Sutter S. 2024. Cefepime versus carbapenems for treatment of AmpC beta-lactamase-producing Enterobacterales bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 43:213–221. <https://doi.org/10.1007/s10096-023-04715-5>
 23. Hoellinger B, Kaeuffer C, Boyer P, Lefebvre N, Hansmann Y, Robert A, Severac F, Gravet A, Danion F, Ruch Y, Ursenbach A. 2023. Cefepime vs carbapenems for treating third-generation cephalosporin-resistant AmpC β -lactamase-hyperproducing Enterobacterales bloodstream infections: a multicenter retrospective study. *Int J Infect Dis* 134:273–279. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.07.004>
 24. Bradford WS, Donnelley MA, Fine JR, Crabtree SJ. 2023. Blood culture identification (BCID) performance in polymicrobial bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 107:116086. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2023.116086>
 25. Holma T, Torvikoski J, Friberg N, Nevalainen A, Tarkka E, Antikainen J, Martelin JJ. 2022. Rapid molecular detection of pathogenic microorganisms and antimicrobial resistance markers in blood cultures: evaluation and utility of the next-generation FilmArray Blood Culture Identification 2 panel. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 41:363–371. <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04314-2>
 26. Anton-Vazquez V, Planche T. 2022. Gram-negative blood stream infections: prospects and challenges of rapid antimicrobial susceptibility testing. *Expert Rev Anti Infect Ther* 20:483–485. <https://doi.org/10.1080/14787210.2022.1999805>
 27. Mo Y. 2022. Rapid diagnostics for antibiotic resistance: urgent need for strong clinical evidence. *Clin Infect Dis* 75:2076–2078. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac358>
 28. Tibbetts R, George S, Burwell R, Rajeev L, Rhodes PA, Singh P, Samuel L. 2022. Performance of the reveal rapid antibiotic susceptibility testing system on Gram-negative blood cultures at a large urban hospital. *J Clin Microbiol* 60:e0009822. <https://doi.org/10.1128/jcm.00098-22>
 29. Andrews SR, Timbrook TT, Fisher MA, Tritle BJ. 2024. Comparative analysis of a rapid diagnostic test and scoring tools for ESBL detection in Enterobacterales bloodstream infections for optimizing antimicrobial therapy. *Microbiol Spectr* 12:e0313123. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03131-23>
 30. Chang K-M, Haghmad A, Saunders-Hao P, Shaffer A, Mirsaidi N, Zimilover A, Epstein M, Jain S, Streva V, Juretschko S, Demissie S, Gautam-Goyal P. 2024. The clinical impact of early detection of ESBL-producing Enterobacterales with PCR-based blood culture assays. *Am J Infect Control* 52:73–80. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2023.08.001>
 31. Lee CM, Kim Y-J, Jung S-I, Kim SE, Park WB, Choe PG, Kim ES, Kim C-J, Choi HJ, Lee S, Lee SH, Jung Y, Bang JH, Cheon S, Kwak YG, Kang YM, Park K-H, Song K-H, Kim HB, Korea Infectious Diseases (KIND) Study Group. 2022. Different clinical characteristics and impact of carbapenem-resistance on outcomes between *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: a prospective observational study. *Sci Rep* 12:8527. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12482-0>
 32. Cam el ena F, P ean de Ponfilly G, Pailhori es H, Bonzon L, Alanio A, Poncin T, Lafaurie M, D epret F, Cambau E, Godreuil S, Chenouard R, Le Monnier A, Jacquier H, Ber cot B. 2023. Multicenter evaluation of the FilmArray blood culture identification 2 panel for pathogen detection in bloodstream infections. *Microbiol Spectr* 11:e0254722. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02547-22>
 33. Garc a-Rivera C, Parra-Grande M, Merino E, Boix V, Rodr guez JC. 2022. Concordance of the filmarray blood culture identification panel 2 and classical microbiological methods in a bacteremia diagnostic unit. *Diagn Microbiol Infect Dis* 104:115787. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2022.115787>
 34. Cupaiolo R, Cherkaoui S, Serrano G, Dauby N, Georgala A, Blumental S, Maillart E, Hites M, Hallin M, Martiny D. 2022. Antimicrobial susceptibility testing determined by Alfred 60/AST (Alifax) in a multi-sites lab: performance's evaluation and optimization of workflow. *J Microbiol Methods* 194:106433. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106433>
 35. Paluch M, Lleres-Vadeboin M, Poupet H, Chanard E, Wilhelm N, Nadjji S, Prots L, Bala Y, Zambardi G, Cattoen C. 2023. Multicenter evaluation of rapid antimicrobial susceptibility testing by VITEK2 directly from positive blood culture. *Diagn Microbiol Infect Dis* 106:115950. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2023.115950>
 36. Ekw all-Larson A, Fr oding I, Mert B,  akerlund A,  zenci V. 2023. Analytical Performance and Potential Clinical Utility of EUCAST Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing in Blood Cultures after Four Hours of Incubation. *Microbiol Spectr* PMID:e0500122. <https://doi.org/10.1128/spectrum.05001-22>
 37. Mohayya SM, Arsalan M, Narayanan N, Patel P, Hong CG, Kirn TJ, Bhatt PJ, Bhowmick T. 2023. Impact of phenotypic rapid diagnostic assay on duration of empiric antibiotics for Gram-negative bacteremia. *Antimicrob Steward Healthc Epidemiol* 3:e22. <https://doi.org/10.1017/ash.2022.331>
 38. Karruli A, Catalini C, D'Amore C, Foglia F, Mari F, Harxhi A, Galdiero M, Durante-Mangoni E. 2023. Evidence-based treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections: a critical reappraisal. *Antibiotics (Basel)* 12:399. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020399>
 39. Kahlmeter G, Howe R, Wootton M. 2023. External quality assessment-bringing difficulty, complexity and severity of errors to bear on the assessment of performance in antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 78:321–322. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac431>

Celia García-Rivera¹ 
Marta Navarro³
Mónica Parra¹
Antonia Sánchez Bautista¹ 
Inmaculada Gómez²
María-Paz Ventero² 
Juan Carlos Rodríguez¹

Actividad *in vitro* de delafloxacino frente a aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos en una etapa previa al uso clínico de este fármaco

¹Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario Dr. Balmis, Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL), Alicante, España.

²Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL), Alicante, España.

³Facultad de ciencias de la Universidad de Alicante.

Article history

Received: 26 June 2023; Revision Requested: 18 October 2023; Revision Received: 25 October 2023; Accepted: 3 November 2023; Published: 22 December 2023

Estimado Editor:

El fenómeno de la resistencia antimicrobiana es un problema de salud pública de ámbito mundial, y en muchas infecciones nosocomiales producidas por *Pseudomonas aeruginosa* el manejo es especialmente difícil por el limitado arsenal terapéutico. Recientemente, se ha introducido un nuevo fármaco: delafloxacino; comercializado en España en febrero de 2023. Es un antibiótico de la familia de las fluoroquinolonas, pero con características fisicoquímicas diferenciales del resto de los fármacos de la familia; así, posee una estructura química aniónica y muestra igual actividad frente a dos dianas, la girasa y la topoisomerasa IV bacteriana mostrándose muy activa en medio ácido [1,2].

Debido a que este microorganismo presenta elevada tasa de resistencia las fluoroquinolonas clásicas [3,4] nuestro trabajo pretende evaluar la actividad *in vitro* de este nuevo fármaco antes de que se introduzca en la práctica clínica frente a una colección de aislados clínicos con presencia y ausencia de carbapenemasas con objeto de establecer la situación basal de la resistencia del fármaco en nuestro medio.

Un total de 109 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos fueron recogidas entre 2021 y 2022 (conservadas a -80°C) en pacientes del Hospital General Universitario Dr Balmis, Alicante; 54 aislados consecutivos productores de carbapenemasas tipo VIM y 55 aislados consecutivos sin presencia de carbapenemasas pero resistentes a carbapenémicos por otros mecanismos de resistencia.

Se empleó el sistema Walk Away (Beckman Coulter) para el perfil de resistencia frente a carbapenémicos y GeneXpert (Cepheid) y la inmunocromatografía NG-TEST/CARBA-5 (Bio-tech laboratorios) para la producción de carbapenemasas

Tabla 1	Perfil de sensibilidad de las 109 cepas de <i>P. aeruginosa</i> a las distintas fluoroquinolonas.		
Carbapenemasas	Resistente a ciprofloxacino/levofloxacino n=50		
	Sensible a delafloxacino	3 (6%)	
	Resistente a delafloxacino	47 (94%)	
	Presencia (n=54)	Sensible a ciprofloxacino/levofloxacino n=4	
		Sensible a delafloxacino	4 (100%)
		Resistente a delafloxacino	0
Ausencia (n=55)	Resistente a ciprofloxacino/levofloxacino n=35		
	Sensible a delafloxacino	12 (34,3%)	
	Resistente a delafloxacino	23 (65,7%)	
	Sensible a ciprofloxacino/levofloxacino n=20		
	Sensible a delafloxacino	20 (100%)	
Resistente a delafloxacino	0		

Se empleó el E-test BD (Biomerieux) para comparar la actividad de delafloxacino, ciprofloxacino y levofloxacino. Los antibiogramas se realizaron en placas con medio de Mueller Hinton E Agar (MHE) y la interpretación de los resultados se realizó con las normas del EUCAST 2023 [5] utilizando el punto de corte clínico del ciprofloxacino (resistente CMI>0,5mg/L) y levofloxacino (resistente CMI>2 mg/L) para *P. aeruginosa* y el punto de corte epidemiológico para delafloxacino (resistente CMI>2 mg/L).

La comparación del perfil de sensibilidad de delafloxacino en función de la presencia de carbapenemasas se realizó mediante la prueba de independencia Chi cuadrado y el Test de Fisher mediante el programa informático Rstudio.

Un total de 39 cepas fueron sensibles a delafloxacino (35,8%) y 24 a las otras fluoroquinolonas (ciprofloxacino y le-

Correspondencia:
María-Paz Ventero
Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL), Av. Pintor Baeza 12,
03010. Alicante, España.
E-mail: Maripazvm@gmail.com

Antibiótico	CMI ₅₀ (mg/L)	CMI ₉₀ (mg/L)	Rango (mg/L)
Ciprofloxacino	32	0,5	32-0,047
Levofloxacino	32	0,75	32-0,125
Delafloxacino	32	0,25	32-0,094

vofloxacino) (22,0%). Todas las cepas sensibles a las fluoroquinolonas clásicas fueron también sensibles a delafloxacino, en cambio, cepas resistentes a las fluoroquinolonas clásicas son sensibles a delafloxacino. En total 70 cepas fueron resistentes a todas las fluoroquinolonas (Tabla 1).

La actividad de delafloxacino es diferente en función de la presencia de carbapenemasa tipo VIM; así, en cepas productoras, delafloxacino es activo solo frente al 13% mientras que, en el grupo de cepas no productoras de este enzima, la actividad del fármaco es mayor (58,2%) ($p < 0.001$).

Al analizar las cepas sensibles a delafloxacino y resistentes a las otras fluoroquinolonas también se observan diferencias estadísticamente significativas entre las cepas que producen carbapenemasas y las que no. Sólo el 6% de las cepas resistentes a las fluoroquinolonas clásicas productoras de carbapenemasas son sensibles a delafloxacino en comparación con las cepas no productoras de carbapenemasas que son sensibles al fármaco en el 34,3% de los casos ($p < 0.01$).

Al analizar la actividad intrínseca de los tres fármacos, también se encuentran diferencias; así como, la CMI₉₀ es menor para delafloxacino que para las otras fluoroquinolonas (Tabla 2).

Las infecciones por *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos son frecuentemente difíciles de tratar especialmente si se necesita una terapia oral que pueda acortar la estancia hospitalaria; la aparición de delafloxacino ofrece una gran oportunidad, pero hay muy pocos datos sobre la actividad *in vitro* sobre estos microorganismos. Nuestros resultados muestran que delafloxacino es muy activo frente a cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos por mecanismos diferentes a la producción de carbapenemasas por lo que podría ser una alternativa terapéutica a considerar tras descartar la presencia de estos enzimas mediante pruebas microbiológicas rápidas. Esta mayor actividad *in vitro* respecto a las otras fluoroquinolonas se asocia a su peculiar estructura química, que limita su expulsión al exterior una vez que ha entrado en la célula [6].

Nuestros datos muestran una elevada actividad intrínseca del compuesto, con una CMI₅₀ inferior al resto de las fluoroquinolonas estudiadas y en el rango de los trabajos publicados previamente [7]. Sin embargo, debido a la rápida aparición de resistencia a otras fluoroquinolonas en el pasado, se debe hacer un uso adecuado del fármaco mediante la supervisión de los grupos PROA y utilizando las nuevas técnicas microbiológicas, que deben estar disponibles durante todos los días de la

semana para lograr la máxima eficacia del mismo y prevenir su utilización incorrecta y por tato, limitar a aparición de cepas resistentes al mismo [8].

FINANCIACIÓN

Los autores declaran no haber recibido financiación para la realización de este estudio

CONFLICTOS DE INTERESES




Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

REFERENCIAS

- Kocsis B, Gulyás D, Szabó D. Delafloxacin, Finafloxacin, and Zabo-floxacin: Novel Fluoroquinolones in the Antibiotic Pipeline. *Antibiotics (Basel)* 2021;10(12):1506. doi: 10.3390/antibiotics10121506.
- Abu Lila AS, Huwaimel B, Alobaida A, Hussain T, Rafi Z, Mehmood K, et al. Delafloxacin-Capped Gold Nanoparticles (DFX-AuNPs): An Effective Antibacterial Nano-Formulation of Fluoroquinolone. *Antibiotic (Basel)* 2022;15(16):5709. doi: 10.3390/ma15165709.
- Tenover FC, Nicolau DP, Gill CM. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* –an emerging challenge. *Emerg Microbes Infect.* 2022;11(1):811-814. doi: 10.1080/22221751.2022.2048972.
- Pintado V, Ruiz-Garbajosa P, Aguilera-Alonso D, Baquero-Artigao F, Bou G, Cantón R, et al. Executive summary of the consensus document of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC) on the diagnosis and antimicrobial treatment of infections due to carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2022:S2529-993X(22)00281-7. doi: 10.1016/j.eimce.2022.06.014.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 31.1, 2023. <https://www.eucast.org>
- Lindsay M. Avery and David P. Nicolau. Investigational drugs for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Expert Opin Investig Drugs* 2018; 27(4):325-338. DOI: 10.1080/13543784.2018.1460354
- Jonathan C. Cho, Matthew P. Crotty, Bryan P. White, and Marylee V. Worley. What Is Old Is New Again: Delafloxacin, a Modern Fluoroquinolone. *Pharmacotherapy* 2018;38(1):108-121. DOI: 10.1002/phar.2050
- Jean SS, Gould IM, Lee WS, Hsueh PR. New Drugs for Multidrug-Resistant Gram-Negative Organisms: Time for Stewardship. *International Society of Antimicrobial Chemotherapy (ISAC). Drugs*. 2019 May;79(7):705-714. DOI: 10.1007/s40265-019-01112-1.

Brief Report

Comparison of Different Methods for Assaying the In Vitro Activity of Cefiderocol against Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains: Influence of Bacterial Inoculum

Celia García-Rivera ^{1,*}, Antonia Sánchez-Bautista ^{1,*}, Mónica Parra-Grande ¹, Andrea Ricart-Silvestre ¹, María Paz Ventero ¹, Iryna Tyshkovska ¹, Esperanza Merino ^{2,3} and Juan Carlos Rodríguez Díaz ^{1,3}

¹ Microbiology Department, Dr. Balmis University General Hospital, Alicante Institute for Health and Biomedical Research (ISABIAL), 03010 Alicante, Spain; parra_mongra@gva.es (M.P.-G.); ricart_and@gva.es (A.R.-S.); ventero_mar@isabial.es (M.P.V.); iryna_t90@hotmail.es (I.T.); rodriguez_juadia@gva.es (J.C.R.D.)

² Infectious Diseases Unit, Dr. Balmis University General Hospital, Alicante Institute for Health and Biomedical Research (ISABIAL), 03010 Alicante, Spain; merino_luc@gva.es

³ División de Microbiología, Universidad Miguel Hernández, Apartado 18, 03550 San Juan de Alicante, Spain

* Correspondence: garcia_celriv@gva.es (C.G.-R.); sanchez_antbau@gva.es (A.S.-B.)

Abstract: Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections represent a critical public health concern, highlighting the need for the development of effective antibiotics. Cefiderocol demonstrated potent in vitro activity against *Pseudomonas aeruginosa*, particularly in strains that are resistant to other drugs. However, concerns regarding the emergence of drug-resistant strains persist. This study, conducted with 109 carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from the Spanish Hospital (Dr. Balmis, Alicante). The study evaluated susceptibility to cefiderocol in comparison to alternative antibiotics and including their susceptibility to bacterial inoculum, while assessing various testing methods. Our findings revealed high susceptibility to cefiderocol against carbapenem-resistant strains, with only 2 of 109 strains exhibiting resistance. Comparative analysis demonstrated superiority of cefiderocol towards alternative antibiotics. Both the E-test and disk-diffusion methods showed 100% concordance with the microdilution method in classifying strains as susceptible or resistant. However, 4.6% (5/109) of disc zone diameters fell within the technical uncertainty zone, so the E-test technique was found to be more useful in routine clinical practice. Additionally, escalating bacterial inoculum correlated with decreases in vitro activity, so this parameter should be adjusted very carefully in in vivo studies. This study underscores cefiderocol's potential as a therapeutic option for carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. However, the emergence of drug-resistant strains emphasizes the critical need for a wise use of antibiotics and a continuous monitoring of resistance to antibiotics. Based on our in vitro data, further investigation concerning the impact of bacterial inoculum on drug efficacy is warranted in order to detect resistance mechanisms and optimize treatment strategies, thereby mitigating the risk of resistance.

Keywords: cefiderocol; inoculum; *Pseudomonas aeruginosa*; in vitro activity; antibiogram; resistance



Citation: García-Rivera, C.; Sánchez-Bautista, A.; Parra-Grande, M.; Ricart-Silvestre, A.; Ventero, M.P.; Tyshkovska, I.; Merino, E.; Rodríguez Díaz, J.C. Comparison of Different Methods for Assaying the In Vitro Activity of Cefiderocol against Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains: Influence of Bacterial Inoculum. *Antibiotics* **2024**, *13*, 663. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13070663>

Academic Editors: Krisztina M. Papp-Wallace and Marc Maresca

Received: 21 May 2024

Revised: 3 July 2024

Accepted: 13 July 2024

Published: 18 July 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Severe infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, attributed to the production of metallo- β -lactamases, entail a significant public health challenge. These infections are characterized by high morbidity and mortality rates and a scarcity of available therapeutic alternatives. This pathogen exhibits inherent resistance to many drug types, including aminopenicillins, first- and second-generation cephalosporins, and some third-generation cephalosporins, tetracyclines, trimethoprim/sulfamethoxazole, among others. Additionally, it can form biofilms, which not only complicate treatment but also facilitate the rapid acquisition of resistance to ongoing therapies [1]. Antibiotic resistance

in *Pseudomonas aeruginosa* involves multiple mechanisms such as enzyme production, loss of outer membrane proteins, target mutations, and multidrug efflux systems [2,3].

One of the tools in the fight against antibiotic resistance is the development of new antibiotics that target these microorganisms. Consequently, drugs from different families have been introduced to the market. Among these, we highlight the development of cefiderocol, a cephalosporin with potent in vitro activity against *Pseudomonas aeruginosa* strains that are resistant to other β -lactam drugs [4]. It has a peculiar mechanism of action because it is absorbed through iron transport channels by active transport. It also enters bacteria through traditional porin channels. In addition, cefiderocol is relatively stable against the hydrolysis of most serine and metallo- β -lactamases, including the carbapenemases KPC, NDM, VIM, IMP, and OXA [5]. However, the contribution of beta-lactamases, especially certain enzyme variants, in the occurrence of resistance to or reduced effectiveness of cefiderocol has also been demonstrated by in vitro synergy assays with clinically available beta-lactamase inhibitors [6].

This new antibiotic is emerging as a significant therapeutic alternative due to the challenges presented by infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains producing metallo- β -lactamases, particularly the VIM variant. These infections are difficult to treat and represent a major health concern in our environment due to limited therapeutic options. However, the emergence of drug-resistant strains has been reported despite the infrequent use of the drug [7–10].

From a microbiological standpoint, studying the in vitro activity of the drug is methodologically complex since its mechanism of entry into bacterial cells, involves interaction with iron in the medium. There is little information on the concordance of different microbiological methods in *Pseudomonas aeruginosa*. This study compares three commonly used methods for analyzing the in vitro activity of this compound: microdilution in broth with iron depletion, the E-test, and disc diffusion. It has been reported that increasing the bacterial inoculum decreases the in vitro activity of the drug [11]. Therefore, in this study, we aim at analyzing the variation in the minimum inhibitory concentration (MIC) of the drug by using inoculum levels lower and higher than those established by EUCAST for this parameter analysis

2. Results

2.1. Study of Cefiderocol in Relation to Other Antimicrobials

Out of a total of 109 strains, 98.20% were susceptible to cefiderocol, with only 2 strains showing resistance. Among the isolates producing VIM-type carbapenemases, susceptibility decreased to 96.3% (two resistant strains that were susceptible exclusively to colistin), while susceptibility in the group of 55 non-metallo- β -lactamases-producing strains was 100%.

Table 1 shows the percentage of susceptibility to cefiderocol in strains susceptible or resistant to other antibiotics used in therapy against *Pseudomonas aeruginosa*. Notably, the two strains resistant to cefiderocol were only susceptible to colistin.

Table 1. In vitro activity of cefiderocol in relation to the activity of the other drugs studied. S = susceptible; R = resistant.

Comparison of % Susceptibility to Cefiderocol vs. Other Antibiotics	
Other Antibiotics	S Cefiderocol
S: Imipenem/relebactam ($n = 9$)	100%
R: Imipenem/relebactam ($n = 100$)	98%
S: Ceftolozane/tazobactam ($n = 56$)	100%
R: Ceftolozane/tazobactam ($n = 53$)	96.20%
S: Colistin ($n = 108$)	98.20%
R: Colistin ($n = 1$)	100%
S: Amikacin ($n = 57$)	100%

Table 1. Cont.

Comparison of % Susceptibility to Cefiderocol vs. Other Antibiotics	
Other Antibiotics	S Cefiderocol
R: Amikacin (<i>n</i> = 52)	96.15%
S: Piperacillin/Tazobactam (<i>n</i> = 27)	100%
R: Piperacillin/Tazobactam (<i>n</i> = 82)	97.50%
S: Ceftazidime (<i>n</i> = 38)	100%
R: Ceftazidime (<i>n</i> = 71)	97.18%
S: Cefepime (<i>n</i> = 42)	100%
R: Cefepime (<i>n</i> = 67)	97.02%
TOTAL (<i>n</i> = 109)	98.20%
Metallo- β -lactamases producers (<i>n</i> = 54)	96.30%
Non- metallo- β -lactamases producers (<i>n</i> = 55)	100%

Table 2 shows MIC₅₀ (mg/L) and MIC₉₀ (mg/L) values for cefiderocol compared to other drugs used in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa*. It demonstrates that cefiderocol exhibited the highest in vitro activity, with lower MIC₅₀ (mg/L) and MIC₉₀ (mg/L) values.

Table 2. Results of MIC₅₀ (mg/L) and MIC₉₀ (mg/L) values for cefiderocol compared to other drugs.

ANTIBIOTICS	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Cefiderocol	0.11	0.38
Imipenem/relebactam	>64	>64
Ceftolozane/tazobactam	3	>256
Colistin	0.125	4
Amikacin	16	>256
Piperacillin/tazobactam	48	64
Ceftazidime	16	>32
Cefepime	16	>16

2.2. Analysis of the Different Techniques for Susceptibility to Cefiderocol

This study compares two cefiderocol susceptibility techniques—the diffusion gradient strips E-test Liofilchem[®] (Roseto degli Abruzzi, Italy) and Thermo Scientific[™] Oxoid[™] (Waltham, MA, USA) antimicrobial susceptibility discs—with the reference method, microdilution in iron-depleted medium using UMIC[®] Bruker (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG, Bremen, Germany). For this purpose, the reference inoculum used in the cefiderocol susceptibility study was 1.5×10^8 CFU (colony forming unit)/mL (0.5 McFarland).

These data are presented in Figures 1 and 2, where the evaluated technique is plotted on the y-axis against the reference technique on the x-axis. The MIC values are also shown (mg/L). When comparing the diffusion gradient strips E-test BD (Liofilchem[®]) method to the reference method (Figure 1), we observed 100% of categorical agreement. Likewise, Thermo Scientific[™] Oxoid[™] antimicrobial susceptibility disc method (Figure 2) achieved 100% of categorical agreement, but the two strains that are resistant to cefiderocol (MIC 4 mg/L) generated inhibition zone diameters falling within the area of technical uncertainty (ATU).

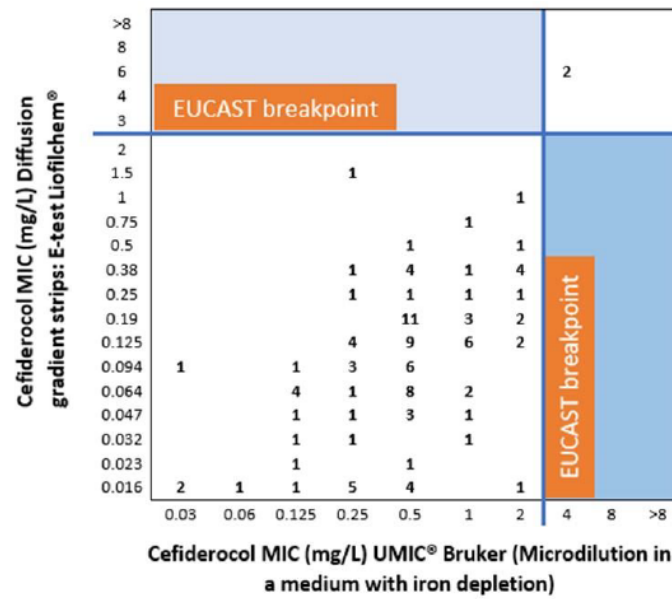


Figure 1. Comparison of microdilution in a medium with iron depletion, UMIC® Bruker with diffusion gradient strips, and E-test Liofilchem®.

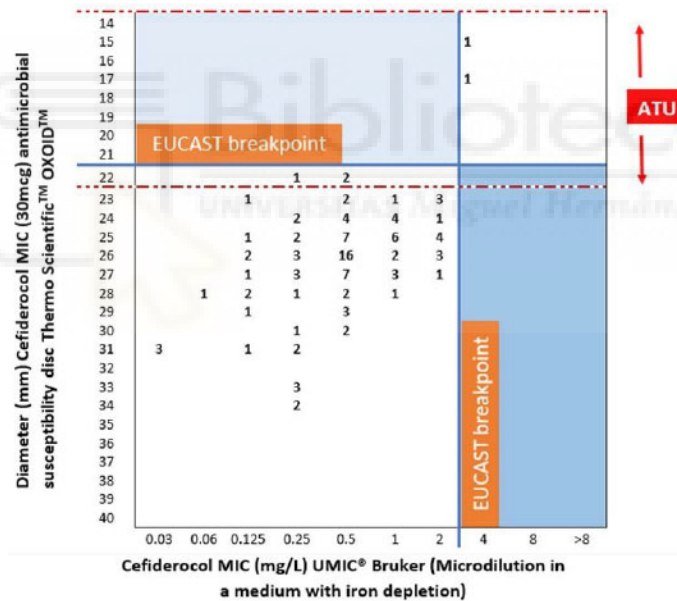


Figure 2. Comparison of microdilution in a medium with iron depletion: UMIC® Bruker with Thermo Scientific™ Oxoid™ cefiderocol antimicrobial susceptibility discs. (ATU: Area of technical uncertainty).

2.3. Investigation of Inoculum Influence

To study the influence of the inoculum, two different techniques were used: diffusion gradient strips, E-test Liofilchem® of cefiderocol and Thermo Scientific™ Oxoid™ cefiderocol antimicrobial susceptibility discs, both in Mueller Hinton E Agar (BioMérieux España S.A.—Manuel Tovar, 45–47, 28 034 Madrid). Three different inoculum concentrations were used. From smallest to largest, these included 1.5×10^7 CFU/mL, 1.5×10^8 CFU/mL and 3×10^8 CFU/mL. Increasing the inoculum concentration in all *Pseudomonas aeruginosa* isolates resulted in higher MIC values and reduced antibiotic in vitro activity, without changes in the susceptible/resistant category in either technique. Additionally, with Thermo Scientific™ Oxoid™ cefiderocol antimicrobial susceptibility discs, it increased

the inoculum-generated inhibition zone diameters falling within the area of technical uncertainty (ATU) (15 and 17 mm halo diameters).

A statistical analysis was conducted to study the influence of the inoculum in both evaluated techniques, comparing the three groups of initial inoculum concentrations (1.5×10^7 CFU/mL, 1.5×10^8 CFU/mL, and 3×10^8 CFU/mL). The data showed that the data did not follow a normal distribution. Therefore, the test used to assess the distribution among the different inoculum groups was the Kruskal–Wallis test. This test yielded a result with a p -value $< 5\%$, indicating statistically significant differences among the three groups of initial concentrations (CFU/mL) in both techniques. To enhance the analysis, pairwise comparisons were also conducted using the Dunn's test, which also revealed significant differences in the MIC values based on the initial inoculum used.

3. Discussion

The use of mass spectrometry (MALDI TOF) for the identification of pathogenic microorganisms has made it possible to obtain information on the etiology of the process before studying the in vitro activity of the drugs. In addition to rapid tests for the detection of resistance mechanisms, information on the epidemiology of antibiotic resistance in each environment has become increasingly important as it helps us to position new drugs within the available therapeutic arsenal, especially in situations where empirical treatments need to be established or antibiotic treatments need to be rapidly adjusted. In addition to the benefit to the individual patient, the stewardship groups the benefits from this information to design policies for the prevention and control of serious infections in each center, as it allows them to determine the evolution of the frequency of resistant strains in each setting [12–14].

Our study was conducted on clinical isolates prior to drug usage, establishing a baseline for monitoring resistance evolution. On one hand, this process is now particularly important due to the increasing use of the drug in clinical practice. It has been reported that antibiotic resistance usually develops in the months following increased antibiotic use [15,16]. On the other hand, although there are strains that are resistant to cefiderocol which are not producers of carbapenemsases and which therefore have other mechanisms of resistance, we have not detected the presence of these strains in our environment [17].

In our clinical isolates from patients diagnosed before the drug's introduction, we detected only two strains that were resistant to the drug. These were associated with carbapenem resistance due to production of the carbapenemase VIM. These data coincide with previously published results [18,19]. Repeatedly confirmed findings indicate that the drug's activity is strongly influenced by the type of carbapenemases. It exhibits high activity against the VIM type, but its effectiveness decreases against New Delhi metallo- β -lactamases (NDM) (83.4%) [20]. Therefore, when it comes to the clinical management of this drug, it is very important to conduct a rapid test that detects the absence of carbapenemases and/or the type of carbapenemase present. The low antibiotic resistance to the drug poses a methodological limitation due to the low number of resistant strains. However, this reflects real-life conditions at present [21]. Similarly, there are no data available in our environment regarding the drug activity on strains carrying other types of carbapenemases.

Karakonstantis S et al. performed a meta-analysis and reported that cefiderocol showed activity against most carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, including in metallo- β -lactamases producers, although it is recommended that one should monitor the evolution of resistance to this compound. Their analysis of 82,035 clinical isolates of Gram-negative bacilli revealed a very low percentage of resistant strains (1.4% [95% CI 0.5–4.0%]), reaching a conclusion that coincides with our findings [20].

Our data, obtained from the studied strains, show that cefiderocol is an important therapeutic tool for the treatment of difficult-to-treat *Pseudomonas aeruginosa*-associated infections compared to the other antibiotics studied, due to its good in vitro activity [22–25].

Our study utilized three microbiological methods to compare their efficacy. Our findings highlight the E-test as a viable alternative in laboratories lacking specific iron-

depleted media, as its results aligned with those obtained from the micro-dilution system with iron depletion, recognized as the gold standard [26]. In contrast, the disk-diffusion method placed two resistant strains in a zone of technical uncertainty, casting doubt on its clinical utility. Our data shed light on this contentious issue. Devoos et al. suggested limited utility of the E-test and reported that disks often fail to detect resistant strains, while Matuschek et al. argued that disk diffusion is robust [27,28]. Bianco et al. analyzed various species, particularly enterobacteria, and found good correlation between the disk diffusion and microdilution systems, though many strains fell into the technically uncertain category, which is with our findings [29]. Furthermore, a novel system analyzing microbial glucose metabolism in the presence of antibiotics shows promising results as an alternative to these traditional methods [30].

Regarding the influence of the initial bacterial inoculum used, we observed a decrease in the intrinsic activity of the drug as the starting inoculum was increased. Therefore, an inoculum quality control system must be included in this process. Despite this fact, the strains still fell into either the susceptible or resistant category, which contradicts previously published data indicating that, when facing the use of high inoculum, a change in category from susceptible to resistant was observed in most of the isolates of carbapenem-resistant Enterobacterales [31,32]. These data were previously in agreement, indicating that the inoculum's effect has little influence on the activity of carbapenems against this pathogen in animal models [33].

According to our in vitro results, this decrease in intrinsic drug activity at a high level of bacterial inoculum could be one of the causes explaining the risk of the appearance of treatment-resistant mutants in high-inoculum infections, which is beginning to be reported despite the low use of the drug [32]. Thus, a small proportion of resistant strains associated with various mechanisms generated by bacteria during treatment have been reported: mutations affecting porins, siderophore receptors, and efflux pumps, as well as modifications to the target (PBP-3) [34,35]. Another phenomenon to highlight is the emergence of persistence and hypermutation due to antibiotic treatment failure [36,37]. Furthermore, the contribution of beta-lactamases, especially certain enzyme variants, in the occurrence of resistance or reduced sensitivity to cefiderocol has been also demonstrated by in vitro synergy assays with clinically available beta-lactamase inhibitors [6].

The clinical significance and causes of the inoculum's effect on this drug are not well understood, but biofilms may be involved in high-inoculum infections, such as respiratory infections (inoculum of 10^8 UFC/mL). Additionally, quorum sensing has been reported to produce proteins that decrease antibiotic susceptibility. Moreover, the presence of a large bacterial inoculum promotes the survival of minority subpopulations with preexisting resistance mechanisms. There is little clinical evidence of the importance of the inoculum's effect, although the decreased efficacy of drugs has been demonstrated in animal models. Differences between drugs have been demonstrated; thus, the analysis of this parameter in this new drug with its own mechanism of entry into the bacteria provides relevant information that needs to be confirmed by further studies.

Despite the limited use of the drug, the emergence of resistant strains is concerning. A meta-analysis reported that 1.4% of *Pseudomonas aeruginosa* strains are resistant to cefiderocol [21]. Cross-resistance with ceftolozane-tazobactam has also been reported [38]. Therefore, microbiologists must closely monitor the evolution of antibiotic resistance in each setting to control this phenomenon.

Proper utilization of this drug and prevention of resistant mutant emergence necessitates promoting 24/7 microbiological diagnostics to ensure continuous detection of phenotypic susceptibility using the E-test and continuous surveillance of the emergence of resistant strains to limit their spread to other patients. The presence of carbapenemases and the type of carbapenemase is a key factor in determining the in vitro activity of the drug. Additionally, implementing a strict antibiotic stewardship policy is essential to ensure appropriate usage of this drug, specifically when warranted and under optimal conditions, allowing it to remain one of the best therapeutic alternatives for carbapenem-resistant

Pseudomonas aeruginosa infections, especially in infections with a high inoculum, to combat the risk of generation of resistant mutants during treatment [39].

4. Materials and Methods

The study was carried out using 109 strains of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* obtained consecutively from samples received at the clinical microbiology laboratory of Dr. Balmis Hospital (Alicante) between 2021 and 2022, prior to the use of this antibiotic. Pathogen identification was performed using mass spectrometry (MALDI-TOF) from the pathogen culture. The obtained strains were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 1.5 mL Eppendorf tubes containing a prepared solution of Trypticase Soy Broth (TSB-T) and glycerol. For the use of the pathogen in the study, the tubes containing the microorganism were thawed at room temperature. Once thawed, a transfer was made from the liquid medium to blood agar, and it was incubated for 24 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ to finally obtain the isolate for processing. Of the 109 strains of *Pseudomonas aeruginosa*, there were 54 consecutive isolates producing VIM-type carbapenemases and 55 consecutive isolates without the presence of carbapenemases; the latter were resistant to carbapenem through other mechanisms.

The strains were obtained consecutively from the Hospital General Dr. Balmis (Alicante, Spain) and were a representative sample of the *Pseudomonas aeruginosa* found in our setting.

Antibiotic susceptibility: The determination of antibiotics susceptibility, including carbapenems, was performed using the Walk Away system (Beckman Coulter); in addition, since the study was conducted with clinical strains that showed resistance to carbapenems, an additional test was performed to detect carbapenemase production using Cepheid GeneXpert[®] Systems and immunochromatography NG-Test CARBA 5, Biotech (Z.A. Courboubon, secteur 1 Atelier relais le Tremplin 35480 Guipry, France).

In the 109 strains, cefiderocol susceptibility was compared with those towards imipenem/relebactam, ceftolozane/tazobactam, colistin, amikacin, piperacillin/tazobactam, ceftazidime, and cefepime. Antimicrobials susceptibility aside from cefiderocol was tested by using gradient strips E-test Liofilchem[®].

The in vitro activity of cefiderocol was studied using three different methods:

- a. **Microdilution in iron-depleted medium (UMIC[®] Bruker):** The UMIC[®] Cefiderocol is suitable for determining MIC values in the range of 0.03 to 32 mg/L for *Pseudomonas aeruginosa*. UMIC are ready-to-use strips with 12 wells each, containing dried antibiotics and prepared according to the ISO 20776-1:2019 [40]. First, a 0.5 McFarland (1.5×10^8 CFU/mL) standard bacterial suspension is prepared in sodium chloride 0.9% solution; then, it is transferred to a 25 μL aliquot of cation-adjusted, iron-depleted Mueller Hinton broth. Next, UMIC cefiderocol was inoculated by transferring 100 μL to each well with the appropriate number of UMIC strips. The UMIC BOX was incubated for 18–24 h until we were able to visually read the MIC results.
- b. **Diffusion gradient strips E-test Liofilchem[®] of cefiderocol:** This technique was carried out according to the manufacturer's instructions using three different bacterial inoculums. The reference or standard inoculum corresponded to 1.5×10^8 CFU/mL (0.5 McFarland), which is a lower inoculum than the standard which corresponded to 1.5×10^7 CFU/mL; finally, a higher inoculum than the standard corresponded to 3×10^8 CFU/mL (1 McFarland). All of them used plates with Mueller Hinton E Agar (Biomérieux).
- c. **Thermo Scientific[™] Oxoid[™] cefiderocol antimicrobial susceptibility discs:** This technique was carried out according to the manufacturer's instructions using three different bacterial inoculums. The reference or standard inoculum corresponded to 1.5×10^8 CFU/mL (0.5 McFarland); a lower inoculum than standard corresponded to 1.5×10^7 CFU/mL; finally, a higher inoculum than standard corresponded to 3×10^8 CFU/mL (1 McFarland). All of them used plates with Mueller Hinton E Agar (Biomérieux).

Statistical analysis was performed to determine whether statistically significant differences could be found between the three initial inoculums (1.5×10^8 CFU/mL, 1.5×10^7 CFU/mL and 3×10^8 CFU/mL) using diffusion gradient strips of E-test Liofilchem®. To check whether the data followed a normal distribution, we applied the Shapiro–Wilk test. To study whether there were statistically relevant differences between the three groups of data, the Kruskal–Wallis test was used; finally, to compare groups 2 to 2, Dunn’s test with the Benjamini–Hochberg correction was used.

Interpretation of the results was performed using the EUCAST 2023 criteria [41].

Author Contributions: Conceptualization, J.C.R.D., M.P.-G. and E.M.; methodology, C.G.-R.; validation, C.G.-R.; formal analysis, C.G.-R. and A.R.-S.; investigation C.G.-R. and A.S.-B.; resources A.S.-B. and J.C.R.D.; data curation, I.T. and M.P.V.; writing—original draft preparation, J.C.R.D., M.P.-G. and C.G.-R.; writing—review and editing, J.C.R.D. and E.M.; supervision, J.C.R.D., M.P.-G. and E.M.; project administration, J.C.R.D. and A.S.-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported with a PTA Grant (PTA2021-020215-I) funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by “ESF Investing in your future”.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding authors.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Ferretti, C.; Poma, N.V.; Bernardo, M.; Rindi, L.; Cesta, N.; Tavanti, A.; Tascini, C.; Di Luca, M. Evaluation of antibiofilm activity of cefiderocol alone and in combination with imipenem against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2024**, *37*, 53–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Karruli, A.; Catalini, C.; D’amore, C.; Foglia, F.; Mari, F.; Harxhi, A.; Galdiero, M.; Durante-Mangoni, E. Evidence-Based Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: A Critical Reappraisal. *Antibiotics* **2023**, *12*, 399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
3. Avakh, A.; Grant, G.D.; Cheesman, M.J.; Kalkundri, T.; Hall, S. The Art of War with *Pseudomonas aeruginosa*: Targeting Mex Efflux Pumps Directly to Strategically Enhance Antipseudomonal Drug Efficacy. *Antibiotics* **2023**, *12*, 1304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
4. Khanchandani, H.; Chaudhury, M.; Rao, M.S.; Ramakrishna, N.; Venkataramana, B.; Chaudhury, A. In vitro activity of the newly approved antimicrobial agent Cefiderocol against Carbapenem resistant Gram negative clinical isolates. *Indian J. Med. Microbiol.* **2024**, *48*, 100556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kaye, K.S.; Naas, T.; Pogue, J.M.; Rossolini, G.M. Cefiderocol, a Siderophore Cephalosporin, as a Treatment Option for Infections Caused by Carbapenem-Resistant Enterobacterales. *Infect. Dis. Ther.* **2023**, *12*, 777–806. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
6. Bianco, G.; Gaibani, P.; Comini, S.; Boattini, M.; Banche, G.; Costa, C.; Cavallo, R.; Nordmann, P. Synergistic Effect of Clinically Available Beta-Lactamase Inhibitors Combined with Cefiderocol against Carbapenemase-Producing Gram-Negative Organisms. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
7. Tenover, F.C.; Nicolau, D.P.; Gill, C.M. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* an emerging challenge. *Emerg. Microbes Infect.* **2022**, *11*, 811–814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
8. Pintado, V.; Ruiz-Garbajosa, P.; Aguilera-Alonso, D.; Baquero-Artigao, F.; Bou, G.; Cantón, R.; Grau, S.; Gutiérrez-Gutiérrez, B.; Larrosa, N.; Machuca, I.; et al. Executive summary of the consensus document of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC) on the diagnosis and anti-microbial treatment of infections due to carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. (Engl. Ed.)* **2023**, *41*, 360–370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Brakert, L.; Berneking, L.; Both, A.; Berinson, B.; Huang, J.; Aepfelbacher, M.; Wolschke, C.; Wichmann, D.; Rohde, H. Rapid development of cefiderocol resistance in a carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate associated with mutations in the pyoverdine biosynthesis pathway. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2023**, *34*, 59–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Gomis-Font, M.A.; Sastre-Femenia, M.À.; Taltavull, B.; Cabot, G.; Oliver, A. In vitro dynamics and mechanisms of cefiderocol resistance development in wild-type, mutator and XDR *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2023**, *78*, 1785–1794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Huang, Y.S.; Chen, P.Y.; Chou, P.C.; Wang, J.T. In Vitro Activities and Inoculum Effects of Cefiderocol and Aztreonam-Avibactam against Metallo-β-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. *Microbiol. Spectr.* **2023**, *11*, e0056923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]

12. Kalpana, S.; Lin, W.Y.; Wang, Y.C.; Fu, Y.; Lakshmi, A.; Wang, H.Y. Antibiotic Resistance Diagnosis in ESKAPE Pathogens A Review on Proteomic Perspective. *Diagnostics* **2023**, *13*, 1014. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
13. Lanckohr, C.; Bracht, H. Antimicrobial stewardship. *Curr. Opin. Crit. Care* **2022**, *28*, 551–556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Fatemi, Y.; Bergl, P.A. Diagnostic Stewardship: Appropriate Testing and Judicious Treatments. *Crit. Care Clin.* **2022**, *38*, 69–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Poku, E.; Cooper, K.; Cantrell, A.; Harnan, S.; Abu Sin, M.; Zanuzdana, A.; Hoffmann, A. Systematic review of time lag between antibiotic use and rise of resistant pathogens among hospitalized adults in Europe. *JAC Antimicrob. Resist.* **2023**, *5*, dlad001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
16. Laffont-Lozes, P.; Larcher, R.; Salipante, F.; Leguelinel-Blache, G.; Dunyach-Remy, C.; Lavigne, J.-P.; Sotto, A.; Loubet, P. Usefulness of dynamic regression time series models for studying the relationship between antimicrobial consumption and bacterial antimicrobial resistance in hospitals: A systematic review. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2023**, *12*, 100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
17. Vuillemin, X.; Da Silva, M.; Bour, M.; Landon, C.; Plésiat, P.; Jeannot, K. Cefiderocol activity is compromised by acquired extended-spectrum oxacillinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2023**, *62*, 106917. [[CrossRef](#)]
18. Yao, J.; Wang, J.; Chen, M.; Cai, Y. Cefiderocol: An Overview of Its in-vitro and in-vivo Activity and Underlying Resistant Mechanisms. *Front. Med.* **2021**, *8*, 741940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
19. Karlowsky, J.A.; Walkty, A.J.; Baxter, M.R.; Adam, H.J.; Lagacé-Wiens, P.R.S.; Schweizer, F.; Bay, D.; Lynch, J.P.; Mulvey, M.R.; Zhanel, G.G. In Vitro Activity of Cefiderocol against Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: CANWARD, 2007 to 2019. *Microbiol. Spectr.* **2022**, *10*, e0172422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
20. Wang, C.; Yang, D.; Wang, Y.; Ni, W. Cefiderocol for the Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria: A Systematic Review of Currently Available Evidence. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 896971. Erratum in *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 976792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
21. Karakonstantis, S.; Rousaki, M.; Vassilopoulou, L.; Kritsotakis, E.I. Global prevalence of cefiderocol non-susceptibility in *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, and *Stenotrophomonas maltophilia*: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Microbiol. Infect.* **2024**, *30*, 178–188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Domingues, S.; Lima, T.; Saavedra, M.J.; Da Silva, G.J. An Overview of Cefiderocol’s Therapeutic Potential and Underlying Resistance Mechanisms. *Life* **2023**, *13*, 1427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
23. Mancuso, G.; De Gaetano, S.; Midiri, A.; Zummo, S.; Biondo, C. The Challenge of Overcoming Antibiotic Resistance in Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria: “Attack on Titan”. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1912. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
24. Wicky, P.-H.; Poiraud, J.; Alves, M.; Patrier, J.; D’humieres, C.; Lê, M.; Kramer, L.; de Montmollin, É.; Massias, L.; Armand-Lefèvre, L.; et al. Cefiderocol Treatment for Severe Infections due to Difficult-to-Treat-Resistant Non-Fermentative Gram-Negative Bacilli in ICU Patients: A Case Series and Narrative Literature Review. *Antibiotics* **2023**, *12*, 991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
25. Cosentino, F.; Viale, P.; Giannella, M. MDR/XDR/PDR or DTR? Which definition best fits the resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa*? *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2023**, *36*, 564–571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Dortet, L.; Niccolai, C.; Pfennigwerth, N.; Frisch, S.; Gonzalez, C.; Antonelli, A.; Giani, T.; Hoenings, R.; Gatermann, S.; Rossolini, G.M.; et al. Performance evaluation of the UMIC[®] Cefiderocol to determine MIC in Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2023**, *78*, 1672–1676. [[CrossRef](#)]
27. Devoos, L.; Biguenet, A.; Rousselot, J.; Bour, M.; Plésiat, P.; Fournier, D.; Jeannot, K. Performance of discs, sensititre EUMDROXF microplates and MTS gradient strips for the determination of the susceptibility of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* to cefiderocol. *Clin. Microbiol. Infect.* **2023**, *29*, 652.e1–652.e8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Matuschek, E.; Longshaw, C.; Takemura, M.; Yamano, Y.; Kahlmeter, G. Cefiderocol: EUCAST criteria for disc diffusion and broth microdilution for antimicrobial susceptibility testing. *J. Antimicrob. Chemother.* **2022**, *77*, 1662–1669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
29. Bianco, G.; Boattini, M.; Comini, S.; Banche, G.; Cavallo, R.; Costa, C. Disc Diffusion and ComASP[®] Cefiderocol Microdilution Panel to Overcome the Challenge of Cefiderocol Susceptibility Testing in Clinical Laboratory Routine. *Antibiotics* **2023**, *12*, 604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
30. Raro, O.H.F.; Bouvier, M.; Kerbol, A.; Poirel, L.; Nordmann, P. MultiRapid ATB NP test for detecting concomitant susceptibility and resistance of last-resort novel antibiotics available to treat multidrug-resistant Enterobacterales infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2024**, *64*, 107206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Danjean, M.; Hobson, C.A.; Gits-Muselli, M.; Courroux, C.; Monjault, A.; Bonacorsi, S.; Birgy, A. Evaluation of the inoculum effect of new antibiotics against carbapenem-resistant enterobacterales. *Clin. Microbiol. Infect.* **2022**, *28*, 1503.e1–1503.e3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Hobson, C.A.; Cointe, A.; Jacquier, H.; Choudhury, A.; Magnan, M.; Courroux, C.; Tenaillon, O.; Bonacorsi, S.; Birgy, A. Cross-resistance to cefiderocol and ceftazidime-avibactam in KPC β -lactamase mutants and the inoculum effect. *Clin. Microbiol. Infect.* **2021**, *27*, 1172.e7–1172.e10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Mimoz, O.; Elhelali, N.; Léotard, S.; Jacolot, A.; Laurent, F.; Samii, K.; Petitjean, O.; Nordmann, P. Treatment of experimental pneumonia in rats caused by a PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **1999**, *44*, 91–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Karakonstantis, S.; Rousaki, M.; Kritsotakis, E.I. Cefiderocol: Systematic Review of Mechanisms of Resistance, Heteroresistance and In Vivo Emergence of Resistance. *Antibiotics* **2022**, *11*, 723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
35. Fendian, Á.M.; Albanell-Fernández, M.; Tuset, M.; Pitart, C.; Castro, P.; Soy, D.; Bodro, M.; Soriano, A.; del Río, A.; Martínez, J.A. Real-Life Data on the Effectiveness and Safety of Cefiderocol in Severely Infected Patients: A Case Series. *Infect. Dis. Ther.* **2023**, *12*, 1205–1216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
36. Liu, H.; Yang, L.; Chen, Q.; Song, H.; Bo, X.; Guo, J.; Li, P.; Ni, M. Time Series Genomics of *Pseudomonas aeruginosa* Reveals the Emergence of a Hypermutator Phenotype and Within-Host Evolution in Clinical Inpatients. *Microbiol. Spectr.* **2022**, *10*, e0005722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
37. Witzany, C.; Regoes, R.R.; Igler, C. Assessing the relative importance of bacterial resistance, persistence and hyper-mutation for antibiotic treatment failure. *Proc. Biol. Sci.* **2022**, *289*, 20221300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
38. Shields, R.K.; Kline, E.G.; Squires, K.M.; Van Tyne, D.; Doi, Y. In vitro activity of cefiderocol against *Pseudomonas aeruginosa* demonstrating evolved resistance to novel β -lactam/ β -lactamase inhibitors. *JAC Antimicrob. Resist.* **2023**, *5*, dlad107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Jean, S.S.; Gould, I.M.; Lee, W.S.; Hsueh, P.R.; International Society of Antimicrobial Chemotherapy (ISAC). New Drugs for Multidrug-Resistant Gram-Negative Organisms: Time for Stewardship. *Drugs* **2019**, *79*, 705–714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Bianco, G.; Boattini, M.; Comini, S.; Gaibani, P.; Cavallo, R.; Costa, C. Performance evaluation of Bruker UMIC[®] microdilution panel and disc diffusion to determine cefiderocol susceptibility in *Enterobacterales*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* and *Burkholderia* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2024**, *43*, 559–566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 14.0. 2024. Available online: <http://www.eucast.org> (accessed on 20 May 2024).

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.





Article

Genomic Analysis of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from a “One Health” Perspective

Celia García-Rivera ¹, Carmen Molina-Pardines ², José M. Haro-Moreno ², Mónica Parra Grande ¹, Juan Carlos Rodríguez ^{1,*} and Mario López-Pérez ^{2,*}

¹ Microbiology Department, Alicante Institute of Sanitary and Biomedical Research (ISABIAL), Alicante University General Hospital, 03010 Alicante, Spain; garcia_celriv@gva.es (C.G.-R.); parra_mongra@gva.es (M.P.G.)

² Evolutionary Genomics Group, División de Microbiología, Universidad Miguel Hernández, 03550 Alicante, Spain; c.molina@umh.es (C.M.-P.); moreno.jose@umh.es (J.M.H.-M.)

* Correspondence: rodriguez_juadia@gva.es (J.C.R.); mario.lopezp@umh.es (M.L.-P.)

Abstract: The “One Health” approach provides a comprehensive framework for understanding antimicrobial resistance. This perspective is of particular importance in the study of *Pseudomonas aeruginosa*, as it is not only a pathogen that affects humans but also persists in environmental reservoirs. To assess evolutionary selection for niche-specific traits, a genomic comparison of 749 *P. aeruginosa* strains from three environments (clinical, aquatic, and soil) was performed. The results showed that the environment does indeed exert selective pressure on specific traits. The high percentage of persistent genome, the lack of correlation between phylogeny and origin of the isolate, and the high intrinsic resistance indicate that the species has a high potential for pathogenicity and resistance, regardless of the reservoir. The flexible genome showed an enrichment of metal resistance genes, which could act as a co-selection of antibiotic resistance genes. In the plasmids, resistance genes were found in multigenic clusters, with the presence of a mobile integron being prominent. This integron was identified in several pathogenic strains belonging to distantly related taxa with a worldwide distribution, showing the risk of rapid evolution of resistance. These results provide a more complete understanding of the evolution of *P. aeruginosa*, which could help develop new prevention strategies.



Citation: García-Rivera, C.; Molina-Pardines, C.; Haro-Moreno, J.M.; Parra Grande, M.; Rodríguez, J.C.; López-Pérez, M. Genomic Analysis of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from a “One Health” Perspective. *Microorganisms* **2024**, *12*, 1770. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12091770>

Academic Editor: Franca Rossi

Received: 6 August 2024

Revised: 22 August 2024

Accepted: 23 August 2024

Published: 27 August 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; One Health; antimicrobial resistance; antibiotic resistance; pangenome; mobile integron

1. Introduction

Bacterial antimicrobial resistance (AMR) is widely recognised as a major global public health threat in the 21st century [1]. While antibiotic discovery has saved millions of lives in recent decades, their overuse and inappropriate administration in human and veterinary medicine have led to a decline in their efficacy and the adaptation of bacteria to virtually all available treatments [2]. This has led to an increase in deaths caused by multidrug-resistant bacteria, longer hospital stays, and higher healthcare costs [3]. In 2022, the European Commission and the European Union (EU) Member States identified AMR as one of the top three priority health threats. It has been estimated that AMR directly causes 1.27 million deaths worldwide annually [4]. When deaths associated with multidrug-resistant microbial infections are taken into account, the number rises to approximately 5 million people. This makes AMR the third leading cause of death after cardiovascular disease and cancer [4]. Additionally, the World Health Organisation (WHO) has predicted that antibiotic resistance will cause around 10 million deaths per year by 2050, with costs to the global economy reaching up to USD 100 trillion [5]. The rapid emergence of mutations in bacteria when exposed to antibiotics has made these drugs unattractive to pharmaceutical companies, resulting in a halt to their development. The last generation of antibiotics was developed in

the early 1960s [6], which is a cause for concern. Although multiple alternative approaches are being investigated, a reliable substitute for antibiotics has not yet been found [7].

AMR is not confined to humans or clinical settings. The advent of culture-independent methodologies, such as metagenomics, has led to the realisation that AMR is a multifaceted issue, entailing interactions between diverse bacterial populations that exert an influence on the well-being of humans, animals, and the environment [8]. While some classes of antimicrobials are reserved exclusively for human use, the majority are also employed in livestock, aquaculture, and agriculture. This results in the persistence of drug residues in the environment, which leads to the continuous emergence of new resistance mechanisms. It is crucial to acknowledge that the utilisation of antimicrobials in non-human contexts can exert a considerable influence on human health [9]. It is therefore essential to consider the risk of AMR and its transmission holistically at the animal–human–environment interface to delay the emergence of new resistance and preserve the efficacy of antibiotics until a new alternative is found. This approach is known as “One Health” [10]. The “One Health” approach, supported by coordinated surveillance and education, is essential for preventing antimicrobial resistance (AMR) and promoting global health. Organizations such as the FAO, the OIE, and the WHO have adopted this concept in their AMR action plans. These initiatives aim to prevent AMR through awareness programs, education on responsible antibiotic use, political commitment, and effective antimicrobial management [11].

In 2017, the WHO published a list of pathogens that are responsible for most hospital-acquired infections due to their resistance to antimicrobial agents. The ESKAPE pathogens are regarded as a category of particular importance within this comprehensive list [12]. ESKAPE is an acronym that includes the scientific names of six highly virulent and antibiotic-resistant bacterial pathogens: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* spp. The acronym has recently been extended to ESKAPEE to also include *Escherichia coli* [13]. Understanding the resistance mechanisms of these bacteria is crucial for developing novel antimicrobial agents or other alternative tools to combat these public health challenges [14]. Among the priority antibiotic-resistant pathogens, *P. aeruginosa* is classified as a level 1 (critical) priority due to the increasing difficulty in treating infections caused by this bacterium, which can potentially be fatal [15]. This Gram-negative pathogen is opportunistic and responsible for severe infections with high morbidity and mortality rates in immunocompromised patients, particularly in hospital settings and Intensive Care Units (ICUs) [16]. It is the most common cause of chronic respiratory infections in patients with cystic fibrosis [17]. Due to the presence of efflux pumps and low membrane permeability, *P. aeruginosa* exhibits intrinsic reduced susceptibility to several antibacterial agents [18,19]. *P. aeruginosa* is a versatile bacterium that has been identified in a range of diverse ecological settings, including soil, water, plants, and human environments. In soil and water, it plays a significant role in the decomposition of organic matter and the breakdown of complex organic compounds, including pollutants. This contributes to nutrient cycling and bioremediation [16]. In plant environments, the bacterium can act as both a plant growth-promoting bacterium, producing substances that inhibit plant pathogens, and as a pathogen itself under certain conditions [20]. Moreover, *P. aeruginosa* plays a role in nitrogen fixation in certain ecosystems [21]. However, there is a lack of knowledge regarding environmental isolates of this microbe and their potential role as reservoirs of antibiotic resistance. Therefore, the objective of this study is to examine the evolutionary selection of niche-specific traits in clinical strains of *P. aeruginosa* in comparison with their environmental counterparts obtained from soil and aquatic environments. This will be achieved through a pangenomic approach. It is of paramount importance to ascertain the relationship between the environmental reservoirs of *P. aeruginosa* resistance and its mode of transfer in order to develop effective strategies for the prevention of infections caused by multidrug-resistant bacteria.

2. Materials and Methods

P. aeruginosa strains. The 749 *P. aeruginosa* used in this study were downloaded from the Pseudomonas Genome Database [22]. Of the total number of isolates, 591 were derived from human sources, 103 from aquatic environments (including marine and freshwater), and 55 from soil. Genomes were selected based on metadata indicating their environmental source, and those with more than 100 contigs were excluded from the analysis. The genomic features of these strains are detailed in the Table S1. For each genome, coding DNA sequences were predicted with Prodigal v2.6 using *-a output.proteins -d output.genes -c -p meta parameters* [23]. Then, we used DIAMOND v2.0.6 [24] (*blastp -sensitive -max-target-seqs 1 -evalue 1-e5 -block-size 12.0 -index-chunks 1*) to annotate the sequences against the non-redundant protein sequences from the NCBI database (NCBI's NR). The inferred function was predicted comparing protein sequences against COG [25] and TIGFRAM [26] databases using HMMscan v3.1b2 [27]. For statistical analysis, quantitative variables were expressed as the mean \pm standard deviation (SD) and compared by the unpaired t-test. Statistical analysis was performed using SPSS version 15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). All *p*-values were two-sided, and *p* < 0.05 was considered statistically significant.

Phylogenetic characterization. To establish the divergence of the genomes, average nucleotide identity values (ANI) among genomes were calculated using the FastANI program [28]. The dRep software was used to dereplicate highly identical genomes (ANI > 99%) [29]. Phylophlan3 was used to establish the phylogenomic classification using the following parameters: *-d phylophlan -t a -diversity high -accurate -f supermatrix_aa.cfg* [30]. We modified the program to use IQ-TREE [31] with the LG+F+G4 amino acid model and an ultra-fast bootstrap of 1000 replicates [32]. The resulting phylogenomic tree was edited using iTOL [33].

Pangenome analysis. To analyse the prevalence of gene families within the *P. aeruginosa* species, we employed PPanGGOLiN to classify gene families into persistent, shell, and cloud partitions [34]. The genes constituting each partition were functionally annotated against the SEED subsystems database [35], using DIAMOND v2.0.6 (*blastp* option, top hit, $\geq 50\%$ identity, $\geq 50\%$ alignment length, *E*-value < 10^{-5}). Only matches with *E* < 0.001 and alignment length > 0.5 for both subject and query were taken into account. The MEGARes database [36] and the virulence factor database [37] were used to locate antimicrobial resistance genes and virulence factors, respectively.

The *P. aeruginosa* mobilome. Identification of plasmids and prophages within the genomes was carried out using Plasmer [38] and VIBRANT v1.2.1 [39] software, respectively. After manual curation, the predicted protein-coding genes in both mobile elements were taxonomically and functionally annotated against the non-redundant protein sequences from the NCBI database (NCBI's NR) using DIAMOND v2.0.6 [25]. Putative endolysins were extracted following the method described by Fernández-Ruiz et al. [40]. The predicted proteins from each prophage were compared against a curated database of endolysins using DIAMOND v2.0.6. Matches were classified as putative endolysins if the match had >50% identity, covered at least 30% of the query sequence, the alignment was at least 50 aa long, and the *E* value was at least 10^{-3} .

3. Results and Discussion

To investigate the genomic differences between *P. aeruginosa* strains with different lifestyles (i.e., free-living to pathogenic), a total of 749 *P. aeruginosa* genomes were downloaded from the Pseudomonas Genome Database [22]. This database integrates high-precision genome-scale genomic sequences as well as manually curated metadata. Given the significant bias in the databases towards potentially pathogenic strains, we obtained 591 strains isolated from humans and 158 from environmental sources, including 103 from aquatic and 55 from soil. The genomic features of the genomes used in this study are available in Table S1. Despite belonging to the same species, analysis of their genomic characteristics revealed statistically significant differences among the three groups. The aquatic representatives exhibited a larger mean genome size of 6.6 Mb (SD, ± 0.27) in

comparison to the other two environments, with clinical and soil having means of 6.5 Mb (SD, ± 0.22) and 6.4 Mb (SD, ± 0.17), respectively (p -value < 0.05) (Table S1).

Phylogenomic characterization. To obtain a characterization of the genomic diversity within the recovered *P. aeruginosa*, a whole-genome phylogenomic tree was performed using only dereplicated genomes (ANI $> 99\%$) to avoid redundancies (#332 genomes; Figure 1A). The supplementary material includes a phylogenomic analysis of all genomes (Figure S1). The analysis demonstrated that the origin of *P. aeruginosa* strains was not correlated with the topology of the tree (Figure 1A). Phylogenomic analysis and ANI-based genome clustering enabled the genomes to be classified into 10 clusters with 99% identity, and only three clusters for the 98% ANI threshold. These results indicate that *P. aeruginosa* exhibits low intra-population sequence diversity, as the accepted cut-off for species membership is ANI 95%. Previous studies have indicated that the colonisation of new habitats in this species does not appear to necessitate the acquisition of new mutations, which would otherwise lead to population homogenisation [41]. The genomic homogeneity within the population and the environmental distribution unbiased by phylogenomic analysis suggest two possible evolutionary trends in the genome: a broad metabolic versatility of the core genome or a high genetic diversity of the flexible genome. This could influence the epidemiology of this microbe, as the same genomic background could mean that all strains, regardless of the origin from which they were isolated, would be potentially pathogenic.

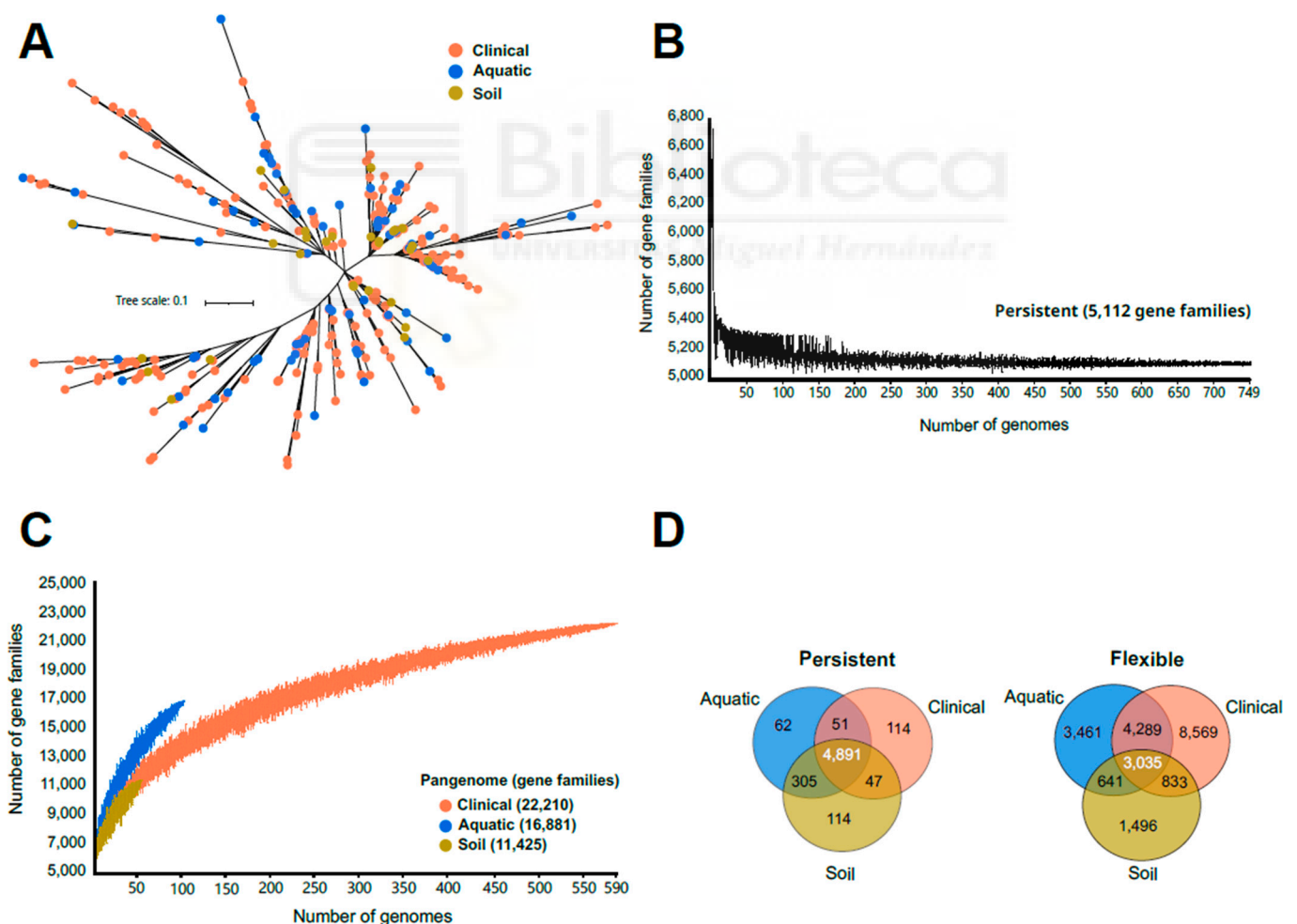


Figure 1. (A) Phylogenomic tree of dereplicated *P. aeruginosa* genomes (ANI $> 99\%$). (B) Core genome size accumulation of the 749 *P. aeruginosa* strains of the three environments (clinical, aquatic, and soil). (C) Pangenome size accumulation of the 749 *P. aeruginosa* strains of the three environments (clinical, aquatic, and soil). (D) Venn diagram representing the relationship between the gene families of the persistent and flexible genome across the three environments.

***Pseudomonas aeruginosa* pangenome.** Despite the absence of a phylogenetic relationship between strains and their respective environments, we decided to compare the genomic diversity of strains from each environment individually, using pangenomic analysis. Each of the pangenomes was divided into a persistent genome (also referred to as core genome), which comprises gene families present in almost all the genomes (at least 95%), and a flexible genome, which was divided into shell and cloud genome; shell genome consisted of gene families present in at least 15% but less than 95% of the strains and cloud genome referred to the set of gene families that were present in less than 15% of the genomes. Figure 1B shows that the persistent genome of all genomes in the study rapidly reached a plateau, while the pangenome curve of the strains from the three environments did not saturate, indicating an open pangenome in all cases. Considering all the genomes recovered in the study (regardless of the environment), the persistent genome comprised 5112 gene families, representing on average 91.7% of a *P. aeruginosa* genome. When the entire pangenome (26,590 gene families) was considered, the persistent genome represented 19%. The pangenome data for each environment revealed a total of 22,210, 16,881, and 11,425 gene families for the clinical, aquatic, and soil environments, respectively (Figure 1C).

In order to assess the potential adaptations to each environment, it was necessary to analyse the pangenome of each dataset separately. While the persistent genome of the 749 strains comprised 5112 gene families, analysis of the pangenome considering each environment independently revealed that the number of gene families shared between them was reduced to 4891 (on average, 87.7% of a *P. aeruginosa* genome) (Figure 1D). The Venn diagram of the different persistent genome revealed that the non-clinical environments (aquatic and soil) shared the greatest number of gene families, with a total of 305. However, each environment exhibited some unique gene families, with 114 in human and soil and 62 in aquatic. This indicates that, despite the absence of a correlation between phylogeny and the origin of the strains, specific gene families within each dataset may be implicated in the adaptation of the strains to their respective environments, despite their classification as belonging to the same species. However, when considering the environments separately, the persistent genome represents a high percentage of the genome (87.7%) compared to other ESKAPE pathogens such as *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, or *Acinetobacter baumannii* [42–45].

A comparison of the flexible genome (shell and cloud) across environments revealed a total of 3035 gene families in common. In this case, the environments sharing the highest number of gene families were clinical and aquatic, with a total of 4289. Additionally, each environment exhibited a subset of gene families that were specific to that environment, in proportion to the diversity and abundance of strains within each dataset. The total number of unique gene families in clinical, aquatic, and soil environments was 8569, 3461, and 1496, respectively (Figure 1D).

Functional analysis of the pangenome. A functional analysis was conducted on gene families belonging to the persistent genome that were unique to each environment. This analysis was performed using the SEED subsystems database [35]. The data showed that the gene families unique to the persistent soil genome were the only ones with activity related to sulphur metabolism (arylsulphatase, al-kanesulphonate transport system permease protein, ABC-type nitrate/sulphonate/bicarbonate transport systems, periplasmic components). However, they lacked functions related to DNA and fatty acid metabolism, lipid and isoprenoid metabolism, motility and chemotaxis, nitrogen metabolism and protein metabolism that were present in the clinical and aquatic strains (Table S2). In the case of strains belonging to aquatic environments, the persistent genome exhibited a notable prevalence of membrane transporters, a category of genes that is less abundant in soil and human environments. This phenomenon is likely attributable to the oligotrophic nature that characterises aquatic environments, which has facilitated the enrichment of the persistent genome with a greater number of nutrient uptake systems.

The proportion of gene families in the persistent genome that could be assigned to a SEED category was 58%, while for the flexible genome it was only 23%, 19%, and 23% for the clinical, aquatic, and soil environments, respectively. These data demonstrate the substantial amount of information that remains undiscovered due to a lack of annotation. As expected, the persistent genome shared by all environments was found to be enriched in categories related to metabolic processes, such as amino acid biosynthesis, cell wall, RNA metabolism, protein metabolism, and nucleoside/nucleotide metabolism. In contrast, the flexible genome was found to share several categories such as presence of prophages and transposable elements, secondary metabolism and virulence, disease, and defence (Figure 2A). The function related to clustering-based subsystems was present in higher proportion in the flexible genome of the aquatic strains. A greater proportion of functions related to DNA metabolism was observed in the flexible genome of strains of human and aquatic origin compared to the soil environment. It is also notable that a greater proportion of gene families associated with the category of phages, prophages, and transposable elements was identified in strains of aquatic origin. The flexible genome of soil strains exhibited a higher proportion of functions related to the metabolism of fatty acids, isoprenoids, and phospholipids within the category of fatty acids, lipids, and isoprenoids (Figure 2A). In contrast, clinical strains exhibited enhanced triacylglyceride metabolism. Furthermore, a greater proportion of gene families within the cell regulation and signalling category was observed in these human strains. This may be attributed to the necessity for heightened regulation in a more active environment, with a markedly diverse microbiome associated with other environments, coupled with host defences and the presence of continuous nutrients.

Antimicrobial resistance genes. The presence of antimicrobial resistance genes (ARGs) in the different pangenome partitions was analysed using the MEGARes 2.0 database [36]. A threshold of 70% (BLASTP) was employed to identify a total of 67 ARGs in the persistent genome, representing approximately 1.3% of the total genes. Four distinct classes of ARGs were identified, including multi-compound (41.8%), drug resistance (34.3%), biocides (14.9%), and metal (9%) (Figure 2B). The category of “drug resistance” encompasses several different types of resistance, including beta-lactams resistance, aminocoumarins, elfamycins, lipopeptides, cationic antimicrobial peptides, fosfomycin, and aminoglycosides. Therefore, regardless of the environment, the species has a high degree of intrinsic resistance to several antibiotics. These results may have an evolutionary implication that highlights the serious problem of resistance. Notably, our findings reveal that this species exhibits a significantly higher degree of intrinsic resistance compared to other ESKAPE pathogens, which generally display a greater proportion of their resistances in the flexible genome rather than the core genome [46]. For example, in the genus of other ESKAPE bacteria, which are known to be environmental bacteria as well as important nosocomial (hospital-acquired) pathogens such as *Acinetobacter*, the relevant role of plasmids in the spread of AMR has been demonstrated [47,48]. The fact that antibiotics have been in the environment for decades may be causing some of the genes responsible for resistance to become part of the species’ persistent genome. If this is the case, this adaptation represents an important evolutionary step in the fight against resistance and warrants further investigation.

In terms of the two flexible genome partitions, the number of ARGs was low in the “shell” genome, with 19 ARGs identified in soil and clinical strains, while only one ARG was detected in the aquatic environment. In this pangenome partition, the predominant category was metal resistance across all environments. The cloud genome exhibited greater diversity, with a total of 83 gene families (0.6%), 26 (0.26%), and 23 (0.42%) associated with resistance in clinical, aquatic, and soil, respectively, being identified. The number of ARGs in the “cloud” genome was greater than in the “shell” genome. In this flexible genome partition, strains derived from the environment exhibited a higher proportion of metal resistance, while strains of clinical origin displayed a higher number of genes within the drug category. For instance, resistance to fluoroquinolones, beta-lactams, tetracyclines, and lipopeptides was observed exclusively in the “cloud” genome of clinical isolates. The

Virulence factors. Next, the presence of virulence factors was analysed utilising the virulence factor database [37] with a threshold of 70% identity (BLASTP). A total of 339 virulence-associated genes were identified in the persistent genome of all the strains (representing 6.6% of the total) (Figure 2C). The categories with the highest representation were adherence, effector delivery system, immune modulation, nutritional/metabolic factor, exotoxin, biofilm, and regulation. In terms of the flexible genome, the “shell” genome was found to contain a total of 128 (3.7%), 80 (5%), and 62 (9.8%) gene families from clinical, aquatic, and soil strains, respectively. Although the relative abundance of these categories differed among environments, all environments exhibited the same categories, apart from the clinical environment, which also included the antimicrobial activity/competitive advantage category. A comparable proportion of genes associated with virulence factors was identified within the “cloud” genome, with a prevalence of approximately 1% across all environments. In contrast to the shell genome, all environments exhibited a virulence factor related to biofilm formation and exotoxin production. Furthermore, the aquatic and clinical strains showed a shared stress survival category. The “cloud” genome of human isolates exhibited the antimicrobial activity/competitive advantage category previously observed in the “shell” partition, with the addition of the exoenzyme category.

Pseudomonas aeruginosa mobilome. Horizontal gene transfer represents a pivotal mechanism for the dissemination of resistance genes. Indeed, in a previous study, we demonstrated the significance of integrative and conjugative elements (ICE) in the dissemination of a plethora of antibiotic-resistant genes in *P. aeruginosa* [52]. For this reason, the present study was designed to examine the potential contributions of two additional mobile genetic elements, namely plasmids and prophages, to the transfer and dissemination of ARGs between environments.

Plasmids. A total of 85 plasmids were obtained, comprising 58 clinical, 19 aquatic, and 8 soil environments. The GC content of these plasmids ranged from 54.82% to 64.12% (with an average of 58.76%). The largest plasmid had a length of 468,631 bp, while the smallest plasmid was 14,918 bp. Of the total 85 plasmids, nine were identified as repeated plasmids (with a minimum of identity and coverage of 90%). All repeat plasmids were found within genomes from the same environment, except for one, which was found to be duplicated in both the clinical (AU10272-C67) and aquatic (AUS221-C4) environment. The ANI of the genomes containing these identical plasmids was 98.7%, indicating that they are non-clonal strains. The plasmid was found to contain genes encoding resistance to multiple antimicrobial agents, which are associated with multi-drug ABC efflux pumps. It has been demonstrated that plasmids can be transmitted between different bacterial species. However, the mechanisms by which plasmids are transferred between different environments remain poorly understood. This finding provides evidence for the existence of identical plasmids in both different strains and diverse environments. This is of significant importance for understanding the natural exchange of genes between bacteria, including those conferring resistance to antibiotics, which continue to pose a global health threat.

The resistance genes present within these plasmids were subjected to further investigation. A total of 84 ARGs were identified in 22 plasmids (accounting for 26% of all plasmids), with an average of four resistance genes per plasmid. The plasmids containing the greatest number of resistance genes, with a total of nine genes, were GOM1-C20 and TNCF-23M-C8. These plasmids were isolated from strains collected from clinical and human environments. No ARGs were identified in the plasmids from the soil-derived strains. Most of the proteins identified in both human and aquatic environments were related to metal resistance, followed by drug resistance. In clinical strains, and likely due to the enrichment bias observed in genome databases derived from antibiotic resistance studies, the plasmids exhibited gene resistance to aminoglycosides, tetracyclines, fluoroquinolones, sulphonamides, phenicol, and beta-lactams. In contrast, in the aquatic environment, resistance genes against aminoglycosides were the only ones identified. Conversely, a total of ten proteins (identity 70%) related to virulence factors were identified. These proteins were

identified exclusively on plasmids of clinical origin within two categories, effector delivery systems and nutritional/metabolic factors.

Genomic analysis of the plasmids with multiple resistances revealed that, in one of them (pAZPAE12417-C2-436 Kb), multiple ARGs were concentrated in a region corresponding to an integron (Figure 3A). These non-chromosome-associated integrons are known as mobile integrons [53]. The ARGs identified within the integron were a tetracycline efflux MFS transporter, a sulphonamide-resistant dihydropteroate synthase, an AAC (6′)-Ib family aminoglycoside 6′-N-acetyltransferase, and the chloramphenicol/florfenicol efflux MFS transporter, FloR2. To analyse the dispersal capacity of this class of elements, a search for this integron was conducted in the NCBI non-redundant database. The results demonstrated the presence of the same integron and the associated ARGs, with a high identity (>95%), in microbes belonging to different orders within the class Gammaproteobacteria (Figure 3B). The *P. aeruginosa* strain containing this integron was obtained in 2007 from a cystic fibrosis patient in the USA [54]. However, the same mobile element was also recovered in other clinical and animal strains isolated worldwide. These include *Providencia stuartii* (clinical strain; Greece 2013), *Salmonella enterica* (clinical strain; USA, University of Georgia 2020), and *S. enterica* (animal strain; USA, South Dakota 2016). The co-occurrence of two mobile genetic elements, such as a plasmid and an integron, in disparate taxonomic species with high identity suggests the ease with which these elements can traverse taxonomic and geographical boundaries. Moreover, the integron enables not only the dissemination of ARGs but also their expression. This suggests that there is a significant possibility of dispersal and horizontal transfer of these elements between different environments, which could accelerate the evolution of resistance. In light of these considerations, there is a compelling need to develop effective multidisciplinary prevention and control strategies at both the clinical and environmental levels.

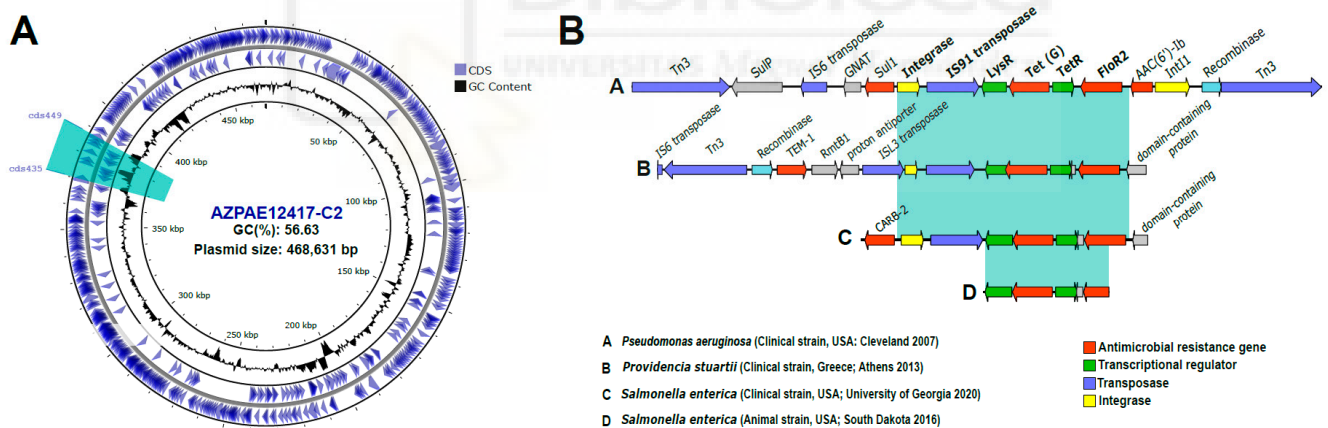


Figure 3. (A) Schematic representation of plasmid pAZPAE12417-C2 (436 Kb). The highlighted region corresponds to the location of the integron. (B) Genomic alignment of mobile genetic elements containing the same resistance gene cassette (>95% identity) as found within the AZPAE12417-C2 plasmid integron (A) in members of the orders Pseudomonadales and Enterobacterales.

Prophages. A total of 2479 prophages were obtained, with GC contents ranging from 34.9% to 67.9% (with an average of 62.5%). The largest prophage was 105,638 bp, while the smallest was 1126 bp. A total of 221 lytic (9%) and 2258 lysogenic (91%) prophages were identified. The mean number of prophages per genome in each environment was three for the clinical isolates, but only one for both the aquatic and soil environments. The prophages were grouped into 709 clusters with an ANI value of 90%. A total of 454 prophages were identified only in a single genome. However, we found some examples where the same prophage was identified in strains from all three environments. The analysis of prophage-associated resistance genes showed the presence of 56 ARGs (0.06% of all prophage-encoded proteins). Most of the proteins identified in all environments were related to drug resistance. In strains derived from clinical isolates, resistance to fluoroquinolones and multidrug efflux

pump function was identified. In strains from aquatic environments, we observed resistance to fluoroquinolones and to class D beta-lactams, which was not observed in strains from clinical samples. The strains from the soil exhibited resistance only to fluoroquinolones.

A total of 76 related proteins were identified within the prophages in terms of virulence factors. The human and aquatic environments exhibited several commonalities in their virulence factors, including those related to the effector release system, immune modulation, nutritional/metabolic factors, and regulation. Furthermore, in clinical isolates, we also identified virulence factors related to adhesion. In the soil environment, no virulence factors were identified in the prophages. The annotation of the prophages also revealed the presence of the zonular occludens toxin in 18 of them. The toxin was identified in 12 prophages derived from human isolates, five of which were isolated from aquatic environments and in one from soil. This toxin is a virulence factor that has been observed in other microorganisms, including *Vibrio cholera*, whose function is to increase the permeability of the intestinal epithelium [55], which would favour the bacteria in the infection process.

Alternative to antimicrobials (endolysins). One of the most significant challenges in microbiology is the management of infectious diseases caused by multidrug-resistant bacteria, due to the lack of effective treatments against them. Endolysins are enzymes produced by bacteriophages whose biological function is to hydrolyse bonds in the bacterial cell wall [56]. Consequently, they have become an increasingly popular complement to antibiotics for the treatment of infections caused by multidrug-resistant bacteria. A total of 1820 endolysins were identified within the prophage annotation. The endolysins were clustered at 90% identity, resulting in a total of 51 clusters. The functional classification revealed the existence of seven major functional clusters, including the glycoside hydrolase 19 (GH19) (51.4%), phage lysozyme (18.9%), chitin catabolic process (13.5%), bacteriophage lysis protein Rz (8.1%), host cell virus cytolysis (2.7%), lysozyme (2.7%), and N-acetyl muramidase (2.7%). The GH19 family is a bifunctional group, encompassing both chitinase and lysozyme activities. Except for phage lysozyme, which is more prevalent in the aquatic environment, all other activities were localised in prophages obtained from clinical settings. The high prevalence of these endolysins within the species suggests that they may play a significant role in the host and could be a promising candidate for the development of new antibacterial therapies against Gram-negative bacteria.

Limitations of the study. One of the principal constraints confronting “One Health” approaches such as this study, which endeavours to address health issues through a multi-disciplinary and comprehensive perspective encompassing human, animal, and environmental health, is the preponderance of clinical strains in databases. A significant number of studies give precedence to clinical strains, given their greater accessibility through medical and hospital records. This may result in a biased understanding of antibiotic resistance, as it may not accurately reflect resistance profiles in the environment or in animals. The sampling and study of environmental strains is more challenging due to the diverse and less controlled nature of their habitats. This consequently creates a deficit in our understanding of the resistance genes present in non-clinical settings. Furthermore, studies that do not sufficiently incorporate environmental strains may fail to identify pivotal connections between environmental and clinical resistance mechanisms, impeding the formulation of comprehensive control strategies. For these reasons, and despite the existence of this bias in databases in general, it is essential to commence studying the contribution of environmental reservoirs of resistance to the overall burden of antibiotic resistance, as well as the pathways of transmission of resistance from the environment to humans and animals. In order to address these limitations in the future, it is necessary to adopt a more balanced approach that gives equal importance to environmental strains in antibiotic resistance research. This can be achieved through the implementation of improved sampling methods, interdisciplinary collaborations, and integrated surveillance systems that cover human, animal, and environmental health sectors in an equitable manner.

4. Conclusions

In conclusion, the “One Health” approach is of paramount importance for the study of resistance in *P. aeruginosa*, given that it is not only a human pathogen, but also affects animals and persists in diverse environmental reservoirs, such as soil and water. The high percentage of persistent genome within the species, the lack of correlation between phylogeny and origin of isolation, and the intrinsic resistance to a wide variety of antibiotics suggest that the species has high pathogenic and resistance potential regardless of the reservoir. This underlies the difficulty of its treatment and requires special attention for the development of new therapeutic strategies and a thorough understanding of its resistance pathways.

In the flexible genome, environmental strains exhibited an enrichment of metal resistance genes, which could act synergistically, allowing co-selection of antibiotic resistance genes. This, in turn, exacerbates the spread of AMR, particularly in mobile genetic elements. Only a quarter of the plasmids contained resistance genes, but the majority were present in multiple gene clusters. Prophages, which were much more abundant than plasmids, also contained genes directly conferring antibiotic resistance. We found examples of the same plasmid and prophage in different environments, which provides evidence of a connection and dispersion of these elements between environments. Most notable was the presence of a mobile integron within a plasmid that carried several associated resistances. Moreover, this integron was identified in multiple pathogenic strains belonging to distantly related taxa with a global distribution, thereby increasing the risk of rapid resistance evolution.

The findings of this study indicate that resistance management in *P. aeruginosa* may pose a significant challenge due to the organism’s metabolic versatility and the presence of multiple intrinsic resistances. However, this phenomenon is not exclusive to this species. The presence of this *P. aeruginosa* in multiple environmental reservoirs indicates the potential for the transfer of resistance genes to other human pathogens, which could further exacerbate the public health concern. Such gene flow has the potential to give rise to novel resistant strains within clinical settings, thereby complicating treatment options and increasing healthcare costs. Future research should prioritise the development of targeted strategies to mitigate the spread of resistance, as opposed to the emergence of new resistant strains as well as to explore the interactions between mobile genetic elements and their role in the spread of resistance genes in different environments. The practical applications of these findings should extend beyond the hospital setting to include increased surveillance of environmental reservoirs and stricter control measures in both clinical and agricultural settings, with the aim of preventing the spread of resistant strains. Any action against this threat must be multidisciplinary. This encompasses the implementation of enhanced antibiotic stewardship across all sectors, with the objective of reducing overall antibiotic utilisation and preventing the inadvertent release of antibiotics into the environment. Additionally, there is a need to reinforce environmental surveillance systems to monitor antibiotic resistance in *P. aeruginosa* and other pathogens. This integrated strategy is of paramount importance for the protection of public health and the long-term efficacy of antibiotics. Furthermore, efforts should be made to further the genomic analysis of environmental strains in addition to pathogenic strains.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms12091770/s1>, Figure S1: Maximum likelihood phylogenomic tree of the *Pseudomonas aeruginosa* genomes isolated in this study; Table S1: Genomic features of *Pseudomonas aeruginosa* strains used in this study; Table S2: Functional comparison of single gene families in each environment using the SEED database. Table S3: Antimicrobial resistance comparison of single gene families in each environment using the MEGARes database.

Author Contributions: M.L.-P. conceived the study. C.G.-R., C.M.-P., J.C.R. and J.M.H.-M. performed bioinformatic analyses. The manuscript was written by M.L.-P., J.C.R., M.P.G. and C.G.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: M.L.-P. was supported by a “FLEX3GEN” PID2020-118052GB-I00 (cofounded with FEDER funds) from the Spanish Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

Data Availability Statement: All sequences in this work as well as metadata have been obtained from the Pseudomonas Genome Database (<https://www.pseudomonas.com/>).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Tarín-Pelló, A.; Suay-García, B.; Pérez-Gracia, M.T. Antibiotic resistant bacteria: Current situation and treatment options to accelerate the development of a new antimicrobial arsenal. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.* **2022**, *20*, 1095–1108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Salam, M.A.; Al-Amin, M.Y.; Salam, M.T.; Pawar, J.S.; Akhter, N.; Rabaan, A.A.; Alqumber, M.A.A. Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare* **2023**, *11*, 1946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
3. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet* **2022**, *399*, 629–655, Erratum in *Lancet* **2022**, *400*, 1102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
4. Global Health Security Agenda (GHS). 2019. Available online: <http://www.ghsagenda.org/about> (accessed on 10 January 2024).
5. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of Antimicrobial Resistance in Europe, 2022. 2022. Available online: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Nov2023-ECDC-WHO-Executive-Summary.pdf> (accessed on 10 January 2024).
6. Coates, A.R.; Halls, G.; Hu, Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *163*, 184–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
7. Murugaiyan, J.; Kumar, P.A.; Rao, G.S.; Iskandar, K.; Hawser, S.; Hays, J.P.; Mohsen, Y.; Adukkadukkam, S.; Awuah, W.A.; Jose, R.A.M.; et al. Progress in Alternative Strategies to Combat Antimicrobial Resistance: Focus on Antibiotics. *Antibiotics* **2022**, *11*, 200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
8. McEwen, S.A.; Collignon, P.J. Antimicrobial Resistance: A One Health Perspective. *Microbiol. Spectr.* **2018**, *6*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Aslam, B.; Khurshid, M.; Arshad, M.I.; Muzammil, S.; Rasool, M.; Yasmeen, N.; Shah, T.; Chaudhry, T.H.; Rasool, M.H.; Shahid, A.; et al. Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 771510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
10. One Health Commission. What Is One Health? 2018. Available online: https://www.onehealthcommission.org/en/why_one_health/what_is_one_health/ (accessed on 3 January 2017).
11. Ahmad, N.; Joji, R.M.; Shahid, M. Evolution and implementation of One Health to control the dissemination of antibiotic-resistant bacteria and resistance genes: A review. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2023**, *12*, 1065796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
12. Rice, L.B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. *J. Infect. Dis.* **2008**, *197*, 1079–1081. [[CrossRef](#)]
13. Savin, M.; Bierbaum, G.; Hammerl, J.A.; Heinemann, C.; Parcina, M.; Sib, E.; Voigt, A.; Kreyenschmidt, J. ESKAPE Bacteria and Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Wastewater and Process Water from German Poultry Slaughterhouses. *Appl. Environ. Microbiol.* **2020**, *86*, e02748-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
14. Santajit, S.; Indrawattana, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed. Res. Int.* **2016**, *2016*, 2475067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
15. Asokan, G.V.; Ramadhan, T.; Ahmed, E.; Sanad, H. WHO Global Priority Pathogens List: A Bibliometric Analysis of Medline-PubMed for Knowledge Mobilization to Infection Prevention and Control Practices in Bahrain. *Oman Med. J.* **2019**, *34*, 184–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
16. Wood, S.J.; Kuzel, T.M.; Shafikhani, S.H. *Pseudomonas aeruginosa*: Infections, Animal Modeling, and Therapeutics. *Cells* **2023**, *12*, 199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
17. Qin, S.; Xiao, W.; Zhou, C.; Pu, Q.; Deng, X.; Lan, L.; Liang, H.; Song, X.; Wu, M. *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7*, 199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Fukuoka, T.; Ohya, S.; Narita, T.; Katsuta, M.; Iijima, M.; Masuda, N.; Yasuda, H.; Trias, J.; Nikaido, H. Activity of the carbapenem panipenem and role of the OprD (D2) protein in its diffusion through the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 322–327. [[CrossRef](#)]
19. Pang, Z.; Raudonis, R.; Glick, B.R.; Lin, T.-J.; Cheng, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 177–192. [[CrossRef](#)]
20. Glick, B.R. Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. *Scientifica* **2012**, *2012*, 963401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
21. Timofeeva, A.M.; Galyamova, M.R.; Sedykh, S.E. Plant Growth-Promoting Soil Bacteria: Nitrogen Fixation, Phosphate Solubilization, Siderophore Production, and Other Biological Activities. *Plants* **2023**, *12*, 4074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]

22. Winsor, G.L.; Lam, D.K.; Fleming, L.; Lo, R.; Whiteside, M.D.; Yu, N.Y.; Hancock, R.E.W.; Brinkman, F.S.L. Pseudomonas Genome Database: Improved comparative analysis and population genomics capability for Pseudomonas genomes. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, D596–D600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
23. Hyatt, D.; Chen, G.L.; Locascio, P.F.; Land, M.L.; Larimer, F.W.; Hauser, L.J. Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinform.* **2010**, *11*, 119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
24. Buchfink, B.; Xie, C.; Huson, D.H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 59–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Tatusov, R.L.; Natale, D.A.; Garkavtsev, I.V.; Tatusova, T.A.; Shankavaram, U.T.; Rao, B.S.; Kiryutin, B.; Galperin, M.Y.; Fedorova, N.D.; Koonin, E.V. The COG database: New developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 22–28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
26. Haft, D.H.; Loftus, B.J.; Richardson, D.L.; Yang, F.; Eisen, J.A.; Paulsen, I.T.; White, O. TIGRFAMs: A protein family resource for the functional identification of proteins. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 41–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
27. Eddy, S.R. Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Comput. Biol.* **2011**, *7*, e1002195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
28. Jain, C.; Rodriguez-R, L.M.; Phillippy, A.M.; Konstantinidis, K.T.; Aluru, S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Olm, M.R.; Brown, C.T.; Brooks, B.; Banfield, J.F. dRep: A tool for fast and accurate genomic comparisons that enables improved genome recovery from metagenomes through de-replication. *ISME J.* **2017**, *11*, 2864–2868. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
30. Segata, N.; Börnigen, D.; Morgan, X.C.; Huttenhower, C. PhyloPhlAn is a new method for improved phylogenetic and taxonomic placement of microbes. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
31. Nguyen, L.T.; Schmidt, H.A.; von Haeseler, A.; Minh, B.Q. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **2015**, *32*, 268–274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
32. Hoang, D.T.; Chernomor, O.; von Haeseler, A.; Minh, B.Q.; Vinh, L.S. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 518–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
33. Letunic, I.; Bork, P. Interactive tree of life (iTOL) v3: An online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, W242–W245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
34. Gautreau, G.; Bazin, A.; Gachet, M.; Planel, R.; Burlot, L.; Dubois, M.; Perrin, A.; Médigue, C.; Calteau, A.; Cruveiller, S.; et al. PPanGGOLiN: Depicting microbial diversity via a partitioned pangenome graph. *PLoS Comput. Biol.* **2020**, *16*, e1007732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Overbeek, R.; Begley, T.; Butler, R.M.; Choudhuri, J.V.; Chuang, H.-Y.; Cohoon, M.; de Crécy-Lagard, V.; Diaz, N.; Disz, T.; Edwards, R.; et al. The subsystems approach to genome annotation and its use in the Project to Annotate 1000 Genomes. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 5691–5702. [[CrossRef](#)]
36. Doster, E.; Lakin, S.M.; Dean, C.J.; Wolfe, C.; Young, J.G.; Boucher, C.; Belk, K.E.; Noyes, N.R.; Morley, P.S. MEGARes 2.0: A database for classification of antimicrobial drug, biocide and metal resistance determinants in metagenomic sequence data. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D561–D569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Liu, B.; Zheng, D.; Zhou, S.; Chen, L.; Yang, J. VFDB 2022: A general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, D912–D917. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
38. Zhu, Q.; Gao, S.; Xiao, B.; He, Z.; Hu, S. Plasmer: An Accurate and Sensitive Bacterial Plasmid Prediction Tool Based on Machine Learning of Shared k-mers and Genomic Features. *Microbiol. Spectr.* **2023**, *11*, e0464522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
39. Kieft, K.; Zhou, Z.; Anantharaman, K. VIBRANT: Automated recovery, annotation and curation of microbial viruses, and evaluation of viral community function from genomic sequences. *Microbiome* **2020**, *8*, 90. [[CrossRef](#)]
40. Fernández-Ruiz, I.; Coutinho, F.H.; Rodriguez-Valera, F. Thousands of Novel Endolysins Discovered in Uncultured Phage Genomes. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
41. Klockgether, J.; Cramer, N.; Wiehlmann, L.; Davenport, C.F.; Tümmler, B. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*, 150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
42. Chopjitt, P.; Boueroy, P.; Jenjaroenpun, P.; Wongsurawat, T.; Hatrongjit, R.; Kerdsin, A.; Sunthamala, N. Genomic characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* clonal complex 17 isolated from urine in tertiary hospitals in Northeastern Thailand. *Front. Microbiol.* **2024**, *14*, 1278835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
43. Alghamdi, B.A.; Al-Johani, I.; Al-Shamrani, J.M.; Alshamrani, H.M.; Al-Otaibi, B.G.; Almazmomi, K.; Yusof, N.Y. Antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Saudi J. Biol. Sci.* **2023**, *30*, 103604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
44. Dey, S.; Gaur, M.; Sykes, E.M.E.; Prusty, M.; Elangovan, S.; Dixit, S.; Pati, S.; Kumar, A.; Subudhi, E. Unravelling the Evolutionary Dynamics of High-Risk *Klebsiella pneumoniae* ST147 Clones: Insights from Comparative Pangenome Analysis. *Genes* **2023**, *14*, 1037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
45. Mangas, E.L.; Rubio, A.; Álvarez-Marín, R.; Labrador-Herrera, G.; Pachón, J.; Pachón-Ibáñez, M.E.; Divina, F.; Pérez-Pulido, A.J. Pangenome of *Acinetobacter baumannii* uncovers two groups of genomes, one of them with genes involved in CRISPR/Cas defence systems associated with the absence of plasmids and exclusive genes for biofilm formation. *Microb. Genom.* **2019**, *5*, e000309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
46. Petit, R.A., 3rd; Read, T.D. *Staphylococcus aureus* viewed from the perspective of 40,000+ genomes. *PeerJ* **2018**, *6*, e5261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]

47. Tobin, L.A.; Jarocki, V.M.; Kenyon, J.; Drigo, B.; Donner, E.; Djordjevic, S.P.; Hamidian, M. Genomic analysis of diverse environmental *Acinetobacter* isolates identifies plasmids, antibiotic resistance genes, and capsular polysaccharides shared with clinical strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **2024**, *90*, e0165423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
48. Aguilar-Vera, A.; Bello-López, E.; Pantoja-Nuñez, G.I.; Rodríguez-López, G.M.; Morales-Erasto, V.; Castillo-Ramírez, S. *Acinetobacter junii*: An emerging One Health pathogen. *Mosphere* **2024**, *9*, e0016224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
49. Pal, C.; Bengtsson-Palme, J.; Rensing, C.; Kristiansson, E.; Larsson, D.G. BacMet: Antibacterial biocide and metal resistance genes database. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D737–D743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
50. Valls, M.; de Lorenzo, V. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol. Rev.* **2002**, *26*, 327–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Seiler, C.; Berendonk, T.U. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
52. López-Pérez, M.; Haro-Moreno, J.M.; Molina-Pardines, C.; Ventero, M.P.; Rodríguez, J.C. Genomic Characterization of Imipenem- and Imipenem-Relebactam-Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mosphere* **2021**, *6*, e0083621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
53. Loot, C.; Nivina, A.; Cury, J.; Escudero, J.A.; Ducos-Galand, M.; Bikard, D.; Rocha, E.P.; Mazel, D. Differences in Integron Cassette Excision Dynamics Shape a Trade-Off between Evolvability and Genetic Capacitance. *mBio* **2017**, *8*, e02296-16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Kos, V.N.; Déraspe, M.; McLaughlin, R.E.; Whiteaker, J.D.; Roy, P.H.; Alm, R.A.; Corbeil, J.; Gardner, H. The resistome of *Pseudomonas aeruginosa* in relationship to phenotypic susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 427–436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
55. Di Pierro, M.; Lu, R.; Uzzau, S.; Wang, W.; Margaretten, K.; Pazzani, C.; Maimone, F.; Fasano, A. Zonula occludens toxin structure-function analysis. Identification of the fragment biologically active on tight junctions and of the zonulin receptor binding domain. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 19160–19165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Murray, E.; Draper, L.A.; Ross, R.P.; Hill, C. The Advantages and Challenges of Using Endolysins in a Clinical Setting. *Viruses* **2021**, *13*, 680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

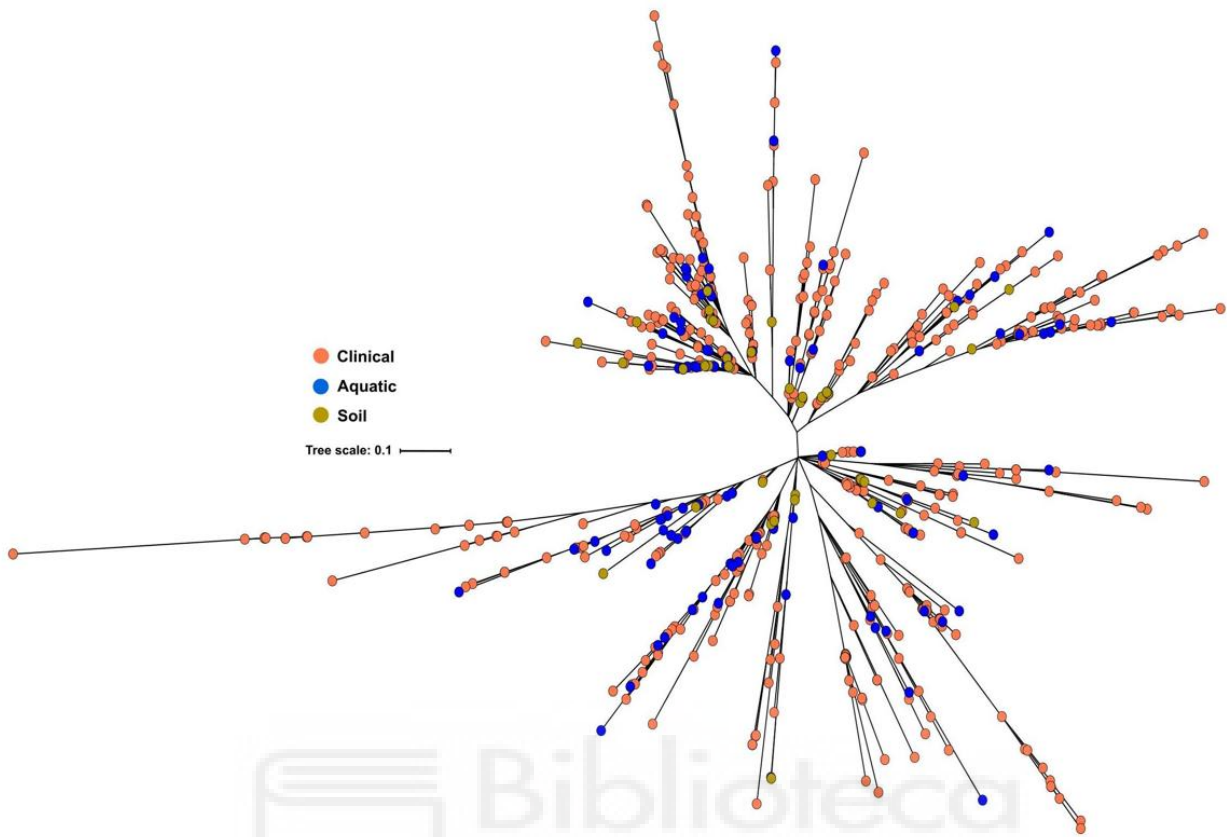


Figure S1. Maximum likelihood phylogenomic tree of the *Pseudomonas aeruginosa* genomes isolated in this study.

Table S1

<i>Species</i>	<i>Strain</i>	<i>Accession number</i>	<i>#Genes</i>	<i>Genome size (bp)</i>	<i>GC (%)</i>	<i>Intergenic spacer (bp)</i>	<i>Coding density</i>	<i>Isolation Source</i>
<i>P. aeruginosa</i>	1	SAMN10478389	6.273	6.679.489	66,1	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	2,1	SAMN10478390	5.742	6.207.090	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	3	SAMN10478391	6.057	6.484.938	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	4	SAMN10478392	6.035	6.479.257	66,3	61,5	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5	SAMN10478393	5.922	6.373.301	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6	SAMN10478394	5.715	6.211.425	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	7	SAMN10478395	6.346	6.820.007	66,1	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	8	SAMN10478396	6.053	6.489.996	66,4	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	9	SAMN10478397	6.322	6.789.856	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	10	SAMN10478398	5.691	6.218.905	66,4	65	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	11	SAMN10478399	6.452	6.831.519	66,1	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	12	SAMN10478400	6.421	6.911.040	66,1	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	13	SAMN10478401	5.853	6.375.951	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	14,1	SAMN10478402	5.816	6.305.515	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	14,2	SAMN10478403	6.359	6.807.216	66,2	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	15	SAMN10478404	5.975	6.396.764	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	16	SAMN10478405	6.481	6.843.059	65,9	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	17	SAMN10478406	5.637	6.062.020	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	18	SAMN10478407	6.321	6.776.010	66,1	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	19	SAMN10478408	5.971	6.341.946	66,2	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	20	SAMN10478409	5.784	6.314.457	66,6	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	21	SAMN10478410	5.747	6.207.123	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	22,1	SAMN10478411	5.797	6.246.202	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	22,2	SAMN10478412	6.056	6.549.897	66,2	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	1510	SAMN10484665	6.187	6.635.497	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	1590	SAMN10484666	6.233	6.678.504	66,2	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	1600	SAMN10484667	6.336	6.746.537	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	1622	SAMN10484672	6.422	6.811.669	66,2	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	1631	SAMN10484673	6.216	6.548.147	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	1638	SAMN10484674	5.889	6.335.041	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	1650	SAMN10484675	5.756	6.158.966	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	1653	SAMN10484676	5.818	6.307.533	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	1658	SAMN10484678	5.863	6.384.539	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	1689	SAMN10484682	6.462	6.939.580	66,0	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	2192	SAMN02595211	6.498	6.922.299	65,9	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5985	SAMN10478301	5.926	6.404.318	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5987	SAMN10478302	5.835	6.338.989	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5988,2	SAMN10478303	6.370	6.844.745	66,2	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5988,3	SAMN10478304	6.041	6.477.007	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5989	SAMN10478305	5.882	6.357.370	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5990,1	SAMN10478306	5.915	6.358.763	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5990,2	SAMN10478307	6.734	7.147.334	65,7	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5990,3	SAMN10478308	5.917	6.402.434	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5991	SAMN10478309	5.868	6.358.457	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5992	SAMN10478310	5.950	6.385.228	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5993	SAMN10478311	6.117	6.589.550	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5994	SAMN10478312	6.400	6.815.273	66,0	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5995	SAMN10478313	6.008	6.486.658	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5996	SAMN10478314	5.894	6.310.052	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5997	SAMN10478315	6.618	7.077.392	65,9	58	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5998	SAMN10478316	5.804	6.298.132	66,6	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5999,1	SAMN10478317	5.805	6.297.593	66,6	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5999,2	SAMN10478318	5.843	6.318.734	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5999,3	SAMN10478319	6.087	6.511.304	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6000,1	SAMN10478320	6.287	6.719.442	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6000,2	SAMN10478321	5.799	6.302.235	66,5	64	90	Human

Table S1

<i>P. aeruginosa</i>	6000,3	SAMN10478322	6.514	6.895.504	66,1	58	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6001	SAMN10478323	6.226	6.651.993	66,1	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6003	SAMN10478324	6.474	6.954.916	65,9	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6004	SAMN10478325	6.111	6.544.686	66,3	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6085	SAMN10478326	6.185	6.618.332	66,2	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6086,1	SAMN10478327	6.057	6.504.440	66,5	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6086,2	SAMN10478328	6.397	6.831.814	66,2	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6087	SAMN10478329	5.764	6.231.263	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6088	SAMN10478330	5.915	6.441.748	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6089	SAMN10478331	6.150	6.628.616	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6090	SAMN10478332	5.972	6.439.875	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6091	SAMN10478333	5.807	6.319.158	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6092,2	SAMN10478334	6.234	6.679.635	66,2	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6092,3	SAMN10478335	5.884	6.347.605	66,4	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6093	SAMN10478336	5.763	6.268.353	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6095	SAMN10478337	6.011	6.487.583	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6096	SAMN10478338	6.069	6.517.154	66,2	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6097,1	SAMN10478339	5.936	6.449.756	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6097,3	SAMN10478340	6.289	6.762.409	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6098	SAMN10478341	5.982	6.415.050	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6099	SAMN10478342	5.816	6.329.468	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6102	SAMN10478343	6.294	6.769.891	66,1	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	110238627	SAMN10478374	6.388	6.751.949	66,1	58	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	2032935751	SAMN10478363	6.175	6.576.117	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	2042723558	SAMN10478369	5.914	6.339.431	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	3020837212	SAMN10478382	5.836	6.230.429	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	3052425557	SAMN10478388	5.830	6.150.557	66,2	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	4044301968	SAMN10478362	6.053	6.461.345	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	4064320487	SAMN10478354	5.847	6.328.267	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	4064321111	SAMN10478360	5.886	6.336.865	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	4084334344	SAMN10478384	5.822	6.253.538	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	4084336477	SAMN10478387	5.898	6.355.037	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	4094341901	SAMN10478361	6.128	6.517.933	66,4	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	4094345258	SAMN10478350	5.894	6.319.222	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	4094345290	SAMN10478351	6.217	6.729.496	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	4104355315	SAMN10478385	6.032	6.457.151	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	4114358565	SAMN10478372	6.165	6.603.436	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	4124363505	SAMN10478344	5.914	6.460.302	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5014375233	SAMN10478386	6.047	6.430.803	66,3	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5014375428	SAMN10478380	6.123	6.515.569	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5023272159	SAMN10478379	6.485	6.898.158	66,0	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5024383182	SAMN10478381	6.243	6.692.578	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5034388513	SAMN10478358	6.235	6.588.605	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5054408352	SAMN10478373	5.922	6.441.038	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	9092533235	SAMN10478364	5.835	6.313.502	66,4	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	41004355322	SAMN10478347	5.872	6.327.593	66,4	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	001-5A	SAMN07424124	6.056	6.501.365	66,5	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	001-5B	SAMN07424125	5.873	6.319.076	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	001-6	SAMN07424126	5.806	6.320.716	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	010-4	SAMN07424134	6.334	6.753.910	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	014-2A	SAMN07424136	6.011	6.488.042	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	020MIC	SAMN07424139	6.048	6.530.891	66,3	61,5	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	0C4A-RP45	SAMN04256133	6.107	6.545.219	66,3	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	1042828174-21	SAMN10478368	6.071	6.558.087	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	128S180412BSL-PA2	SAMN10478145	5.763	6.263.575	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	136S260811BSL-PA1	SAMN10478146	5.756	6.255.383	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	136S260811BSL-PA2	SAMN10478147	6.072	6.516.290	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	136S260811BSL-PA3	SAMN10478148	6.149	6.652.020	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	144S190811BSL-PA1	SAMN10478149	6.121	6.567.128	66,3	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	144S190811BSL-PA2	SAMN10478150	6.312	6.735.241	66,1	61	90	Human

Table S1

<i>P. aeruginosa</i>	145S200511BSL-PA2	SAMN10478151	5.765	6.222.918	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	175S070312EX2DAY21-PA1	SAMN10478152	7.021	7.350.883	65,5	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	175S070312EX2DAY21-PA2	SAMN10478153	5.811	6.338.835	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	192S190811BSL-PA1	SAMN10478154	5.758	6.244.219	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	192S190811BSL-PA2	SAMN10478155	6.398	6.850.096	66,1	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	192S190811BSL-PA3	SAMN10478156	6.409	6.859.928	66,1	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	197S020911BSL-PA1	SAMN10478157	5.790	6.256.383	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	197S020911BSL-PA2	SAMN10478158	5.874	6.381.608	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	197S020911BSL-PA3	SAMN10478159	5.862	6.315.468	66,5	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	197S020911BSL-PA4	SAMN10478160	5.916	6.459.665	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	1BAE-KK1	SAMN05226628	5.957	6.492.407	66,3	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	201s070911bsl-PA1	SAMN10478161	5.804	6.293.421	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	201s070911bsl-PA2	SAMN10478162	5.772	6.245.941	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	259S240811BSL-PA1	SAMN10478163	6.496	6.994.546	65,9	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	259S240811BSL-PA2	SAMN10478164	5.808	6.294.628	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	266S141211BSL-PA1	SAMN10478165	6.013	6.451.066	66,4	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	272S250511BSL-PA1	SAMN10478166	6.646	7.028.181	65,8	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	274S010611BSL-PA1	SAMN10478167	5.814	6.337.920	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	278S180511BSL-PA1	SAMN10478168	5.885	6.394.600	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	278S180511BSL-PA2	SAMN10478169	6.256	6.744.864	66,2	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	286S270711BSL-PA1	SAMN10478170	5.805	6.297.634	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	293S080611BSL-PA1	SAMN10478171	5.778	6.247.750	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	293S080611BSL-PA2	SAMN10478172	5.734	6.192.913	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	295s071211BSL-PA1	SAMN10478173	6.649	7.031.223	65,8	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	295s071211BSL-PA2	SAMN10478174	5.987	6.471.685	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	298S020611BSL-PA1	SAMN10478175	6.437	6.852.331	66,0	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	29S030611BSL-PA1	SAMN10478140	5.777	6.245.484	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	2A42-U018A	SAMN05226614	6.019	6.512.494	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	2D9A-AUS23	SAMN05226616	5.787	6.254.783	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	2S030611BSL-PA1	SAMN10478139	6.159	6.638.608	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	313s141011BSL-PA1	SAMN10478176	6.021	6.454.131	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	318S170811BSL-PA1	SAMN10478177	5.887	6.289.631	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	318S170811BSL-PA2	SAMN10478178	5.818	6.264.146	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	320S290711BSL-PA1	SAMN10478179	6.164	6.601.684	66,2	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	320S290711BSL-PA2	SAMN10478180	5.891	6.332.663	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	326S290611BSL-PA1	SAMN10478181	6.345	6.776.755	66,2	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	326S290611BSL-PA2	SAMN10478182	6.017	6.494.837	66,4	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	326S290611BSL-PA3	SAMN10478183	6.062	6.483.513	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	333S200112BSL-PA1	SAMN10478184	5.865	6.312.238	66,5	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	37s051011BSL-PA1	SAMN10478141	6.017	6.519.630	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	3C52-TBCF10839	SAMN05226630	5.713	6.161.034	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	4012-C3719	SAMN05226617	6.429	6.912.213	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	4104355340-13	SAMN10478376	6.279	6.708.112	66,1	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	4104355340-15	SAMN10478375	5.817	6.255.257	66,6	62,5	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	4124363474-14	SAMN10478366	5.908	6.457.902	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	4124363474-15	SAMN10478365	6.051	6.485.699	66,4	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	44s031011BSL-PA1	SAMN10478142	6.421	6.897.953	66,0	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	44s031011BSL-PA2	SAMN10478143	6.362	6.772.074	66,2	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5024379144-14	SAMN10478348	6.242	6.580.210	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5024379144-15	SAMN10478349	5.827	6.239.781	66,6	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5024382738-25	SAMN10478378	6.471	6.901.493	66,0	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5024382738-26	SAMN10478377	5.864	6.333.536	66,3	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5024382749-13	SAMN10478370	6.427	6.851.057	66,1	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5024382749-14	SAMN10478371	5.912	6.398.902	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5034388498-20	SAMN10478352	6.220	6.545.379	66,3	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5034388498-21	SAMN10478353	6.246	6.529.487	66,1	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5054407658-16	SAMN10478345	5.774	6.273.958	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5054408350-18	SAMN10478355	6.050	6.460.764	66,5	61	90	Human

Table S1

<i>P. aeruginosa</i>	5054408350-20	SAMN10478356	5.965	6.416.686	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5054408350-22	SAMN10478357	5.787	6.268.050	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	5BR2	SAMN07424046	6.183	6.635.462	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6822-NH57388A	SAMN05226610	5.805	6.170.765	66,5	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6D92-AMT0023-30	SAMN05226621	5.765	6.258.177	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6D92-AMT0023-34	SAMN05226622	6.099	6.589.375	66,2	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6D92-AMT0060-1	SAMN05226602	5.766	6.234.996	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6D92-AMT0060-2	SAMN05226603	5.800	6.248.425	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	6D92-AMT0060-3	SAMN05226604	6.028	6.458.237	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	A3	SAMN07424142	5.812	6.297.374	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AA43	SAMN07424216	6.247	6.733.675	66,1	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AA44	SAMN07424217	6.709	7.073.135	65,9	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AES1M	SAMN11087507	6.064	6.483.673	66,4	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AES1R	SAMN11087508	5.933	6.360.730	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AF9A-AA2	SAMN05226620	6.406	6.782.443	65,8	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AL191	SAMN07424242	6.465	6.919.408	66,1	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AL363	SAMN07424243	6.207	6.583.801	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AL561	SAMN07424244	5.825	6.336.017	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AMT0005-1	SAMN07424009	6.296	6.683.163	66,1	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AMT0005-135	SAMN10478460	6.035	6.457.225	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AMT0005-136	SAMN10478461	6.033	6.457.482	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AMT0005-137	SAMN10478462	5.877	6.307.452	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AMT0005-138	SAMN07424010	6.234	6.737.817	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AMT0006-1	SAMN07424011	5.901	6.402.658	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AMT0006-64	SAMN10478463	5.932	6.366.246	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AMT0006-65	SAMN10478464	6.467	6.837.226	66,1	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AMT0006-66	SAMN07424012	5.964	6.492.423	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AMT0020-83	SAMN10478465	6.271	6.771.434	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AMT0020-84	SAMN07424013	6.668	7.132.446	65,9	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AMT0026-1	SAMN10478466	5.770	6.161.159	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AMT0026-2	SAMN10478467	5.863	6.374.732	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AMT0026-3	SAMN07424015	6.340	6.754.954	66,0	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AMT0026-67	SAMN07424016	6.456	6.942.569	66,0	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AMT0046-1	SAMN07424017	6.072	6.478.237	66,4	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AMT0046-107	SAMN10478468	6.230	6.706.713	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AMT0046-108	SAMN10478469	6.546	7.036.422	66,0	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AMT0046-109	SAMN07424018	5.843	6.331.580	66,4	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AMT0047-125	SAMN10478470	6.277	6.678.836	66,3	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AMT0047-2	SAMN10478471	6.168	6.518.682	66,4	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AT19	SAMN07423904	5.683	6.085.437	66,5	65	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AT31	SAMN07423905	5.938	6.391.795	66,4	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AT40	SAMN07423906	5.756	6.246.746	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AT7	SAMN07423903	5.847	6.315.570	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU10014	SAMN04436462	6.289	6.832.062	66,1	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU10241	SAMN04436468	5.742	6.207.735	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU10272	SAMN04436484	6.879	7.223.943	65,6	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU10409	SAMN04436485	6.110	6.586.577	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU10410	SAMN04436486	5.845	6.352.146	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU10502	SAMN04436493	6.004	6.449.216	66,4	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU10583	SAMN04436480	6.591	7.010.352	65,9	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU10658	SAMN04436503	6.032	6.456.847	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU10713	SAMN04436507	6.498	6.905.035	66,0	59,5	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU10714	SAMN04436464	5.674	6.166.093	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU10756	SAMN04436512	6.478	6.909.742	66,2	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU11866	SAMN04436465	6.187	6.564.509	66,3	58	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU11990	SAMN04436494	6.473	6.927.033	66,1	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU11991	SAMN04436495	6.058	6.460.085	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU1215	SAMN04436518	5.782	6.249.387	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU12175	SAMN04436473	6.055	6.476.747	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU12424	SAMN04436496	5.852	6.332.026	66,5	62	90	Human

Table S1

<i>P. aeruginosa</i>	AU12528	SAMN04436490	5.970	6.459.530	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU13210	SAMN04436500	6.037	6.456.825	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU13212	SAMN04436474	6.050	6.485.123	66,4	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU13213	SAMN04436475	6.035	6.458.123	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU13626	SAMN04436520	6.044	6.484.000	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU14820	SAMN04436515	6.340	6.785.781	66,2	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU15431	SAMN04436478	6.040	6.457.185	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU16821	SAMN04436488	6.157	6.603.073	66,1	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU16960	SAMN04436476	6.047	6.461.323	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU17091	SAMN04436504	6.537	6.962.776	66,0	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU17550	SAMN04436508	5.943	6.473.949	66,4	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU17907	SAMN04436491	5.765	6.291.549	66,6	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU17965	SAMN04436516	6.217	6.645.531	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU18068	SAMN04436481	6.523	6.979.824	65,9	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU18132	SAMN04436509	6.365	6.707.393	66,3	58	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU18274	SAMN04436497	6.036	6.457.075	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU19319	SAMN04436510	5.973	6.453.600	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU19803	SAMN04436501	6.033	6.457.311	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU19804	SAMN04436502	6.245	6.747.333	66,0	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU20671	SAMN04436513	5.722	6.254.025	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU20916	SAMN04436471	6.173	6.638.338	66,3	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU21076	SAMN04436505	6.052	6.481.082	66,4	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU2342	SAMN04436466	6.220	6.685.036	66,1	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU23529	SAMN04436517	5.775	6.270.739	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU24156	SAMN04436482	6.237	6.646.313	66,3	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU24526	SAMN04436511	6.293	6.779.313	66,1	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU24787	SAMN04436522	6.448	6.890.506	66,1	58	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU24807	SAMN04436514	5.735	6.261.427	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU25116	SAMN04436498	5.913	6.428.916	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU25210	SAMN04436506	6.009	6.449.966	66,4	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU5471	SAMN04436467	6.705	7.056.438	65,9	57	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU6462	SAMN04436460	6.031	6.456.412	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU6854	SAMN04436469	6.113	6.631.256	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU6923	SAMN04436472	5.941	6.448.843	66,5	63,5	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU7032	SAMN04436477	6.370	6.799.666	66,1	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU7033	SAMN04436479	6.053	6.461.922	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU7198	SAMN04436483	6.604	7.050.445	65,8	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU7511	SAMN04436519	5.826	6.328.630	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU8251	SAMN04436489	5.867	6.378.241	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU9017	SAMN04436492	5.920	6.372.765	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU9381	SAMN04436461	5.778	6.245.212	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU9739	SAMN04436470	6.549	6.981.228	66,1	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AU9899	SAMN04436499	6.245	6.747.392	66,2	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS021	SAMN07424000	6.245	6.645.905	66,1	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS026	SAMN07423951	6.124	6.563.825	66,3	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS029	SAMN07423952	5.959	6.390.455	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS050	SAMN07423990	5.770	6.267.007	66,6	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS054	SAMN07423954	6.227	6.714.204	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS058	SAMN07423944	5.941	6.431.042	66,4	63,5	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS066	SAMN07423955	6.146	6.625.618	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS073	SAMN07423956	6.121	6.563.056	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS074	SAMN10478455	6.108	6.580.246	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS077	SAMN07423957	6.150	6.652.377	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS083	SAMN07423929	5.908	6.357.016	66,2	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS088	SAMN07423930	5.935	6.414.270	66,2	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS089	SAMN07423958	5.948	6.386.725	66,4	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS093	SAMN07423959	6.304	6.770.315	66,1	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS105	SAMN07423961	5.770	6.286.436	66,6	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS106	SAMN07423962	5.897	6.299.454	66,5	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS127	SAMN07423909	5.773	6.254.622	66,5	64	90	Human

Table S1

<i>P. aeruginosa</i>	AUS148	SAMN07423969	6.236	6.707.813	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS304	SAMN07423950	5.959	6.423.746	66,2	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS305	SAMN07424003	6.034	6.547.600	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS327	SAMN07423943	5.864	6.361.123	66,4	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS434	SAMN07423991	5.931	6.430.363	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS436	SAMN07423992	5.819	6.330.814	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS476	SAMN07423933	5.731	6.230.198	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS537	SAMN07423989	6.018	6.477.516	66,3	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS595	SAMN07423997	6.268	6.772.453	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS631	SAMN07423986	6.001	6.434.446	66,5	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS674	SAMN07423987	6.354	6.801.841	66,2	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS675	SAMN07423988	6.583	7.042.773	65,9	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS702	SAMN07423953	5.800	6.321.377	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS717	SAMN10478459	6.157	6.648.917	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS719	SAMN07424008	5.804	6.280.595	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS720	SAMN07424007	6.010	6.488.203	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AUS727	SAMN10478458	5.846	6.316.805	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AZPAE12140	SAMN03105384	6.138	6.652.899	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AZPAE12145	SAMN03105388	5.759	6.228.253	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AZPAE12146	SAMN03105389	5.855	6.298.080	66,6	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AZPAE12148	SAMN03105391	5.702	6.216.181	66,4	63,5	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AZPAE12151	SAMN03105394	6.209	6.711.738	66,3	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AZPAE12153	SAMN03105396	5.857	6.292.018	66,6	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AZPAE12411	SAMN03105402	6.281	6.774.279	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	AZPAE12417	SAMN03105408	6.804	7.266.549	65,6	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	B2	SAMN07424143	5.777	6.304.194	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	BJ2	SAMN10478557	6.050	6.461.547	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	BJ4	SAMN10478555	5.834	6.342.034	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	C3	SAMN07424144	5.709	6.214.900	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	C3128	SAMN07424047	5.767	6.235.426	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	C5311	SAMN07424041	5.880	6.365.139	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	CF-PA39	SAMN02602860	6.338	6.825.531	66,0	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	CF127	SAMN07424192	6.192	6.650.818	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	CF18	SAMN02360661	5.892	6.336.404	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	CF27	SAMN07424191	5.833	6.334.362	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	CF39S	SAMN13226654	5.996	6.453.669	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	CF5	SAMN02360663	6.424	6.814.164	66,2	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	CF614	SAMN02360752	5.993	6.469.758	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	CF77	SAMN02360751	6.167	6.540.511	66,3	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	CI27	SAMN13781155	6.150	6.647.227	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	DK2	SAMN02603895	6.399	6.836.271	66,1	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	DUN-001-2A	SAMN07424119	6.457	6.934.933	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	DUN-001-2B	SAMN07424120	6.100	6.578.955	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	DUN-001-3A	SAMN07424121	5.990	6.489.491	66,3	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	DUN-001-3B	SAMN07424122	6.071	6.528.021	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	DUN-001-4	SAMN07424123	5.789	6.301.321	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	DUN-001A	SAMN07424141	6.308	6.806.204	66,1	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	DUN-001B	SAMN07424117	6.201	6.519.696	66,1	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	DUN-001C	SAMN07424118	6.182	6.636.735	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	DUN-002C	SAMN07424127	6.534	6.948.779	66,1	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	DUN-003B	SAMN07424128	5.915	6.441.383	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	DUN-004	SAMN07424129	6.500	6.941.092	66,1	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	DUN-006	SAMN07424130	6.340	6.749.760	66,2	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	DUN-007-2	SAMN07424131	5.801	6.281.608	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	DUN-008	SAMN07424132	6.162	6.545.027	66,5	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	DUN-009B	SAMN07424133	5.917	6.389.983	66,2	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	DUN-013	SAMN07424135	6.566	6.972.769	65,9	58	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	DUN-015A	SAMN07424137	5.856	6.363.508	66,3	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	DUN-018	SAMN07424138	6.215	6.649.518	66,2	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	DUN-024-1	SAMN07424140	6.271	6.773.468	66,2	61	90	Human

Table S1

<i>P. aeruginosa</i>	E2-H133420224	SAMN07424146	5.926	6.374.202	66,4	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	E82A-AES-1R	SAMN05226618	6.657	7.025.945	65,8	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	EC22-AUS52	SAMN05226619	5.976	6.438.830	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	EC2A-CHA	SAMN05226623	5.879	6.362.159	66,4	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	F2	SAMN07424147	5.868	6.373.369	66,5	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	F69A-IST27	SAMN05226606	6.391	6.818.673	66,2	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	F69A-IST27N	SAMN05226607	6.048	6.480.850	66,4	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	FLR01	SAMN08559939	5.883	6.287.159	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	FM4	SAMN10478558	6.240	6.797.445	65,7	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	FRD1	SAMN02732380	5.981	6.410.239	66,4	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	G2	SAMN07424148	6.313	6.798.665	66,2	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	H3	SAMN07424149	5.878	6.397.779	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	HCF100	SAMN10478546	6.049	6.460.053	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	HCF19	SAMN10478542	6.034	6.457.473	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	HCF238	SAMN10478547	6.033	6.457.225	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	HCF331	SAMN10478548	6.019	6.524.053	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	HCF336	SAMN10478549	6.014	6.509.070	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	HCF367	SAMN10478550	6.056	6.485.290	66,4	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	HCF410	SAMN10478551	6.039	6.543.350	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	HCF483	SAMN10478543	6.051	6.462.066	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	HCF5	SAMN10478552	6.032	6.457.565	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	HCF55	SAMN10478544	6.051	6.461.161	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	HCF591	SAMN10478553	6.035	6.457.174	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	HCF73	SAMN10478554	6.034	6.527.005	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	HCF86	SAMN10478545	6.049	6.461.439	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	HJ2	SAMN10478528	6.011	6.455.927	66,4	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	JD303	SAMN07424095	6.380	6.825.418	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LES400	SAMN03081517	5.772	6.242.584	66,3	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LESB58	SAMEA1705916	5.816	6.255.564	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LESB65	SAMN03081518	5.852	6.290.391	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LESlike1	SAMN03081519	5.953	6.424.229	66,4	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LESlike4	SAMN03081520	5.947	6.436.875	66,5	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LESlike5	SAMN03081515	5.772	6.212.830	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LESlike7	SAMN03081516	6.078	6.464.084	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LiP10a	SAMN07424163	6.004	6.435.223	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LiP10b	SAMN07424164	5.678	6.170.165	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LiP11	SAMN07424165	6.157	6.604.290	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LiP12	SAMN07424166	5.982	6.468.168	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LiP13	SAMN07424167	5.926	6.405.151	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LiP14	SAMN07424168	5.789	6.273.428	66,6	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LiP1a	SAMN07424150	6.347	6.829.312	66,0	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LiP1c	SAMN07424151	5.758	6.211.991	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LiP1d	SAMN07424152	6.011	6.448.008	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LiP2a	SAMN07424153	6.369	6.713.302	66,3	58	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LiP2b	SAMN07424154	5.750	6.211.156	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LiP2c	SAMN07424155	5.914	6.413.097	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LiP3	SAMN07424156	5.677	6.156.005	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LiP4	SAMN07424157	6.192	6.663.122	66,2	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LiP5	SAMN07424158	6.256	6.644.782	66,1	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LiP6	SAMN07424159	6.305	6.781.582	66,2	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LiP7	SAMN07424160	5.867	6.360.335	66,4	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LiP8	SAMN07424161	5.951	6.426.617	66,3	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	LiP9	SAMN07424162	5.861	6.381.915	66,5	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	MCF104	SAMN10478525	5.978	6.452.923	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	MCF134	SAMN10478522	5.908	6.341.911	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	MCF149	SAMN10478523	5.786	6.257.042	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	MCF178	SAMN10478524	5.698	6.187.270	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	MCF182	SAMN10478526	5.977	6.403.460	66,4	61,5	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	MCF199	SAMN10478527	5.984	6.406.472	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	MCF206	SAMN10478516	5.931	6.422.016	66,5	61	90	Human

Table S1

<i>P. aeruginosa</i>	MCF430	SAMN10478518	5.849	6.321.864	66,4	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	MCF879	SAMN10478519	5.848	6.264.463	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	MCF922	SAMN10478520	6.178	6.688.523	66,1	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	MSB2949	SAMN07424100	5.873	6.321.358	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	MSB3405	SAMN07424102	6.248	6.572.055	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	NN5	SAMN10478560	6.246	6.712.339	66,1	62	89	Human
<i>P. aeruginosa</i>	OY15	SAMN10478561	6.411	7.031.979	65,6	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	OY3	SAMN10478556	6.037	6.457.488	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PA100	SAMN08435075	6.639	7.025.510	66,0	58	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PA102	SAMN08435076	6.078	6.570.270	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	Pa538	SAMN05194774	6.120	6.504.857	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PA55	SAMN08435068	6.688	7.110.697	65,8	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PA57	SAMN08435069	5.987	6.472.552	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PA59	SAMN08435070	5.922	6.404.090	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PA64	SAMN08435071	5.935	6.373.139	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PA66	SAMN08435072	5.905	6.403.010	66,5	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PA86	SAMN08435073	6.396	6.881.045	65,9	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PA92	SAMN08435074	5.959	6.373.893	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC106A	SAMN10478204	6.207	6.635.028	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC107A	SAMN10478200	5.967	6.423.108	66,2	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC108A	SAMN10478230	6.427	6.894.145	66,0	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC10A	SAMN10478198	6.209	6.632.614	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC10B	SAMN10478199	5.980	6.409.928	66,4	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC112A	SAMN10478249	5.847	6.337.735	66,2	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC115A	SAMN10478231	6.277	6.775.321	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC117A	SAMN10478208	6.207	6.635.616	66,3	61,5	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC117B	SAMN10478209	6.030	6.423.934	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC118A	SAMN10478232	5.963	6.341.036	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC11A	SAMN10478201	6.215	6.634.644	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC127A	SAMN10478245	5.896	6.353.322	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC127B	SAMN10478246	5.986	6.462.207	66,5	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC13A	SAMN10478205	6.357	6.740.949	66,2	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC13B	SAMN10478206	6.184	6.637.252	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC13C	SAMN10478207	5.850	6.240.563	66,6	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC14B	SAMN10478210	5.900	6.356.852	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC15A	SAMN10478211	6.156	6.539.801	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC15B	SAMN10478212	5.811	6.257.108	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC17A	SAMN10478213	5.858	6.260.665	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC18A	SAMN10478216	6.165	6.490.208	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC18B	SAMN10478217	5.962	6.434.352	66,2	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC22A	SAMN10478222	6.651	7.025.745	65,9	58	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC23A	SAMN10478225	5.853	6.373.317	66,4	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC31A	SAMN10478233	5.824	6.301.508	66,4	65	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC31B	SAMN10478234	5.786	6.277.349	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC33A	SAMN10478218	6.180	6.661.370	66,3	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC33B	SAMN10478219	5.824	6.262.596	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC38A	SAMN10478243	6.258	6.793.482	66,2	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC38B	SAMN10478244	6.187	6.508.051	66,2	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC39A	SAMN10478192	6.106	6.591.121	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC42A	SAMN10478235	5.808	6.319.729	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC44A	SAMN10478226	5.657	6.131.278	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC44B	SAMN10478227	6.140	6.637.833	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC44C	SAMN10478228	6.275	6.775.217	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC44D	SAMN10478229	6.098	6.579.993	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC46A	SAMN10478188	6.031	6.431.751	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC54A	SAMN10478185	5.826	6.252.894	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC56A	SAMN10478214	5.902	6.352.023	66,3	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC56B	SAMN10478215	5.880	6.321.329	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC5A	SAMN10478186	5.863	6.365.570	66,4	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC5B	SAMN10478187	6.032	6.493.785	66,4	61	90	Human

Table S1

<i>P. aeruginosa</i>	PAC60A	SAMN10478247	6.185	6.581.665	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC61A	SAMN10478189	5.909	6.357.928	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC6A	SAMN10478190	6.041	6.479.244	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC6B	SAMN10478191	6.272	6.703.150	66,2	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC70A	SAMN10478236	6.030	6.460.976	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC70B	SAMN10478237	6.182	6.596.134	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC74A	SAMN10478193	5.966	6.492.006	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC76A	SAMN10478248	5.820	6.307.339	66,6	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC78A	SAMN10478220	5.803	6.284.126	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC78B	SAMN10478221	6.010	6.487.905	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC79A	SAMN10478202	6.232	6.692.467	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC79B	SAMN10478203	6.217	6.639.588	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC80A	SAMN10478238	5.798	6.295.265	66,6	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC81A	SAMN10478250	6.275	6.644.537	66,3	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC81B	SAMN10478251	5.938	6.419.833	66,3	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC84A	SAMN10478223	5.970	6.433.177	66,4	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC91A	SAMN10478252	6.101	6.559.453	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC93A	SAMN10478194	6.052	6.503.267	66,5	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC93B	SAMN10478195	5.979	6.426.421	66,2	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC93C	SAMN10478196	6.167	6.627.445	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC94A	SAMN10478224	6.492	6.995.916	66,0	58,5	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC95A	SAMN10478253	6.145	6.614.037	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC95B	SAMN10478254	6.031	6.493.470	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC97A	SAMN10478255	5.874	6.332.802	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC98A	SAMN10478239	5.810	6.250.327	66,6	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC98B	SAMN10478240	5.863	6.293.365	66,4	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC98C	SAMN10478241	5.861	6.320.793	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC98D	SAMN10478242	6.399	6.848.676	66,0	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PAC9A	SAMN10478197	6.454	6.932.436	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PACS2	SAMN02471994	6.223	6.686.360	66,2	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PADK2-CF510	SAMN02471032	5.762	6.228.966	66,5	63,5	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	PD1	SAMN10478531	6.034	6.457.015	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	RP73	SAMN02603771	6.376	6.878.170	66,0	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	S1983	SAMN07424101	6.113	6.564.029	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	S2239-15	SAMN07424097	6.182	6.639.549	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	S2239-16	SAMN07424098	6.185	6.639.398	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	S2820	SAMN07424099	5.779	6.272.404	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SC1	SAMN10478559	5.930	6.535.601	66,0	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SCH-ABX01	SAMN06289359	5.926	6.365.830	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SCH-ABX03	SAMN06289361	5.877	6.368.433	66,3	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SCH-ABX04	SAMN06289362	5.945	6.472.836	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SCH-ABX05	SAMN06289363	5.864	6.370.153	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SCH-ABX06	SAMN06289364	5.432	5.820.849	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SCH-ABX07	SAMN06289365	6.058	6.426.292	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SCH-ABX08	SAMN06289366	5.894	6.354.785	66,4	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SCH-ABX09	SAMN06289367	5.850	6.353.987	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SCH-ABX10	SAMN06289368	5.667	6.086.002	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SCH-ABX11	SAMN06289369	5.906	6.453.591	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SCH-ABX12	SAMN06289370	5.857	6.285.478	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SCH-ABX13	SAMN06289371	5.870	6.362.596	66,4	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SCH-ABX15	SAMN06289373	6.149	6.578.688	66,4	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SCH-ABX16	SAMN06289374	5.859	6.341.100	66,3	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SCH-ABX17	SAMN06289375	6.113	6.576.408	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SCH-ABX18	SAMN06289376	5.733	6.200.519	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SCH-ABX19	SAMN06289377	5.841	6.319.009	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SCH-ABX20	SAMN06289378	5.766	6.267.491	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SCV20265	SAMN02415141	6.655	7.136.584	65,9	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SMC1585	SAMN10478566	5.786	6.248.039	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SMC1587	SAMN10478567	6.223	6.733.997	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SMC1595	SAMN10478568	6.086	6.501.395	66,4	61	90	Human

Table S1

<i>P. aeruginosa</i>	SMC1596	SAMN10478569	6.347	6.818.586	66,2	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SMC5450	SAMN10478570	5.779	6.245.434	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SMC5451	SAMN10478571	6.342	6.777.246	66,2	59	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	SS1	SAMN10478530	5.744	6.250.380	66,6	62	91	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-105	SAMN05272445	5.867	6.379.256	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-106	SAMN05272446	6.040	6.456.318	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-109	SAMN05272447	6.010	6.487.070	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-13	SAMN05272429	6.035	6.457.274	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-133	SAMN05272449	5.764	6.257.647	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-133-1	SAMN05272450	5.833	6.327.698	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-14	SAMN05272430	6.243	6.723.131	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-151	SAMN05272451	5.855	6.359.410	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-154	SAMN05272453	6.108	6.564.031	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-155	SAMN05272454	6.226	6.730.415	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-155-1	SAMN05272455	6.031	6.477.494	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-16	SAMN05272431	6.278	6.774.060	66,2	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-167	SAMN05272457	6.176	6.639.111	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-167-1	SAMN05272458	5.819	6.326.372	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-176	SAMN05272461	5.789	6.247.925	66,3	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-23	SAMN05272432	6.287	6.778.852	66,1	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-23M	SAMN05272433	5.901	6.351.198	66,5	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-32	SAMN05272434	6.463	6.861.787	66,1	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-42	SAMN05272436	5.777	6.311.893	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-42M	SAMN05272437	5.838	6.334.716	66,5	61,5	91	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-49M	SAMN05272438	6.086	6.574.716	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-68	SAMN05272439	6.043	6.481.532	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-69	SAMN05272440	5.683	6.144.291	66,6	64	91	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-76	SAMN05272441	6.042	6.441.026	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	TNCF-88M	SAMN05272443	6.149	6.608.032	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	U0272B	SAMN07424103	6.177	6.636.305	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	U0284	SAMN07424104	5.882	6.309.437	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	U0288B	SAMN07424105	5.860	6.360.242	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	U0306	SAMN07424106	5.948	6.401.058	66,4	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	U0310A	SAMN07424107	6.202	6.641.588	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	U0330A	SAMN07424108	6.180	6.499.229	66,2	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	U350	SAMN07424109	6.338	6.712.367	66,2	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	U372	SAMN07424110	5.873	6.268.083	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	U397A	SAMN07424111	6.204	6.634.105	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	U413A	SAMN07424112	6.126	6.487.674	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	U421	SAMN07424113	5.873	6.321.192	66,5	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	U435	SAMN07424114	6.135	6.475.849	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	U451	SAMN07424115	6.202	6.633.884	66,3	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	U454A	SAMN07424116	5.795	6.299.581	66,5	63	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	WH-SGI-V-07279	SAMN04128722	6.050	6.558.667	66,2	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	WH-SGI-V-07280	SAMN04128723	6.135	6.648.956	66,2	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	WH-SGI-V-07282	SAMN04128725	5.956	6.408.829	66,4	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	Zw115	SAMN10478539	6.033	6.457.055	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	Zw31	SAMN10478533	6.069	6.480.016	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	Zw49	SAMN10478534	6.054	6.461.179	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	Zw5	SAMN10478540	6.055	6.461.590	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	Zw64	SAMN10478535	6.036	6.456.389	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	Zw64-2	SAMN10478562	5.981	6.360.200	66,3	60	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	Zw70	SAMN10478541	6.041	6.456.857	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	Zw73-1	SAMN10478565	6.443	7.028.189	65,7	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	Zw73-2	SAMN10478563	5.721	6.193.644	66,6	64	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	Zw75-2	SAMN10478564	6.167	6.650.984	66,3	62	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	Zw9	SAMN10478538	6.037	6.457.038	66,5	61	90	Human
<i>P. aeruginosa</i>	62	SAMN10478502	5.909	6.375.524	66,5	61	91	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	A39-1	SAMN17207384	5.735	6.224.023	66,5	64	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	BT1-2.2	SAMN13164795	6.076	6.464.988	66,4	61	90	Soil

Table S1

<i>P. aeruginosa</i>	D-2	SAMN29762331	5.760	6.222.092	66,5	64	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	DN1	SAMN05717682	5.966	6.520.277	66,3	61	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	env006b	SAMN07504775	5.822	6.288.827	66,4	64	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	env105	SAMN07504796	6.549	6.930.101	65,9	58	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	env199	SAMN07504825	5.927	6.385.725	66,5	61	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	env202	SAMN07504827	5.840	6.364.446	66,5	62	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	env203	SAMN07504828	5.811	6.423.038	66,2	65	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	env210	SAMN07504831	5.819	6.260.743	66,5	64	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	F13	SAMN29513587	6.369	6.867.314	66,0	61	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	H20	SAMN26226229	6.185	6.588.850	66,2	62	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	HT-3	SAMN17525990	5.952	6.435.706	66,5	61	91	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	HU20	SAMN26182822	6.100	6.527.136	66,3	60	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	JB2	SAMN08524370	5.964	6.429.225	66,4	62	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	JCM-5962	SAMN22401823	5.736	6.222.453	66,5	64	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	JMM	SAMN02745922	5.912	6.366.529	66,4	62	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	JT86	SAMN16275376	5.798	6.321.272	66,5	64	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	KT1115	SAMN13698088	5.982	6.478.686	66,4	61	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	LG-1	SAMN28593740	6.007	6.545.433	65,9	60	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	LICME-WGH-6	SAMN18536858	5.962	6.437.011	66,4	63	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	N17-1	SAMN03145716	5.740	6.223.053	66,5	64	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	NA04	SAMN06546651	5.959	6.426.518	66,4	61	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	Pa608	SAMN23553085	6.065	6.474.747	66,3	61	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	Pae100	SAMN07286073	5.952	6.436.962	66,4	63	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	Pae102	SAMN07286074	5.958	6.444.492	66,4	61,5	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	Pae110	SAMN07424094	5.847	6.370.730	66,4	63	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	Pae111	SAMN07286076	5.897	6.373.592	66,5	61	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	Pae112	SAMN07286077	6.568	6.959.251	65,9	58	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	RK1	SAMN26521564	5.738	6.223.377	66,5	64	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	Rsan-ver	SAMN07424020	6.017	6.481.839	66,3	60	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	S14b	SAMN07504854	6.413	6.841.857	66,2	58	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	S1e	SAMN07504848	5.956	6.426.924	66,4	61	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	S1f	SAMN07504849	6.049	6.460.498	66,4	61	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	S1g	SAMN07504850	5.970	6.436.990	66,5	61	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	S1h	SAMN07504851	6.071	6.474.249	66,3	61	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	S20b	SAMN07504855	5.953	6.426.620	66,4	61	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	S25b-2	SAMN07504857	5.713	6.211.544	66,5	64	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	S8b-1	SAMN07504852	5.881	6.374.121	66,6	64	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	SF416	SAMN35005130	5.895	6.443.146	66,3	63	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	SJTD-1	SAMN02470939	5.845	6.331.118	66,4	62	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	SJU-S6-1	SAMN07504876	6.054	6.602.988	66,1	64	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	SJU-S6-2	SAMN07504877	5.734	6.223.177	66,5	64	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	SJU-S6-3	SAMN07504878	6.099	6.471.987	66,3	61	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	SJU-S72-1	SAMN07504882	5.928	6.445.785	66,4	64	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	SJU-S72-2	SAMN07504883	6.046	6.460.961	66,4	61	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	SJU-S72-3	SAMN07504884	5.819	6.333.791	66,5	64	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	SJU-S79-1	SAMN07504885	5.841	6.376.164	66,5	62	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	SJU-S79-2	SAMN07504886	6.045	6.460.493	66,4	61	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	SJU-S79-3	SAMN07504887	6.075	6.472.664	66,3	61	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	SJU-S9-1	SAMN07504879	5.929	6.391.415	66,5	60	91	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	SJU-S9-2	SAMN07504880	5.749	6.224.153	66,5	64	91	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	SJU-S9-3	SAMN07504881	5.678	6.243.825	66,5	64	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	UTDF19-28A	SAMN23567015	5.752	6.241.960	66,5	64	90	Soil
<i>P. aeruginosa</i>	3C1A-Jpn1563	SAMN05226611	6.002	6.558.573	66,3	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS110	SAMN10478427	6.585	7.093.729	65,8	64	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS122	SAMN10478429	6.043	6.505.559	66,4	59	91	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS128	SAMN10478431	6.522	6.966.658	66,0	59	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS136	SAMN10478432	5.883	6.424.838	66,4	63	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS141	SAMN10478435	5.884	6.419.919	66,4	65	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS153	SAMN10478436	6.597	6.961.442	65,9	57	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS155	SAMN10478437	6.154	6.636.240	66,2	62	90	Aquatic

Table S1

<i>P. aeruginosa</i>	AUS156	SAMN10478438	5.739	6.267.846	66,6	64	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS174	SAMN10478441	6.424	6.875.213	65,9	59	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS175	SAMN10478442	6.600	6.939.358	66,0	58	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS209	SAMN10478413	5.826	6.350.605	66,4	64	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS221	SAMN10478415	6.910	7.269.899	65,7	56	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS222	SAMN10478417	6.005	6.454.488	66,4	60	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS226	SAMN10478419	6.050	6.489.699	66,3	60	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS227	SAMN10478420	6.036	6.507.792	66,5	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS306	SAMN07423940	6.014	6.488.364	66,4	62	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS311	SAMN10478434	5.862	6.354.398	66,5	62	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS328	SAMN07423941	5.991	6.464.034	66,4	62	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS339	SAMN07423939	5.825	6.300.843	66,5	62	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS343	SAMN07423931	6.280	6.780.806	66,2	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS355	SAMN07423947	6.127	6.671.598	66,3	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS438	SAMN07423918	5.888	6.369.901	66,4	63	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS449	SAMN10478454	6.608	6.975.512	66,0	57	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS452	SAMN10478421	6.268	6.650.261	66,3	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS465	SAMN07423917	5.873	6.397.592	66,4	63	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS500	SAMN10478447	6.238	6.718.119	66,3	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS501	SAMN10478448	6.504	6.914.139	66,0	58	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS502	SAMN07423921	5.953	6.432.866	66,3	62	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS503	SAMN07423960	6.017	6.511.993	66,4	62	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS504	SAMN07423942	5.854	6.363.357	66,4	62	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS505	SAMN10478449	6.361	6.805.929	65,9	60	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS506	SAMN07423970	6.046	6.519.967	66,3	60	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS507	SAMN07423983	5.813	6.323.365	66,5	64	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS510	SAMN10478450	6.752	7.131.331	65,7	59	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS511	SAMN10478451	6.103	6.501.992	66,2	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	AUS512	SAMN10478452	6.000	6.489.430	66,3	62	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	coastal_25	SAMN31170783	6.012	6.438.485	66,3	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	coastal_26	SAMN31170784	6.572	7.170.259	65,7	60	89	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	coastal_27	SAMN31170785	6.197	6.626.072	66,1	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	coastal_28	SAMN31170786	5.786	6.299.062	66,5	62	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	coastal_31	SAMN31170787	5.865	6.351.135	66,4	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	coastal_32	SAMN31170788	5.914	6.397.394	66,3	63	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	coastal_35	SAMN31170789	5.789	6.294.984	66,5	62	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	coastal_36	SAMN31170790	5.921	6.398.246	66,3	63	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	coastal_37	SAMN31170791	5.865	6.382.537	66,4	62	91	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	coastal_38	SAMN31170792	5.892	6.388.887	66,4	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	Cotonu1	SAMN07424086	6.405	6.797.755	66,1	58	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	Env_47	SAMN07327864	5.948	6.426.859	66,5	62	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	Env_62	SAMN07327886	6.158	6.635.730	66,2	63	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	env133	SAMN07504805	5.966	6.441.480	66,4	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	env331b	SAMN07504838	6.801	7.273.584	65,6	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	GOM1	SAMN10839112	6.628	7.105.329	65,9	59	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	H09	SAMN26226219	5.938	6.425.832	66,4	63	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	H15	SAMN26226224	5.893	6.368.566	66,5	62	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	H19	SAMN26226228	5.951	6.448.136	66,3	63	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	Jp100	SAMN10478473	6.356	6.746.577	65,9	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	Jp1140	SAMN07424069	6.516	6.959.106	66,0	59	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	Jp1155	SAMN10478477	5.907	6.389.794	66,5	62	91	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	Jp1170	SAMN10478478	6.301	6.758.202	66,2	60	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	Jp1200	SAMN10478479	5.984	6.407.992	66,4	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	Jp1206	SAMN10478480	6.466	6.890.397	66,1	58	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	Jp1303	SAMN10478481	5.844	6.348.901	66,5	63	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	Jp222	SAMN10478474	5.868	6.358.777	66,4	62	91	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	Jp224	SAMN07424067	5.696	6.213.116	66,6	64	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	Jp238	SAMN10478475	6.043	6.518.676	66,3	60,5	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	Jp241	SAMN10478476	6.327	6.762.049	66,3	60	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	Jp54	SAMN07424065	6.348	6.904.684	65,9	63	90	Aquatic

Table S1

<i>P. aeruginosa</i>	Jp60	SAMN10478472	6.582	6.997.822	66,1	59	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	Jp97	SAMN07424066	5.754	6.269.401	66,6	63	91	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	JYH10	SAMN07424201	6.590	6.941.209	66,0	57	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	JYH11	SAMN10478507	5.780	6.317.265	66,5	63	91	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	JYH12	SAMN07424202	5.748	6.272.884	66,5	64	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	JYH13	SAMN10478508	5.915	6.433.806	66,4	63	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	JYH15	SAMN10478509	5.732	6.250.485	66,6	64	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	JYH16	SAMN07424204	6.477	6.854.217	66,0	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	JYH17	SAMN10478510	6.435	6.912.869	65,9	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	JYH18	SAMN07424205	6.213	6.728.568	66,1	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	JYH19	SAMN10478511	6.156	6.626.498	66,1	60	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	JYH21	SAMN10478512	5.865	6.391.024	66,5	62	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	JYH22	SAMN07424206	5.771	6.235.033	66,4	64	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	JYH23	SAMN10478513	6.415	6.813.593	66,1	58	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	JYH24	SAMN07424207	6.471	6.880.927	66,1	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	JYH25	SAMN10478514	5.847	6.347.317	66,5	62	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	JYH26	SAMN07424208	5.839	6.329.074	66,5	63,5	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	JYH28	SAMN07424209	5.989	6.466.266	66,3	62	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	JYH29	SAMN10478515	5.838	6.356.672	66,4	64	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	JYH6	SAMN07424199	6.662	7.008.188	66,0	56	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	JYH7	SAMN10478505	6.599	6.949.246	66,2	58	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	JYH8	SAMN07424200	6.314	6.846.009	65,9	63	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	JYH9	SAMN10478506	5.949	6.449.688	66,3	63	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	NSWPA15a	SAMN07424040	5.945	6.474.170	66,4	64	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	PT12	SAMN10478537	6.517	6.963.169	65,9	60	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	PT6	SAMN10478536	6.328	6.846.930	65,9	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	Tu61	SAMN07424062	6.127	6.503.793	66,4	60	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	W15Apr4	SAMN10478482	6.397	6.805.497	66,1	58	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	W15Aug23	SAMN10478483	6.330	6.766.791	66,1	60	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	W15Dec14	SAMN10478484	6.174	6.726.296	66,2	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	W15Dec4	SAMN10478485	6.275	6.774.400	66,2	61	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	W15Okt31	SAMN10478486	5.977	6.477.343	66,3	63	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	W1c	SAMN07504864	5.878	6.420.456	66,3	64	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	W5Aug16	SAMN07424080	5.878	6.376.425	66,5	62	90	Aquatic
<i>P. aeruginosa</i>	W5Aug28	SAMN10478487	6.343	6.904.005	65,9	63	90	Aquatic

Table S1. Genomic features of *P. aeruginosa* strains used in this study.

Table S2

Functionality	Clinical Environment	Aquatic Environment	Soil Environment
<i>Amino Acids and Derivatives</i>	7	5	6
<i>Carbohydrates</i>	3	5	5
<i>Cell Division and Cell Cycle</i>	0	0	0
<i>Cell Wall and Capsule</i>	2	1	3
<i>Clustering-based subsystems</i>	6	2	4
<i>Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments</i>	4	1	2
<i>DNA Metabolism</i>	3	2	0
<i>Dormancy and Sporulation</i>	0	0	0
<i>Fatty Acids, Lipids, and Isoprenoids</i>	2	1	0
<i>Iron acquisition and metabolism</i>	4	2	4
<i>Membrane Transport</i>	2	9	6
<i>Metabolism of Aromatic Compounds</i>	5	0	0
<i>Miscellaneous</i>	1	0	0
<i>Motility and Chemotaxis</i>	3	1	0
<i>Nitrogen Metabolism</i>	1	1	0
<i>Nucleosides and Nucleotides</i>	3	0	0
<i>Phages, Prophages, Transposable elements, Plasmids</i>	0	0	0
<i>Phosphorus Metabolism</i>	1	0	1
<i>Potassium metabolism</i>	1	0	0
<i>Protein Metabolism</i>	2	2	0
<i>Regulation and Cell signaling</i>	2	1	5
<i>Respiration</i>	1	2	2
<i>RNA Metabolism</i>	4	0	0
<i>Secondary Metabolism</i>	1	0	0
<i>Stress Response</i>	5	2	2
<i>Sulfur Metabolism</i>	0	0	3
<i>Virulence, Disease and Defense</i>	3	3	2

Table S2. Functional comparison of single gene families in each environment using the SEED database.

Table S3

<i>Antimicrobial resistance</i>	Flexible genome			Persistent genome
	Clinical Environment	Aquatic Environment	Soil Environment	All Environment
<i>Aminocoumarin-resistant DNA topoisomerases</i>	0	0	0	1
<i>Aminoglycoside O-phosphotransferases</i>	5	3	1	1
<i>Aminoglycoside N-acetyltransferases</i>	5	0	0	2
<i>Mutant porin proteins</i>	2	0	0	1
<i>Class D betalactamases</i>	2	0	0	1
<i>Class C betalactamases</i>	0	0	0	1
<i>Polymyxin B resistance regulator</i>	1	0	0	2
<i>EF-Tu inhibition</i>	3	5	0	1
<i>Fluoroquinolone-resistant DNA topoisomerases</i>	1	0	0	0
<i>Fluoroquinolone resistance phosphotransferase</i>	1	0	0	0
<i>Fosfomycin thiol transferases</i>	0	0	0	1
<i>Colistin phosphoethanolamine transferase</i>	2	0	0	2
<i>Colistin-resistant mutant</i>	0	0	0	1
<i>Multi-drug RND efflux pumps</i>	10	1	1	7
<i>MDR regulator</i>	0	0	0	2
<i>Multi-drug SMR efflux regulator</i>	0	0	0	1
<i>Chloramphenicol acetyltransferases</i>	0	0	1	1
<i>Phenicol resistance MFS efflux pumps</i>	2	0	0	0
<i>Sulfonamide-resistant dihydropteroate synthases</i>	1	1	0	0
<i>Tetracycline transcriptional repressor</i>	1	0	0	0
<i>Tetracycline resistance MFS efflux pumps</i>	3	0	0	0

Table S3. Antimicrobial resistance comparison of single gene families in each environment using the MEGARES database.



AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han apoyado durante el desarrollo de mi tesis doctoral.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, Juan Carlos y Mónica. No solo me habéis guiado en este trabajo, sino que me habéis acompañado a lo largo de toda mi residencia en el Hospital de Alicante. Gracias por vuestra generosidad, por confiar en mí, por animarme siempre y por estar ahí en cada paso del camino. Cada logro que he alcanzado lleva también vuestra huella: me habéis apoyado, orientado y, sobre todo, me habéis hecho descubrir lo mucho que me apasiona la investigación. Espero poder seguir vuestros pasos y construir una trayectoria de la que me sienta igual de orgullosa.

A mi familia. A mis padres, por la educación y los valores que me han transmitido desde siempre. Por enseñarme a esforzarme, a luchar por lo que me gusta y a no rendirme nunca. Gracias por haberlo dado todo por mí, por anteponer siempre mis necesidades a las vuestras y por estar ahí en cada paso. Soy lo que soy gracias a vosotros. A mi hermana y Dra. Elena, mi referente desde que tengo uso de razón. De pequeña te imitaba en todo, tanto que me llamabas tu mono de repetición... y qué suerte la mía haber seguido tus pasos. Siempre has sido un ejemplo para mí, como profesional y como persona, y no puedo estar más orgullosa de todo lo que has conseguido. Y ahora, aún más, al verte comenzar una nueva etapa como madre de Alicia, que con tan solo dos meses ya se ha convertido en una de las personas más importantes de mi vida.

A mi familia microbiológica, mis compañeros de residencia. Habéis sido mi pilar fundamental y la razón por la que cada mañana llegaba al laboratorio con una sonrisa. No todo el mundo tiene la suerte de trabajar rodeada de amigos, confidentes y apoyos incondicionales. Y en especial a David, mi otra mitad en el laboratorio: has sido el mejor compañero que podía haber tenido. Gracias por el apoyo y las fuerzas que me habéis dado siempre.

A mis Co-amigos, compañeros de residencia y parte esencial de este camino. A Carlos, por su inteligencia brillante y su forma de hacer más llevaderos incluso los días más duros. A Víctor, por aguantar todos mis dramas con infinita paciencia (aunque yo haya aguantado más...), y por recordarme siempre lo mucho que valgo. Y a Adriana, que se ha convertido en un apoyo imprescindible en mi vida. Siempre ha estado ahí para mí, en cada momento, ayudándome, escuchándome y sosteniéndome sin condiciones. Sin ella, este camino no habría sido el mismo, y yo tampoco.

Y por último, a Sergio. Gracias por estar a mi lado siempre, por entender los fines de trabajo, los viajes en los que la tesis se vino con nosotros y los planes que quedaron en pausa. Gracias por acompañarme incluso cuando no podías hacer nada más que estar ahí, simplemente conmigo. Has sido mi refugio en los días duros, mi impulso cuando me faltaban fuerzas y, sin duda, mi mayor apoyo en este camino... y en la vida.

